

**Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie  
der Pflanzen (IMBIO)**

---

**Untersuchungen zu Kultivierung, Transformation  
und Fermentation von *Wolffia spec.***

**Inaugural - Dissertation**

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu Bonn

vorgelegt am 31. Mai 2005

von

Dipl.-Ing. agr. Andrea Sandra Friedrich

aus

Bad Lauterberg im Harz

**Referent:** Prof. Dr. H. Schnabl

**Koreferent** Prof. Dr. H.-W. Scherer

**Tag der mündlichen Prüfung:** 22.07.2005

Hoffnung ist nicht die Überzeugung, daß etwas gut ausgeht,  
sondern die Gewißheit, daß etwas Sinn hat, egal wie es ausgeht.

Václav Havel

# Untersuchungen zu Kultivierung, Transformation und Fermentation von *Wolffia spec.*

## Kurzfassung

Die Wasserlinse *Wolffia spec.* aus der Familie der *Lemnaceae* scheint hinsichtlich mehrerer Parameter als effektives pflanzliches Expressionssystem für Proteine geeignet zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit sollten grundlegende Kulturdaten wie Medien, Labortauglichkeit, Biomassezuwachs, Vitalitätsmessung, Transformierbarkeit und Fermentationsparameter von zwölf *Wolffia*-Spezies bzw. Klonen evaluiert werden.

Da klassische Sterilisationsverfahren nicht einsetzbar waren, wurde ein Dekontaminationsprotokoll auf Antibiotikabasis entwickelt. Toleranzen und Sensitivitäten gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen verschiedener Wirkstoffgruppen konnten für *Wolffia spec.* spezifiziert werden. Für die schnelle und einfache Messung der Vitalität konnte das Fluoreszenzometer PAM-2000 herangezogen werden. Die ermittelten Yield-Werte korrelierten zuverlässig mit den Erhebungen des zuvor entwickelten Bonitursystems. Spätere Versuche zeigten, daß Vitalitätsmessungen mit RAMOS für die Evaluierung von Wachstumsparametern und deren digitale Dokumentation sehr gut geeignet sind.

Als sehr gute Labor-Spezies stellte sich im Verlauf der Experimente *W. australiana* heraus: Sie realisierte einen hohen Biomassezuwachs und verhielt sich auch unter dem Aspekt der statistisch belegten jahreszeitbedingten Wachstumsschwankungen als konstante und zuverlässige Laborkultur (15,6 % Tageszuwachs auf SH-Medium bezogen auf 15 Tage). Eine arbeitsexensive Langzeitkultur auf Festmedium war ebenso unproblematisch wie das erneute Überführen in Flüssigmedium. Als geeignetes Kultursystem erwiesen sich mit Aluminiumfolie verschlossene, sterile 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml Mediumvolumen.

Verschiedene *Wolffia*-Spezies konnten mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* teilweise und auch vollständig mit dem *gus*-Gen transformiert werden. Eine Transformation mit GFP konnte nicht bestätigt werden. Nach der Optimierung des Verfahrens der Agrobakterien-Infiltration konnte ein positives Signal auf Transkriptionsebene für *W. australiana* nach Transformation mittels *A. tumefaciens* C58/pCAMBIA 1301 detektiert werden. Proteindaten nach Bradford wurden ebenso dokumentiert wie die Messwerte des MUG-Assays, welche als Leitparameter zukünftiger Experimente dienen können. Für den Nachweis stabiler Transformation wurde ein Selektionsprotokoll entwickelt, welches den allelopathischen Wechselwirkungen einer zu selektierenden *Wolffia*-Kultur Rechnung trägt.

Um die Erzeugung von unerwünschten Chimären zu vermeiden, wurden zunächst verschiedene Kallus-Induktionsmedien evaluiert. Die Entwicklung kallöser Strukturen und deren Proliferation konnte unter einem NAA/BAP-Regime beobachtet werden. Die Co-Kultivierung mit *A. tumefaciens* GV3101/pCAMBIA 1301 erbrachte vollständig blaue Strukturen nach X-Gluc-Färbung. Regenerationsparameter verbleiben als noch zu evaluierende Faktoren.

Für die Fermentation verschiedener *Wolffia*-Spezies konnten vitale Pflanzen sowohl im Biobeutel-System als auch im MiniPerm über längere Zeiträume (bis drei Monate) zuverlässig erhalten werden. Die Daten des im Hause entwickelten *Wolffia*-Fermenters JACES dienen als Grundlage für die Optimierung eines *Wolffia*-Airlift-Fermenters, der den Ansprüchen des Expressionssystems genügt sowie ein einfaches Upscaling ermöglicht.

Auf der Basis der in dieser Arbeit evaluierten Daten konnten erste Expressionsdaten einer entwickelten Immuntoxinkassette in *W. australiana* (Becker, unpubl. Daten) erzeugt werden. Das Expressionssystem *Wolffia* besitzt demnach das Potential für die Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine und stellt somit eine realistische Alternative auf dem Gebiet des Molecular Pharming dar.

## Investigation of cultivation, transformation and fermentation of *Wolffia spec.*

### Abstract

*Wolffia spec.* (duckweed) belonging to the family of *Lemnaceae* is discussed as a promising innovative plant expression system for pharmaceutical proteins. Within the scope of this thesis basic cultivation parameters (like media, laboratory usage, biomass production, vitality), transformation methods and fermentation systems were investigated for twelve clones of different *Wolffia* species. For sterile cultivation a decontamination protocol based on antibiotics was developed, as the classic methods for sterilization (such as ethanol or sodiumhypochlorit) failed. Tolerance as well as sensitivity of all *Wolffia* species was determined for different drug classes. For a fast and easy detection of vitality, the fluorescence meter PAM-2000 was used. The yield data measured with this method were highly correlated with the data from the subsequently developed rating system. Furthermore, the RAMOS proved to be an excellent tool for the evaluation and digital documentation of cultivation parameters.

During the testing *W. australiana* turned out to be a highly qualified species for laboratory usage. Biomass production was found to be constant and reliable (with a daily increase of 15.6 % on SH medium considering 15 days), despite significant fluctuations within the annual rhythm. Long-term culture on solid media as well as the transfer back into liquid media were unproblematic. For cultivation in liquid media an appropriate cultivation system was a 250 ml sterile Erlenmeyer flask with 100 ml medium closed with aluminium foil.

Different *Wolffia* species could be successfully transformed partially and completely via *Agrobacterium tumefaciens* containing the *gus*-gene. A *gfp*-induced fluorescence could not be separated from the native fluorescence in *Wolffia* plants. After optimizing the method of agrobacteria-infiltration through low-pressure, a positive RT-PCR-signal could be detected after *gus*-gene transformation with *A. tumefaciens* C58/pCAMBIA 1301. Protein data after Bradford and data from the MUG-assay were determined and can be used as guidelines for further experiments. For the verification of stable transformants, a selection protocol which takes the allelopathic interactions into consideration was developed.

To avoid unwanted chimera during transformation callus induction is a suitable tool. To induce calli, different phytohormones were tested at various concentrations. However, it was not successful in most cases. Proliferation could only be observed in *W. australiana* under NAA/BAP influence on SHI medium. The transformation of these callus-like structures with *gus*-transgenic agrobacteria was successful. The regeneration of the calli should be part of further research.

The Biobag and MiniPerm fermentation systems allowed reliable cultivation of vital and growing *Wolffia* plants for more than three month. The developed *Wolffia*-bioreactor JACES and its settings were the basis for the optimization of an airlift-bioreactor, which fulfils the requirements of submerged living plants and allows uncomplicated upscaling.

Based on the data obtained in this work, for the first time it was possible to detect a transcription signal after transformation with agrobacteria containing a developed immunotoxin cassette in *W. australiana* (Becker unpub. data). This result shows that *Wolffia* has the potential for the expression of pharmaceutical proteins and that *Wolffia* is an innovative alternative for molecular pharming applications.

**1. Einleitung**

1.1	Molecular Pharming.....	1
1.2	Der Weg zum Molecular Pharming.....	1
1.3	Pflanzen als Expressionssystem für Proteine.....	2
1.4	Die Familie der Lemnaceen.....	4
1.4.1	Die Gattung <i>Wolffia</i> .....	7
1.5	Anwendungsgebiete für Lemnaceen.....	8
1.6	Lemnaceen als Expressionssystem.....	9
1.7	<i>Wolffia</i> als Expressionssystem für Immuntoxine.....	9
1.8	Ziele dieser Arbeit.....	10

**2. Material und Methoden**

2.1	Chemikalien, Substanzen und Geräte.....	12
2.1.1	Chemikalien.....	12
2.1.2	Verwendete Antibiotika.....	13
2.1.3	Geräteliste.....	13
2.2	Pflanzenmaterial.....	14
2.3	Technische Parameter.....	15
2.3.1	Einstellungen der Phytokammer und Kulturschränke.....	15
2.3.2	PCR-Programm und Primer.....	16
2.4	Medien und Lösungen.....	16
2.5	Medienversuche für <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	21
2.6	Unsterile Dauerkulturen in Aquarien.....	22
2.7	Sterilisation der Pflanzenkulturen.....	23
2.7.1	Behandlung der Pflanzen mit demineralisiertem Wasser, Ethanol, Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid.....	24
2.7.2	Waschen und Kultivierung der Pflanzen in Plant Preservative Mixture (PPM).....	25
2.7.3	Tests zur Antibiotika-Verträglichkeit von <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	25
2.7.4	Sterilisation mit Antibiotika.....	27
2.7.5	Sterilisation durch Antibiotika-Infiltration.....	28
2.7.6	Sterilisation durch Ultraschall, pH-Shift und Algenvernichtungsmittel.....	29
2.7.7	Identifikation der Kontaminanten.....	30
2.8	Bonitur der <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	30
2.9	Bewertung der Pflanzenvitalität mit Hilfe des PAM-2000.....	31

---

2.10	Frisch- und Trockenmassebestimmung.....	32
2.11	Messung der Sauerstoffproduktion mit Hilfe des Cell-Scans.....	32
2.12	Kultursysteme für <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	34
2.12.1	Erlenmeyerkolben.....	34
2.12.2	Zellkulturflaschen.....	34
2.12.3	Festmedium-Platten.....	34
2.13	Bestimmung der Wachstumsrate.....	34
2.13.1	Erfassung der Wachstumsrate in 6-Well-Platten.....	35
2.13.2	Erfassung der Wachstumsrate in Glasschalen.....	35
2.13.3	Auswertung der Wachstumsversuche mit der SigmaScan-Software.....	36
2.13.4	Statistische Auswertung (univariate Varianzanalyse).....	37
2.13.5	Wachstumsmessung mit dem Scannalyzer.....	39
2.14	Fermenter-Systeme für <i>Wolffia</i> .....	39
2.14.1	Waver.....	39
2.14.2	Biobeutel.....	40
2.14.3	MiniPerm.....	41
2.14.4	Osmotek-Fermenter.....	42
2.14.5	JACES (der IMBIO- <i>Wolffia</i> -Fermenter).....	43
2.15	Auswertung der Fermenter-Daten.....	44
2.16	Transformation von <i>Wolffia</i> .....	44
2.16.1	Reportersysteme.....	44
2.16.2	Verwendete Stämme von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	45
2.16.3	Transformation durch Co-Kultivierung mit Agrobakterien.....	45
2.16.4	Transformation durch Infiltration mit Agrobakterien.....	46
2.16.5	Transformation mittels Agrobakterien-Injektion (Agroinjektion).....	47
2.17	Nachweise transgener Pflanzen.....	49
2.17.1	Nachweis der Transformanten durch X-Gluc-Färbung.....	49
2.17.2	DNA-Extraktion aus einer <i>Wolffia</i> -Pflanze.....	49
2.17.3	RNA-Isolation aus <i>W. australiana</i> .....	50
2.17.4	Reverse-Transkription (RT).....	51
2.17.5	Nachweis transgener Pflanzen durch PCR auf DNA bzw. cDNA.....	51
2.17.6	Proteinuntersuchungen.....	51
2.17.6.1	Proteinisolation aus <i>W. australiana</i> .....	51
2.17.6.2	MUG-Assay.....	51
2.18	Kallus-Induktion von <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	52

### 3. Ergebnisse

3.1	Vitalitätsmessung von <i>Wolffia</i> mit dem PAM-2000.....	54
3.2	Kulturmedien und Kulturgefäße zur Anzucht von <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	54
3.2.1	Bonitur von <i>Wolffia</i> auf verschiedenen Kulturmedien.....	54
3.2.2	Kulturmedienversuch und PAM-2000-Messung für <i>W. columbiana</i> .....	56
3.2.3	Medien- und Kulturgefäßversuche mit dem Scannalyzer.....	58
3.2.4	Festlegung der Parameter Medium und Kulturgefäß für <i>Wolffia</i> .....	60
3.3	Sterilisationsversuche von <i>Wolffia spec.</i> .....	61
3.3.1	Sterilisation mit demineralisiertem Wasser, Ethanol, Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid.....	62
3.3.2	Sterilisation mit PPM.....	63
3.3.3	Antibiotika-Verträglichkeit von <i>Wolffia</i> .....	66
3.3.4	Antibiotika zur Selektion transgener Pflanzen.....	71
3.3.5	Sterilisation durch Fungizide und Fungistatika.....	75
3.3.6	Schädigungspotential von Antibiotika bei <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	78
3.3.7	Algenmaster, Ultraschall und pH-Shift.....	79
3.4	Identifikation von Kontaminanten.....	80
3.5	Kultursysteme für <i>Wolffia</i> .....	81
3.6	Wachstumsrate von <i>Wolffia</i> .....	82
3.6.1	Ermittlung der Wachstumsrate in 6-Well-Platten durch manuelle Auszählung.....	82
3.6.2	Ermittlung der Wachstumsdaten mit Hilfe der SigmaScan-Software.....	86
3.6.3	Statistische Auswertung der Schalenversuche.....	94
3.7	Biomasse-Korrelation mit dem CellScan-System.....	97
3.8	Fermenterdaten.....	102
3.8.1	Waver.....	102
3.8.2	Biobeutel.....	103
3.8.3	MiniPerm.....	105
3.8.4	Osmotek-Fermenter.....	106
3.8.5	JACES – der Prototyp eines <i>Wolffia</i> -Fermenters.....	107
3.8.6	Airlift-Fermenter.....	109
3.9	Zusammenfassung der Zuwachsdaten.....	110
3.10	Transformation durch Agrobakterien.....	111
3.10.1	Transformation durch Co-Kultivierung mit Agrobakterien.....	111
3.10.2	Transformation durch Agrobakterien-Infiltration.....	112
3.10.3	Transformation durch Agrobakterien-Injektion.....	115



---

3.11	Kallus-Induktion von <i>Wolffia</i> .....	118
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	<i>Wolffia</i> als definierte Kultur.....	123
4.1.1	<i>Wolffia</i> im Ökosystem.....	123
4.1.2	Wechselbeziehungen zwischen biotischen und abiotischen Faktoren.....	124
4.1.3	Wachstum der Laborkulturen.....	128
4.1.4	Sterilität.....	131
4.1.5	Vitalität.....	132
4.1	Transformation.....	134
4.1.1	Vitalität nach Transformationsbehandlungen.....	135
4.1.2	<i>Agrobacterium-tumefaciens</i> -vermittelter Gentransfer.....	137
4.2.2.1	Co-Kultivierung mit <i>Wolffia spec.</i> .....	137
4.2.2.2	Agrobakterien-Infiltration.....	138
4.2.2.3	Agrobakterien-Injektion.....	139
4.2.3	Selektion der Transformanten.....	139
4.2.4	Endogene Mikroorganismen in transgenen Pflanzen.....	140
4.3	Kalluskulturen.....	141
4.4	Fermentation.....	144
4.5	Ausblick.....	145
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	148
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	151

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
°d	Grad Deutsche Härte
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2iP	N <sup>6</sup> -(2-Isopentenyl)adenine
A	Adenin
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
<i>A. t.</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
atm	Atmosphären (Druckeinheit)
BA	6-Benzylamin
BAP	6-Benzylaminopurin
cDNA	copy DNA
CPS	Caseinhydrolysat-Pepton-Stärke (-Agar)
CT-B	Untereinheit B des Cholera-Toxins
demin.	demineralisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonucleoside Triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
F1	Erste Filialgeneration
Fab	Fragment antibody (antigenbindendes Fragment)
FAO	Food and Agriculture Organization
FM	Frischmasse
For	forward (Primer)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	β-Glucuronidase
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
ha	Hektar (=100m x 100 m)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IES	Indolyl-2-Essigsäure
LT-B	Untereinheit B des hitzelabilen Enterotoxins
MES	2-(N-Morpholino-) Ethansulfonsäur
MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NAA	1-Naphtylessigsäure

---

MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
OD	optische Dichte
PAM	Pulse Amplitude Measurement
PDA	Potato-Dextrose-Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
pPAM	Backbone des Ausgangsplasmides
RAMOS	Respiration Activity Monitoring System
Rev	reverse (Primer)
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuclease
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RubisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SARK	Signalpeptid-Angiogenin-RFT5-KDEL
scFv	Single Chain Fragment Variable
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis
t	Tonne (= 1000 kg)
TE	Tris-EDTA
T-DNA	Transfer-DNA
TDZ	Thidiazuron
TM	Trockenmasse
u	Unit
UV	ultraviolett
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1) Überblick über die Subfamilien, Gattungen, Sektionen und Spezies der <i>Lemnaceae</i> .....	5
Abb. 2) Die Phänotypen von Vertretern der Lemnaceen.....	7
Abb. 3) Schematische Darstellung der Immuntoxinproduktion in <i>Wolffia</i> und die Wirkungsweise dieser Proteine am Beispiel einer Krebszelle.....	10
Abb. 4) Unsterile Aquarien-Dauerkulturen von <i>Wolffia</i> .....	22
Abb. 5) Miracloth-Sieb.....	23
Abb. 6) Langstiel-Siebchen mit geernteten <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	28
Abb. 7) Grundeinstellungen der Software des PAM-2000.....	32
Abb. 8) Cell-Scan-Anlage.....	33
Abb. 9) Eine <i>Wolffia</i> -Schale nach der Bildbearbeitung und nach dem Rot-Overlay.....	37
Abb. 10) WaveTec-Konstruktion und Cellbag.....	40
Abb. 11) Biobeutel mit <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	41
Abb. 12) Das MiniPerm-System.....	41
Abb. 13) Der Osmotek-Fermenter.....	42
Abb. 14) Schematischer Aufbau des JACES-Fermenters.....	44
Abb. 15) <i>W. microscopica</i> in verschiedenen Kulturmedien nach unterschiedlicher Kultivierungszeit.....	56
Abb. 16) PAM-2000-Vitalitätsmessung und digitale Aufnahmen von <i>W. columbiana</i> .....	57
Abb. 17) Darstellung des Biomassezuwachses von <i>Wolffia spec.</i> (Scannalyzer).....	59
Abb. 18) Zunahme des Oberflächendeckungsgrades [%] bei <i>Wolffia spec.</i> (Scannalyzer)...	60
Abb. 19) Yield von <i>W. microscopica</i> (a) kultiviert mit verschiedenen PPM-Konzentrationen und digitale Aufnahmen.....	64
Abb. 20) Einfluß der Antibiotika Penicillin, Ampicillin und Ticarcillin auf den Yield von <i>W. microscopica</i> .....	67
Abb. 21) Yield-Werte von <i>Wolffia spec.</i> unter dem Einfluß von Ciprofloxacin und Piperacillin.....	69
Abb. 22) Yildentwicklung von <i>Wolffia spec.</i> unter dem Einfluß verschiedener Hygromycinkonzentrationen unter Stark- und Schwachlichtbedingungen.....	73
Abb. 23) Yildentwicklung von <i>W. columbiana</i> unter verschiedenen Kanamycinkonzentrationen unter Stark- und Schwachlichtbedingungen.....	75

Abb. 24) Hemmhöfe um Nystatin-Injektionen verschiedener Konzentrationen nach mycel- bzw. hefehaltigem Mediumausstrich.....	76
Abb. 25) Hemmhöfe um Amphotericin-Injektionen verschiedener Konzentrationen nach mycel- bzw. hefehaltigem Mediumausstrich.....	77
Abb. 26) Pflanzenzuwachs mittels manueller Auszählung verschiedener <i>Wolffia</i> -Spezies...	84
Abb. 27) Netto-Pflanzenzuwachs aus den Versuchen 1 und Versuch 2 und prozentualer Tageszuwachs.....	85
Abb. 28) Wachstumsverlauf verschiedener <i>Wolffia</i> -Arten durch mathematische Berechnung der Pflanzenanzahl in unterschiedlichen Jahreszeiten.....	88
Abb. 29) Darstellung des Netto-Gesamtzuwachses in Fronds, des Netto-Pflanzenzuwachses in Prozent, des prozentualen Tageswachstums nach 15 bzw. 21 Tagen sowie des zusammengefaßten Tageswachstums der Schalenversuche.....	91
Abb. 30) Versuche zu Medien und Medienzusätzen für die Netto-Zuwachsrate in Fronds von <i>W. australiana</i> .....	93
Abb. 31) Netto-Zuwachsrate von <i>Wolffia</i> spec. nach 15 Tagen.....	94
Abb. 32) Netto-Zuwachsrate von <i>Wolffia</i> spec. nach 21 Tagen.....	96
Abb. 33) Netto-Zuwachsrate von <i>Wolffia</i> spec. nach 15 bzw. 21 Tagen innerhalb der getesteten Zeitpunkte.....	96
Abb. 34) Netto-Zuwachsrate von <i>Wolffia</i> spec. unter dem Einfluß verschiedener Medien und Zusätze.....	97
Abb. 35) Kontrollmessungen des Scannalyzers im unversiegelten Versuchsaufbau.....	98
Abb. 36) CellScan-Messungen mit vergifteten und unvergifteten <i>W. brasiliensis</i> -Pflanzen.	99
Abb. 37) CellScan-Messungen mit vergifteter und unvergifteter <i>W. arrhiza</i> 8272 über acht Tage in einem Versuchsaufbau mit Parafilm und zusätzlichen Schraubzwingen.....	100
Abb. 38) CellScan-Messungen mit vergifteten und unvergifteten <i>W. brasiliensis</i> -Pflanzen in einem Versuchsaufbau mit Frischhaltefolie.....	100
Abb. 39) CellScan-Messungen mit vergifteter (70 % (v/v) EtOH) und unvergifteter (SH-Medium) <i>W. australiana</i> über 12 Tage in einem Versuchsaufbau mit Glasplatte und Spiegelkleber.....	101
Abb. 40) CellScan-Messungen mit vergifteter und unvergifteter <i>W. cylindracea</i> über neun Tage.....	102
Abb. 41) Photodokumentarische Reihe des Pflanzenwachstums von <i>W. australiana</i> im kleinen Biobeutel.....	103

---

Abb. 42) Netto-Frondzuwachs von <i>W. australiana</i> in Prozent nach 28, 84 und 300 Tagen im Biobbeutel-System.....	104
Abb. 43) Hefe-kontaminierter Fermenter und Anordnung der Pflanzen um Luftblasen.....	106
Abb. 44) JACES-Fermenter.....	107
Abb. 45) Optimierter Airlift-Fermenter mit <i>W. australiana</i> .....	110
Abb. 46) Potentiell GFP-transformierte <i>W. australiana</i> (a) und unbehandelte Kontrollpflanzen.....	112
Abb. 47) <i>Wolffia</i> -Pflanzen nach Transformation durch Agrobakterien.....	113
Abb. 48) Bradford- und MUG-Daten von <i>W. australiana</i> -Pflanzen nach Infiltration mit <i>A. tumefaciens</i> C58/pCAMBIA 1301 sowie Gelphoto der PCR nach Reverser Transkription.....	114
Abb. 49) <i>W. brasiliensis</i> auf dem Grundmedium SH mit verschiedenen Phytohormonregimen nach neun Wochen Kultivierungszeit.....	119
Abb. 50) Dedifferenzierte Strukturen von <i>W. australiana</i> nach verschiedenen Phytohormonregimen und nach Co-Kultivierung mit Agrobakterien mit X-Gluc gefärbte kallöse Strukturen nach Entfärbung mit EtOH.....	121

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1) Eigenschaften verschiedener Systeme zur Produktion rekombinanter Proteine.....	3
Tab. 2) In Pflanzen produzierte Fremdproteine.....	4
Tab. 3) Liste verwendeter Substanzen und Chemikalien.....	12
Tab. 4) Liste verwendeter Antibiotika.....	13
Tab. 5) Liste der verwendeten Geräte.....	13
Tab. 6) Herkunft der verwendeten Pflanzen.....	14
Tab. 7) Auf <i>Wolffia spec.</i> getestete Antibiotika (-Konzentrationen).....	26
Tab. 8) Infiltration von <i>Wolffia</i> -Pflanzen mit verschiedenen Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen.....	29
Tab. 9) Versuchsansätze zum Cell-Scan.....	33
Tab. 10) Versuchsaufbau der Wachstumsversuche.....	36
Tab. 11) Versuchsdaten zu den Fermentationsversuchen im WaveTec-System.....	40
Tab. 12) Versuchsdaten zu den Fermentationsversuchen im Biobeutel-System.....	41
Tab. 13) Fermentationsversuche im Osmotek-System.....	42
Tab. 14) Fermentationsversuche im JACES-Fermenter.....	43
Tab. 15) Verwendete Agrobakterienstämme mit Resistenzen.....	45
Tab. 16) Parameter der Transformation von <i>Wolffia</i> via Agrobakterien.....	46
Tab. 17) Transformationsparameter der Agrobakterien-Injektion.....	48
Tab. 17a) Gesamtzahl der mit Agrobakterien injizierten <i>Wolffia</i> -Pflanzen.....	49
Tab. 18) Unterschiedliche Phytohormon-Regime zur Kallusinduktion und Kalluserhaltung.....	53
Tab. 19) Boniturergebnisse nach Kultivierung der Pflanzen im jeweiligen Medium.....	55
Tab. 20) Boniturnoten von <i>Wolffia spec.</i> nach der Applikation verschiedener Antibiotika und deren gewählten Arbeitskonzentrationen zur Dekontamination der Flüssigkulturen.....	78
Tab. 21) Liste der identifizierten Kontaminanten.....	80
Tab. 22) Zuwachs der <i>Wolffia</i> -Pflanzen in 6-Well-Platten über einen Zeitraum von 17 bzw. 21 Tagen.....	85
Tab. 23) End-pH-Wert und Wachstumsdaten von <i>Wolffia spec.</i> (S2 bis S5).....	90
Tab. 24) Varianztafel bezogen auf die Auswertung der Zuwachsraten nach Tag 15.....	94
Tab. 25) Varianztafel bezogen auf die Auswertung der Zuwachsraten nach Tag 21.....	95
Tab. 26) End-Daten der Fermentationsversuche von <i>W. australiana</i> im Biobeutel-System..	104

---

Tab. 27) End-Daten zu den Fermentationsversuchen von <i>W. australiana</i> im MiniPerm-System.....	105
Tab. 28) End-Daten zu den Fermentationsversuchen von <i>W. australiana</i> und <i>W. brasiliensis</i> im Osmotek-System.....	106
Tab. 29) End-Daten zu den Fermentationsversuchen von <i>Wolffia</i> spec. im JACES-Fermenter.....	109
Tab. 30) Anteile vollständig oder teilweise gefärbter nicht selektierter Fronds nach X-Gluc-Färbung unter der Berücksichtigung der Behandlung mit bzw. ohne Mazerozym.....	116
Tab. 31) Anteile vollständig oder teilweise gefärbter selektierter Fronds nach X-Gluc-Färbung unter der Berücksichtigung der Behandlung mit und ohne Mazerozym.....	116



## 1. Einleitung

### 1.1 Molecular Pharming

Seit jeher versucht der Mensch, seine Umwelt nach seinen Vorstellungen zu formen und die zur Verfügung stehenden Ressourcen für seine Zwecke nutzbar zu machen. Dem Ideenreichtum steht in heutiger Zeit modernste Technologie zur Seite. Ein stetig wachsender Forschungszweig seit Entdeckung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist die Bio- und Gentechnologie, die eine Vielzahl von Chancen auf allen Gebieten der Biowissenschaft, insbesondere aber der Medizin und Pharmazie, eröffnet. In jüngster Zeit hat sich die Bio- und Gentechnik zum Ziel gesetzt, der Medizin Wirksubstanzen von pharmazeutischer Relevanz in höchster Qualität und Reinheit zur Verfügung zu stellen. Die Produktion derartiger Substanzen in transgenen Pflanzen wird als „Molecular Pharming“ bezeichnet (Schillberg *et al.* 2000).

Neben der Qualitäts- und Quantitätssicherung steht das Bestreben nach einem ökologisch sicheren, effektiven und ökonomisch konkurrenzfähigen Produktionssystem im Vordergrund. Für die moderne Therapie-Anwendung im humanen Organismus können die Produkte aus prokaryotischen Zellkultursystemen fehlerhaft in Bezug auf Proteinfaltung und entsprechender Glykosylierung sein. Da den Prokaryoten die posttranslationalen Modifikationsmöglichkeiten eines eukaryotischen Systems fehlen, könnten Therapieversagen oder allergene Reaktionen in der Applikation im Humanbereich vorprogrammiert sein. Spezifische Anwendungen wie z. B. in der humanen Tumorbekämpfung wären so mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit zum Scheitern verurteilt. Diesen Erkenntnissen folgend ist die Suche nach einem geeigneten eukaryotischen Produktionssystem die logische Konsequenz. Da Produkte aus menschlichen und tierischen Zellkulturen Risiken durch humanpathogenes Potential beinhalten (z. B. Mykoplasmen), scheint die einzige Alternative ein pflanzliches Expressionssystem zu sein.

### 1.2 Der Weg zum Molecular Pharming

Wohl eines der ältesten Beispiele des traditionellen Farmings ist das „Ernten“ von Schafwolle oder in jüngeren Tagen die Gewinnung von Antibiotika durch Pilze (Diggins 1999, Rodriguez-Saiz *et al.* 2005). Diesem traditionellen Farming liegt zu Grunde, daß das erzeugte Produkt natürlicherweise in den Produzenten vorkommt (z. B. Penicillin aus *Penicillium notatum*) und sich züchterische Hauptinteressen auf eine Erhöhung der quantitativen Ausbeute konzentrieren.

Durch die Etablierung gentechnisch-molekularbiologischer Methoden war es später möglich, Substanzen zu gewinnen, die im Produzenten nicht natürlicherweise vorkommen und somit neben der Quantität ein Hauptaugenmerk auf die Verbesserung der Qualität eines organismusfremden Endproduktes zu legen (Molecular Farming). Vielerlei technische Enzyme für industrielle Prozesse (Papier- und Waschmittelherstellung) können somit weitaus ökonomischer als in der klassischen

Erzeugung produziert werden. Beispiele hierfür sind z. B.  $\alpha$ -Amylasen aus *Bacillus licheniformis* in Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Erbse (*Pisum sativum*) oder Phytase aus *Aspergillus niger* in Tabak und Sojabohnen (*Glycine max*) (Schillberg *et al.* 2000).

Als erstes „Molecular-Pharming-Produkt“ konnte 1982 humanes Insulin in gentechnisch veränderten Bakterien durch die US Food and Drug Administration hergestellt werden. Sowohl Wirksubstanzen wie ein Hepatitis-B-Impfstoff als auch Antikörper gegen Lymphome sowie Proteinwirkstoffe gegen Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis folgten. Bis heute hat sich die Menge der so erzeugbaren Substanzen auf ca. 130 vervielfacht, wobei derzeit ca. 370 weitere in der Entwicklung und eine unbekannte Zahl in der frühen Erforschung sind (Gadaska 2003).

### 1.3 Pflanzen als Expressionssysteme für Proteine

Bei allem dokumentierten Erfolg der eingesetzten Wirksubstanzen aus bakteriellen Molecular-Pharming-Systemen kann jedoch nicht bestritten werden, daß das Potential dieser Produktionssysteme für hochkomplexe Proteinstrukturen, wie z. B. Immuntoxine, limitiert ist. Zudem kann die Nutzung der tierischen und humanen Expressionsprodukte ein nicht unerhebliches Risiko in der Humantherapie darstellen. In der folgenden Aufzählung wird deutlich, warum Bedenken gegen einen erfolgreichen Einsatz im menschlichen Organismus bestehen:

- a) Da den Prokaryoten die posttranslationalen Modifikationsmöglichkeiten der höheren Eukaryoten fehlen, sind falsche Proteinfaltungen, Unfunktionalität oder gar allergenes Potential der bakteriell erzeugten Proteine nicht auszuschließen.
- b) Bakterien und Hefen nehmen z. T. keine ausreichende Glykosylierung vor, das heißt, daß die Wirkstoffe u. U. nicht an ihren Bestimmungsort im menschlichen Organismus gelangen können.
- c) Humanpathogene Bakterien, Viren und insbesondere Mykoplasmen aus tierischen und auch humanen Zellkultursystemen können auf den Patienten übertragen werden (Humanpathogenität).
- d) Die Erhaltung des Expressionssystems und die Produktion von Wirksubstanzen in Bakterien, Hefen und tierischen Zellen sind i. d. R. ökonomisch aufwendig.

Einen Vergleich zwischen transgenen Pflanzen, bakteriellen Systemen und Säugerzellen als Expressionssysteme unter den Gesichtspunkten der Kosten, Qualität und Anwendbarkeit stellt Tabelle 1 dar.

**Tab. 1) Eigenschaften verschiedener Systeme zur Produktion rekombinanter Proteine**

1 = Bakterien, Hefen; 2 = Herstellung transgener Organismen; 3 = teure Anlage zur Kultivierung und Tierhaltung; 4 = im Vergleich zu humanen Glykosylierungsmustern; 5 = Endotoxine; 6 = Humanpathogene; 7 = good manufacturing practice

Faktor	Transgene Pflanzen	Mikroben	Säugerzellen
Produktionskosten	gering	Gering bis mittel	hoch
Zeitaufwand <sup>2</sup>	mittel	Gering bis mittel	mittel
Scale-Up-Kosten	gering	hoch <sup>3</sup>	hoch <sup>3</sup>
Vermehrung	leicht	leicht <sup>1</sup>	schwer
Produktivität	hoch	mittel bis hoch	mittel
Produktqualität und -homogenität	hoch	mittel	hoch
Glykosylierungsmuster <sup>4</sup>	abweichend	keine	abweichend
Kontaminationsrisiko	Nein	ja <sup>5</sup>	ja <sup>6</sup>
Daten-Monitoring	mittel	leicht	leicht
Ethische Bedenken	existent	gering	existent
GMP-Konformität <sup>7</sup>	machbar	etabliert	etabliert
Lagerung transgenen Materials	leicht (RT)	mittel (-20 °C)	schwierig (N <sub>2</sub> )

Quelle: Boehm (pers. Mitteilung)

Die aufgeführten Problematiken durch biochemische Unfunktionalität oder Humanpathogenität können durch die Verwendung von höheren Pflanzen als Expressionssystem für pharmazeutisch relevante Proteine gelöst werden, da Pflanzen

- als Eukaryoten in der Lage sind, auch hochkomplexe Proteine so zu falten, daß diese bei einer Applikation im menschlichen Körper voll funktionsfähig sind,
- das Potential für eine vollständige Glykosylierung besitzen (Gomord und Faye 2004),
- pflanzenpathogene Keime nicht auf den Menschen übertragen und daher kein humanpathogenes Risiko beinhalten,
- aufgrund ihres Photoautotrophismus in der Produktion die ökonomisch günstigere Variante im Vergleich zu prokaryotischen Systemen und Säugerzellen darstellen.

Im Jahr 1989 konnte mit IgG1 der erste funktionelle Antikörper erfolgreich in Tabak exprimiert werden (Hiatt *et al.* 1989). Ma *et al.* produzierten 1995 einen sekretorischen Antikörper (sIgA) in Tabak, der gegen ein Oberflächenprotein des Karieserregers *Staphylococcus mutans* gerichtet ist. Dieser gilt als erster im pflanzlichen System produzierter Antikörper, der für eine passive Immunisierung eingesetzt werden könnte (klinische Phase II seit 1998). Viele weitere Wirksubstanzen sind seitdem in pflanzlichen Expressionssystemen hergestellt und ihre Anwendung

für verschiedene Zwecke, z. B. die Anwendung im Humanbereich, diskutiert worden (Conrad und Fiedler 1994, Fischer *et al.* 2004, Maliga und Graham 2004, Stoger *et al.* 2005).

In Tabelle 2 sind einige Proteine aus nicht pflanzlichen Organismen dargestellt, die erfolgreich in Pflanzen exprimiert werden konnten. Bemerkenswert sind zudem neuere Untersuchungen für die Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine in Moos (Decker und Reski 2004) bzw. in Algen (Mayfield und Franklin 2005).

**Tab. 2) In Pflanzen produzierte Fremdproteine**

Produkt	Original-Organismus	Empfänger-Organismus
CT-B	<i>V. cholerae</i>	Kartoffel
LT-B	ETEC	Kartoffel/Tabak
Insulin (CT-B)	ETEC	Kartoffel
Capsid-Protein	Norwalk-Virus	Kartoffel/Tabak
Oberflächen-Antigen	Hepatitis B Virus	Tabak
Malaria-Epitope	<i>Plasmodium spec.</i>	Tabak
V3-Loop von HIV-1	HI-Virus	Tabak
Tollwut-Virus-Drg24-Antigen	Tollwut-Virus	Tabak/Spinat
Maul- und Klauenseuche-Erreger	Schwein	Alfalfa
Gastroenteritis Coronarvirus	Schwein	Tabak/Mais
IgG1 (seit 1989)	Hase	Tabak
IgM B1-8 (seit 1990)	Hase	Tabak
sIgA (seit 1995)	<i>S. mutans</i>	Tabak
Avidin (seit 1997)	Huhn	Mais
$\beta$ -Glucoronidase (seit 1998)	<i>E. coli</i>	Mais
Aprotinin (seit 1999)	Huhn	Mais

Quelle: Doran 2000

#### 1.4 Die Familie der Lemnaceen

Die Familie der *Lemnaceae* (Wasserlinsengewächse) gehört zu den Monokotyledonen und repräsentiert eine morphologisch-taxonomisch isoliert stehende Gruppe. Sie unterteilt sich in die Gattungen *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* und *Wolffiella*, welche wiederum z. T. eine Vielzahl von Spezies aufweisen (Abbildung 1 und 2). Lemnaceen weisen keine Differenzierung in Blatt und Sproßachse auf; sie sind z. T. sogar ausschließlich auf ein einziges Blatt reduziert (Augsten 1984). Die meisten Arten der Lemnaceen weisen feine Wurzeln auf, es sind jedoch auch wurzellose

Vertreter anzutreffen. Betrachtet man die Wasserlinsengewächse eingehend, so ist festzustellen, daß die gesamte Familie von einer ausgeprägten Heterotrophie geprägt ist (Frick 1994).

Ein aktueller Überblick über die Familie der *Lemnaceae* ist in Abbildung 1 dargestellt.

**Lemnoideae***Spirodela*Sect. *Spirodela**S. intermedia**S. polyrrhiza*Sect. *Oligorrhizae**S. punctata**Lemna*Sect. *Lemna**L. gibba**L. dispema**L. japonica**L. obscura**(L. ecuadoriensis)*<sup>5</sup>*L. turionifera*Sect. *Hydrophylla**L. trisulca*Sect. *Alatae*<sup>7</sup>*L. perpusilla**L. aequinoctialis*Sect. *Biformes*<sup>7</sup>*L. tenera*Sect. *Uninerves**L. valdiviana**L. minuscula*<sup>6</sup>*L. yungensis*<sup>3</sup>**Wolffioideae***Wolffiella*Sect. *Stipitatae**W. hyalina**W. repanda*Sect. *Rontundae**W. rotunda*Sect. *Wolffiella**W. neotropica**W. welwitschii**W. lingulata**W. gladiata**W. denticulata**W. caudata*<sup>2</sup>*Wolffia*Sect. *Pseudorrhizae**W. microscopica*Sect. *Elongatae**W. elongata*Sect. *Pigmantatae**W. borealis*Sect. *Wolffia**W. angusta**W. arrhiza**W. columbiana**W. globosa**W. neglecta*<sup>4</sup>*W. cylindracea*<sup>4</sup>*W. brasiliensis*<sup>1</sup>

## Sect. (unbenannt)

*W. australiana*<sup>1</sup>**Abb. 1) Überblick über die Subfamilien, Gattungen, Sektionen und Spezies der *Lemnaceae***

Verändert nach Landolt und Kandeler 1987

- 1 Les *et al.* (2002) zufolge gehört *W. brasiliensis* nach genetischen Untersuchungen der *matK*-Sequenz nicht zu der Gattung *Wolffia*, sondern vielmehr zur Gattung *Wolffiella*. Da andere Parameter jedoch nicht für diese Zugehörigkeit sprechen, verbleibt *W. brasiliensis* in der Sektion

- und dem Genus *Wolffia*. Darüber hinaus sind die Autoren der Ansicht, daß *Wolffia australiana* keiner der Sektionen zuzuordnen ist und daher eine eigene (bislang unbenannte) Sektion darstellt.
- 2 Landolt (1992) beschreibt die neue Spezies *Wolffiella caudata*.
  - 3 Landolt (1998) beschreibt die neue Spezies *L. yungensis* aus Bolivien als zur Sektion *Uninerves* zugehörig.
  - 4 Landolt (1994) beschreibt erstmals, daß die Sektion *Wolffia* der Gattung *Wolffia* aus sieben Spezies, darunter *W. neglecta* und *W. cylindracea* bestehen.
  - 5 *L. equadoriensis* aus der ersten Klassifizierung (Landolt und Kandelar 1987) wird nach jüngerer Klassifizierung (Landolt 1999) als *L. obscura* beschrieben.
  - 6 Eine aktuelle Bezeichnung für *L. minuta*.
  - 7 Crowford *et al.* (2001) bestätigen die Einteilung und Abgrenzung der Sektionen *Alatae* und *Biformis* durch genetische Untersuchungen.

Das Ursprungszentrum dieser 1-10 mm großen, hochvakuolisierten Wasserpflanzen liegt im tropischen bis subtropischen Südamerika, von wo aus sie sich weltweit verbreiteten. Heute sind sie in Frischgewässern in allen klimatischen Zonen (ausgenommen der Arktik- und Wüstenzonen) zu finden. Lemnaceen leben freischwimmend, z. T. auch submers und vermehren sich meist vegetativ durch die Bildung von Tochterpflanzen, auch Fronds genannt. Diese Fronds werden schon in zweiter bis dritter Generation in der Mutterpflanze angelegt, so daß eine ausgewachsene Pflanze bereits ihre eigene Tochter-/Enkel- und Urenkelgeneration beherbergt. Eine generative Vermehrung der kleinsten bekannten Blütenpflanze der Welt ist je nach Klima als selten zu betrachten und konnte z. B. bei der Gattung *Wolffia* im Freiland in mitteleuropäischen Breiten noch nicht beobachtet werden (Augsten 1984). Die Wachstumsrate wird mit der Verdopplung der Biomasse in 24 Stunden beschrieben (Kapitel 4.1.2). Auch ein Vier-Phasen-Modell, unterteilt in lag-Phase, exponentielle Wachstumsphase, Transit-Phase und Equilibrierungsphase ist bekannt und bezieht sich auf optimale Medien- und Umweltbedingungen ([www.mobot.org](http://www.mobot.org)).

Bei widrigen Umständen (Kurztag, Nährstoffmangel, Kälte, Trockenheit) bilden fast alle Lemnaceen Überdauerungsstadien aus, die Turionen. Diese sind sehr viel kleiner (0,1-0,5 mm) als die adulten Pflanzen und können nach dem Absinken am Grund der Gewässer oder im ausgetrockneten Wasserbett mehrere Jahre überdauern (Landolt 1997). Die Überdauerungsstadien werden nach Appenroth (1993) durch Abscisinsäure nach ursächlichem Nährstoffmangel oder bei zu großer Populationsdichte induziert. Es erfolgt somit auch eine natürliche Synchronisation der Population (Saks *et al.* 1980). Turionen werden ebenfalls gebildet, nachdem eine Pflanze ihr „vegetatives Potential“ nach 8-12 Generationen aufgebraucht hat (Landolt 1986). Eine anschließende generative Phase ist somit nicht zwingend notwendig, denn der vegetative Zyklus setzt sich aus den Turionen heraus erneut für 8-12 Generationen fort. Exemplarisch dargestellt sind einige Vertreter der Lemnaceen (Abbildung 2).

1) *Lemna gibba*2) *Spirodela polyrhiza*3) *Wolffia gladiata*4) *Wolffia columbiana*5) *W. australiana***Abb. 2) Die Phänotypen von Vertretern der Lemnaceen**

### 1.4.1 Die Gattung *Wolffia*

Die Gattung *Wolffia* besteht aus fünf Sektionen, die insgesamt elf Spezies beinhalten. Die Einzelpflanzen jeder Spezies sind auf ein grünes Blatt reduziert. Die Anzahl der Stomata ist speziesabhängig und variiert zwischen 0-100. *Wolffia* besitzt keine Wurzeln und ist im Gegensatz zu fast allen anderen Lemnaceen-Vertretern ausnahmslos in der Lage, submers zu leben. Man findet *Wolffia* meist im Verband von zwei Fronds (Mutter- und Tochterfrond). Pflanzen der Gattung *Wolffia* haben ein Temperatur-Spektrum von 18–28 °C mittlerer Tagestemperatur für optimales Wachstum. Unter- oder oberhalb dieser Temperaturen haben sie eine verlängerte Generationenfolge und/oder bilden Turionen. *Wolffia*-Pflanzen sind in Gebieten gefunden worden, in denen Winter-Temperaturen von bis zu –40 °C keine Seltenheit sind und in denen sommerliche Temperaturen vorherrschen, die tropischem Klima entsprechen. Das pH-Spektrum, in dem *Wolffia* gedeiht, reicht von 3,5 bis 10,4 (Landolt 1986, Kapitel 4.1.3). Eine reine Ammonium-Ernährung (gänzlich ohne Nitrat) ist für wurzellose Teichlinsen auf Dauer tödlich (Appenroth 1993). *Wolffia* weist den für

Lemnaceen typischen hohen Proteingehalt von 30 % Trockenmasse (TM) ebenso auf wie eine besondere, hochverzweigte Zuckerverbindung, die neben Cellulose einer der Hauptbestandteile der Zellwand ist: Apiose (Landolt 1986). Der Apiose verdankt *Wolffia* vermutlich die relative Unempfindlichkeit gegenüber äußeren Faktoren sowie eine hocheffiziente Pathogenabwehr (Landolt 1986).

### 1.5 Anwendungsgebiete für Lemnaceen

Neben der Grundlagenforschung im Stärkeabbau (Fujita *et al.* 1999, Appenroth *et al.* 2002) finden sich Lemnaceen in heutiger Zeit bereits in vielfältigen Anwendungsgebieten wie Biosensorik (Fairchild *et al.* 1997, Iso 2001, Brain *et al.* 2004), Chromatographie (Appenroth und Augsten 1996) und Entgiftung von Schmutzwasser (Cully und Epps 1973). Bei letzterem spielt insbesondere die Fähigkeit zur Schwermetallakkumulation eine bedeutende Rolle (Appenroth 1993, Huebert *et al.* 1993). Wasserlinsen können konventionelles Tierfutter ohne Leistungsverlust ganz bzw. teilweise ersetzen (Cully und Epps 1973, Hillmann und Cully, 1978; Cully *et al.* 1981, Hamid *et al.* 1993, Anh und Preston 1997), und Lemnaceen sind sogar Bestandteil menschlicher Ernährungsprogramme (Augsten 1984, Appenroth und Augsten 1996).

Dieses breit gefächerte Anwendungsspektrum verdanken die Lemnaceen einigen ihrer Besonderheiten: Sie sind sehr reich an vielen wertvollen Aminosäuren und beinhalten bis zu der doppelten Menge dessen, was von der Food and Agriculture Organization (FAO) als Norm für gesunde Ernährung festgeschrieben wurde. Hierbei sind die Aminosäuren Lysin, Threonin, Valin, Leucin und Phenylalanin sowie die Vitamine E und PP (Nicotinamid) besonders zu erwähnen (Rusoff *et al.* 1980, Appenroth *et al.* 1982, Appenroth und Augsten 1996). Der geringe Rohfaseranteil begründet eine sehr gute Verdaulichkeit der Wasserlinsen. Zudem enthalten Lemnaceen durchschnittlich je 30 % TM Protein und Kohlenhydrate, wobei sich der Proteingehalt (z. B. durch großen Ammoniumsalzanteil bei der Ernährung) auf bis zu 45 % TM steigern läßt. Zur Erzeugung der gleichen Proteinmenge wird somit nur ca. 1/10 der Anbaufläche unserer Haupt-Eiweißpflanze Soja benötigt, als vergleichsweise mit Wasserlinsen (Appenroth und Augsten, 1996). Deren Produktionsleistung wird mit zehn Tonnen pro Hektar und Jahr angegeben (Bhanthumnavin und McGarry 1971). In einer Pflanze, die nativ einen sehr hohen Proteingehalt aufweist, scheint die biotechnologische Produktion von Proteinen äußerst effizient und sinnvoll.

In jüngster Vergangenheit wird daher evaluiert, inwieweit Lemnaceen als Expressionssystem für Proteine herangezogen werden können.



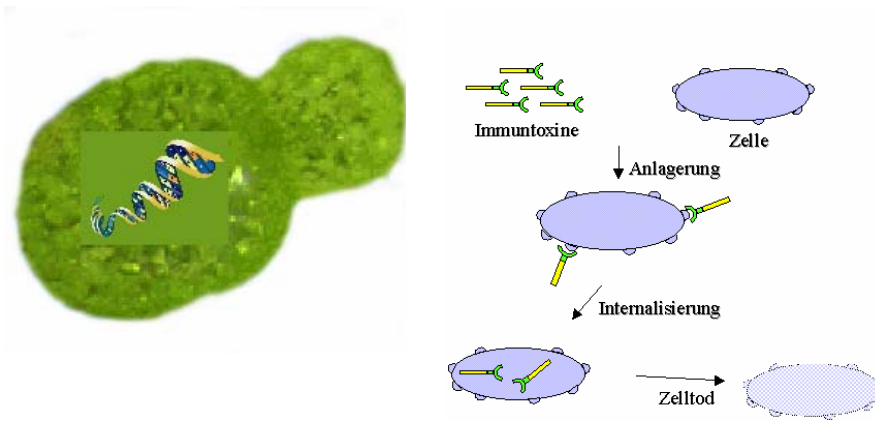
## 1.6 Lemnaceen als Expressionssystem

Die vielen beschriebenen Vorteile sprechen dafür, Pflanzen als Expressionssysteme weiter zu erforschen und zu optimieren. Hierbei stehen neben der prinzipiellen Eignung der jeweiligen Pflanze die ökonomischen Faktoren wie Erhaltungs- und Produktionskosten sowie arbeitsexensive und platzsparende Systeme im Vordergrund. Als photoautotrophe Pflanzen sind Wasserlinsen im Gegensatz zur pflanzlichen oder tierischen Zellkultur vergleichsweise anspruchslos gegenüber dem Kultivierungsmedium (Boehm *et al.* 2001, Kruse *et al.* 2002, Gadaska 2003). Lemnaceen mit der Fähigkeit zur submersen Lebensweise können als gentechnisch veränderte Organismen (GVO) in einem Bioreaktor kultiviert werden. Unabsehbare Effekte im Freiland wie z. B. Auskreuzung eines GVOs mit Wildarten sind damit auszuschließen.

Einige Vertreter der *Lemnaceae* sind bereits auf ihre Eigenschaften, die die Voraussetzungen für ein Expressionssystem darstellen, untersucht worden. Hierzu gehören *L. gibba* (Moon und Stomp 1997, Stefaniak *et al.* 2003) und *L. minor* (Moon und Stomp 1997), für die eine Kallusinduktion und nachfolgende Regeneration beschrieben wurde. Ebenso dokumentieren Li *et al.* (2004) ein Kallusinduktionsprotokoll für *Spirodela*. Ein Kallustransformationsprotokoll durch Agrobakterien beschreiben darüber hinaus Yamamoto *et al.* (2001) für *L. gibba* und *L. minor*. Nach Gadaska (2003) sind in *Lemna* bis heute schon zwölf Proteine, darunter kleine Peptide, Fab-Fragmente (Bindungsdomänen von Antikörpern), monoklonale Antikörper und große multimere Enzyme nach dem Yamamoto-Protokoll produziert worden. Für *W. columbiana* konnten jeweils transiente Transformationen durch Injektion von Agrobakterien (Boehm unpub. Daten), Particle Bombardment (Kruse *et al.* 2002) und durch Infiltration von Agrobakterien (Boehm *et al.* 2001) im GUS-Reportersystem nachgewiesen werden.

## 1.7 *Wolffia* als Expressionssystem für Immuntoxine

Das übergeordnete Projektziel ist die stabile Transformation von *Wolffia*-Pflanzen mit einem Immuntoxin. Das Hauptaugenmerk soll dabei auf Single-Chain-Antikörper (scFv), die gegen typische Repräsentanten der Oberflächenproteine (CD 25, CD 30) von Hodgkin-Lymphomzellen gerichtet sind, gelegt werden. Als Toxinanteil sollen Ricin, Angiogenin bzw. Granzym B verwendet werden. Prinzipiell kann jedoch jede beliebige Genkassette zur Expression in *Wolffia* eingefügt werden, sofern ein stabiles Transformationsprotokoll vorliegt. Ferner soll die Protein-Expression im geschlossenen Bioreaktor stattfinden, wobei das Expressionsprodukt idealerweise sekretorisch ins Medium abgegeben wird. Der prinzipielle Vorgang der Immuntoxinproduktion und die Wirkungsweise dieser Proteine an einer Krebszelle sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abb. 3) Schematische Darstellung der Immuntoxinproduktion in *Wolffia* und die Wirkungsweise dieser Proteine am Beispiel einer Krebszelle**

Verändert nach C. Kruse und S. Becker (unveröffentlicht)

*Wolffia* bietet die Möglichkeit, platzsparend - da viel Biomasse pro Volumen - und kostengünstig Proteine produzieren zu können. Die Fähigkeit, submers zu überleben ist bei den beiden bereits transformierten Vertretern aus der Gattung *Lemna* nicht gegeben. Zudem sind *Wolffia*-Pflanzen durch ihre kugelige Form und Wurzellosigkeit unempfindlicher gegenüber mechanischer Beanspruchung, die sich in einem Biofermenter nicht vermeiden läßt. Als pflanzliches Expressionssystem empfiehlt sich *Wolffia* durch folgende Parameter:

- a) schnelles vegetatives Wachstum,
- b) hohen nativen Proteingehalt,
- c) relativ einfache und damit kostengünstige Kulturbedingungen,
- d) genetische Stabilität durch Verwendung einer ganzen Pflanze,
- e) platzsparende Vermehrungsmöglichkeit durch submerse Lebensweise,
- f) kontrollierbare Bedingungen durch ein in sich geschlossenes Fermentationssystem,
- g) keine notwendige Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen ins Freiland.

### 1.8 Ziele dieser Arbeit

Die Wasserpflanze *Wolffia* aus der Familie der *Lemnaceae* ist ein Eukaryot, der über einen äußerst hohen Proteingehalt und einen schnellen Biomassezuwachs verfügt. Zudem sind diese Pflanzen in der Lage, submers zu leben, wodurch optimale Volumenausnutzung im geschlossenen Bioreaktor gegeben ist. Eine Freisetzung genetisch veränderter Organismen (GVO) ist zu keiner Zeit notwendig. Für autotrophe Pflanzen sind die Kultivierungsbedingungen gegenüber tierischen und humanen Zellkulturen als weitaus ökonomischer einzustufen; zudem besteht kein humanpathogenes Potential (Stoger und Perrin 2003). Denkbar ist, daß die transgenen Pflanzen das Molecular-

Pharming-Produkt direkt ins umgebende Medium sekretieren, wodurch eine kostenintensive Aufarbeitung überflüssig würde. Zusammenfassend kann *Wolffia* nach biologischer und ökonomischer Betrachtung als ein konkurrenzloses Expressionssystem für komplexe Proteine, wie z. B. Immuntoxine, eingestuft werden.

Gegenstand dieser Arbeit ist deshalb:

- 1.) Feststellung eines geeigneten Mediums für alle zwölf verfügbaren *Wolffia*-Stämme, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten
- 2.) Ermittlung der Wachstumsrate einer Laborkultur
- 3.) Bestimmung von meßbaren Vitalitätsparametern, um die jeweilige Fitness einer Pflanzenkultur beurteilen zu können
- 4.) Auswahl von maximal drei geeigneten *Wolffia*-Spezies (bzw. -Klonen) für nachfolgende Versuche
- 5.) Erzeugung und Erhaltung von vitalen Sterilkulturen mit klonalem Charakter als Ausgangsmaterial
- 6.) Transformation, Selektion und molekularbiologischer Nachweis der Transformanten
- 7.) Entwicklung eines geeigneten Fermentationssystems, das folgende Bedingungen erfüllen soll:
  - optimale Wachstumsbedingungen
  - Vitalitätssicherung der Pflanzen
  - bestmögliche Volumenausnutzung unter Berücksichtigung submers lebender Pflanzen
  - einfache Handhabung der Produkternte
  - unkompliziertes Upscaling
  - möglichst arbeitsextensive Pflege
  - integrierbare Meßmöglichkeit von Vitalitätsparametern (Monitoring).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Substanzen und Geräte

#### 2.1.1 Chemikalien

Die nachfolgende Tabelle enthält alle verwendeten Chemikalien und ihre Hersteller.

**Tab. 3) Liste verwendeter Substanzen und Chemikalien**

Substanz	Anbieter	Substanz	Anbieter
Acetosyringon (3',5'-Dimethoxy-4'-Hydroxyacetophenon)	Acros, B	Kinetin (6-Furfurylaminopurin)	Duchefa, NL
Agarose für Gele	Peqlab, Erlangen	Kobaltnitrat	Merck, Darmstadt
Ammoniumnitrat	Merck, Darmstadt	Kokosnußwasser	Sigma, Steinheim
Ammoniummolybdat	Sigma, Steinheim	Korund	Sigma, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim	Kupfersulfat	Fluka, Taufkirchen
Bactoagar	Difco, USA	Magnesiumdichlorid	Merck, Darmstadt
BAP (6-Benzylaminopurin)	Serva, Heidelberg	Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Beefextract	Difco, USA	Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Borsäure	Sigma, Steinheim	Mazerozym	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Biorad, München	MES	Duchefa, NL
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt	Mikroagar	Difco, USA
Calciumdinitrat	Merck, Darmstadt	MUG	Sigma, Steinheim
Caseinhydrolysat	Merck, Darmstadt	Murashige-Skoog-Salze/Vitamine	Duchefa, NL
CHU-Salze/Vitamine	Duchefa, NL	NAA (Naphthyllessigsäure)	Sigma, Steinheim
CO <sub>2</sub> -Tablette (Sanoplant)	Dohse, Grafschaft	NaEDTA	Sigma, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G (250)	Serva, Heidelberg	Natriumhypochlorit	Brandt, Wertheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt	Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim	Natriummolybdat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt	Natriumdihydrogenphosphat	Sigma, Steinheim
Dinatriummolybdat	Merck, Darmstadt	Pepton	Difco, USA
DNA-Ladepuffer	Peplab, Erlangen	Phosphorsäure	AppliChem, Darmstadt
DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen	Phytoagar	Difco, USA
DNase	Fermentas, Rot	Potato-Dextrose-Agar	Sigma, Steinheim
dNTPs	Amersham Pharmacia, Freiburg	R2A-Agar	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe	RNase-Inhibitor	Fermentas, Rot
Eisensulfat	Merck, Darmstadt	Saccharose	Difco, USA
Eisenchlorit	Merck, Darmstadt	Schenk- & Hildebrandt-Salze/Vitamine	Duchefa, NL
Ethanol	AppliChem, Darmstadt	Silwet L-77	OSI, CH
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim	Soytone	Duchefa, NL
Essigsäure	Roth, Karlsruhe	Standard-Medium	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt	Taq-Polymerase (Puffer + MgCl <sub>2</sub> )	Ampliqon, KMF, Lohmar
Glycin	Roth, Karlsruhe	TrisHCl	Merck, Darmstadt
HCl	Roth, Karlsruhe	Triton-X-100	Sigma, Steinheim
Hefeextrakt	Difco, USA	Trypton	Difco, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt	Tween 20	ICN, USA
Kaliumacetat	Sigma, Steinheim	Weinsäure	Merck, Darmstadt
Kaliumferricyanid	Sigma, Steinheim	X-Gluc	BioTech Trade & Service GmbH,

		(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid)	USA
Kaliumferrocyanid	Sigma, Steinheim	Zinksulfat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt		

### 2.1.2 Verwendete Antibiotika

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Antibiotika und deren Hersteller aufgelistet.

**Tab. 4) Liste verwendeter Antibiotika**

<b>Fungistatika</b>	<b>Hersteller</b>
Amphotericin N	Duchefa, Niederlande
Nystatin N	Duchefa, Niederlande
Rovral (Wirkstoff: Iprodion)	Aventis, Deutschland
Tebuconazol	Pentol, Deutschland
<b>Bakteriozide</b>	
Ampicillin	Applichem, Deutschland
Cefotaxim	Duchefa, Niederlande
Ciprofloxacin	Duchefa, Niederlande
Doxycyclin	Duchefa, Niederlande
Hygromycin B	Duchefa, Niederlande
Ofloxacin	ICN Biomedicals, USA
Penicillin G Sodium	Duchefa, Niederlande
Piperacillin	Duchefa, Niederlande
Rifampicin	Merck, Deutschland
Streptomycin	Merck, Deutschland
Tetracyclin	Duchefa, Niederlande
Ticarcillin/Clavulanic Acid (Timentin)	Duchefa, Niederlande
Vancomycin HCl	Duchefa, Niederlande
<b>Andere</b>	
Plant Preservative Mixture	PTC, USA

### 2.1.3 Geräteliste

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Geräte und deren Hersteller aufgelistet.

**Tab. 5) Liste der verwendeten Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Anbieter</b>
Autoklav	- Laboratory Vertical Steam Sterilizer, Tuttnauer Systec, Breda (Niederlande)
Binokular	- Model MMN-1 Olympus, Tokyo (Japan)
Brutschrank	- ET 6130, Heraeus, Düsseldorf
Cell-Scan	- ICB, Münster
Exsikkator	- Kartell, Italien
Fluorometer	- SPEX, Fluoro Max
Gasbrenner	- Flameboy sensor, Tecnomara AG, Wallisellen (Schweiz)
Gelkammer	- Gel Electrophoresis Apparatus GNA-1000, Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden) - Sub-Cell <sup>®</sup> Model 192 Agarose Gel Electrophoresis Systems, Bio-Rad, Hercules (USA)
Mikroskope	- Lichtmikroskop Leitz - Fluoreszenzmikroskop Nikon TE 300
Mikrowelle	- Micromat, AEG, Nürnberg
PAM-2000	- PAM-2000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich
Photometer	- SmartSpec <sup>™</sup> 3000 Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules (USA)

Phytoinkubatoren	- Licht-Thermostat Typ 1201, RUMED Rubarth Apparate GmbH, Laatzen - Licht-Thermostat, Percical, London (England) - Phytokammer, York (England)
pH-Meter	- inoLab pH Level 1, WTW GmbH, Weilheim
Pumpen	- 120000D1 230V, 50 Hz, WISA, Wuppertal - 323 U/RL + Kopf 501 RL, Watson-Marlow, Rommerskirchen
Power-Supply	- Model 1000/500 Power Supply, Bio-Rad, Hercules (USA) - Power Pac 300 Bio-Rad, Hercules (USA)
Scanner	- Flachbett Duoscan, Agfa
Schüttler	- Schüttelinkubator 3031, GFL mbH, Burgwedel - Kombination Certomat <sup>®</sup> , R + Certomat <sup>®</sup> HK, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen
Sterilbank	- Holten Safe 2010 / Maxi Safe 2010, Heto-Holten A/S, Allerød (Dänemark) - HF 72, Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim
Sterilfilter	- Express Plus, Millipore, Bedford (UK)
Thermocycler	- iCycler Bio-Rad, Hercules (USA) - Genius Model FGN02TD, Techne, Cambridge (UK)
Ultraschallbad	- Bandelin Souvrex RK 100
UV-Lampe	- UV-Kontaktlampe Chroma 43, Kurt Migge GmbH Laborbedarf, Heidelberg
Vakuumpumpe	- Membran-Vakuumpumpe ME 4 R, Vacuubrand GmbH + Co, Wertheim
Vortexer	- Vortex-Genie Bender & Hobein AG, Zürich (Schweiz)
Waagen	- PG 503-S DeltaRange <sup>®</sup> , Mettler Toledo, Greifensee (Schweiz) - Elektronische Präzisionswaage KERN 770/GS/GJ, Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Wasserbad	- Typ 3047, Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen
Zentrifugen	- Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg - Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg - Tischkühlzentrifuge 1K15, Sigma, Osterode - Biofuge 22R, Heraeus-Sepatech, Düsseldorf - Biofuge 13, Heraeus-Sepatech, Düsseldorf

## 2.2 Pflanzenmaterial

Die verwendeten Lemnaceen-Spezies (Tabelle 6) stammten mit zwei Ausnahmen ausschließlich aus der Sammlung von Prof. Dr. Elias Landolt, der die zur Verfügung gestellten Proben auf 1/10-Hutner-Festmedium in Schrägagarröhrchen kultivierte.

**Tab. 6) Herkunft der verwendeten Pflanzen**

Prof. Dr. Elias Landolt, ETH Zürich, Zürichbergstraße 38, 8044 Zürich, Schweiz  
 Prof. Dr. Jitendra Khurana, Dep. of Plant Molecular Biology, University of Delhi, India  
 Dr. Dirk Voeste, Berliner Platz 11, 67117 Limburgerhof, Deutschland

<i>Wolffia</i> -Spezies + Stamm	Herkunftsort	in Kultur seit	erhalten von
<i>W. angusta</i> 7274	Newcastle, Australien	1970	E. Landolt
<i>W. arrhiza</i> 7193	Masaka, Uganda	1968	E. Landolt
<i>W. arrhiza</i> 8272	Deutschland	1999	D. Voeste
<i>W. australiana</i> 7211	Melbourne, Australien	1969	E. Landolt
<i>W. borealis</i> 9143	New York, USA	1994	E. Landolt
<i>W. brasiliensis</i> 7303	Aragua, Venezuela	1970	E. Landolt
<i>W. columbiana</i>	Deutschland	1999	D. Voeste
<i>W. cylindracea</i> 9056	Urungwe, Afrika	1992	E. Landolt

<i>W. elongata</i> 9188	Atlantico, Columbien	1995	E. Landolt
<i>W. globosa</i> 6592	Stanislaus, USA	1953	E. Landolt
<i>W. microscopica</i>	Indien	nicht bekannt	J. Khurana
<i>W. neglecta</i> 8917	Karachi, Pakistan	1980	E. Landolt
<b><i>Lemna</i></b>			
<i>L. minor</i> 7195	Coruche, Portugal	nicht bekannt	E. Landolt

Bei den verwendeten Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) handelte es sich um die Sorte Petit Havana „SR1“, die von Prof. Dr. Schöffl, Universität Tübingen als Samen bezogen wurden.

## 2.3 Technische Parameter

### 2.3.1 Einstellungen der Phytokammer und Kulturschränke

#### Einstellungen der Phytokammer (York)

Licht/Dunkelrhythmus (Lichtintensität: ca. 2000 lux):

15 min Licht Stufe 1 (Vorglühen der Lampen nach Empfehlung des Herstellers)

5 h 45 min Licht, Stufe 1

2 h Dunkel, Stufe 0

15 min Licht, Stufe 1

7 h 45 min Licht, Stufe 1

8 h Dunkel, Stufe 0

Temperatur: 25 °C

Luftfeuchte: 70 %

#### Einstellungen Rumed-Kulturschrank

Licht/Dunkelrhythmus (Lichtintensität: 7500-9000 lux): 12/12 h

Temperatur: 24 °C

Luftfeuchte: nicht aktiviert

#### Einstellungen Percival-Kulturschrank

Licht/Dunkelrhythmus (Lichtintensität: 6500-8500 lux): 14/10 h

Temperatur: Lichtphase: 23 °C; Dunkelphase: 14 °C

Luftfeuchte: nicht aktiviert

### 2.3.2 PCR-Programm und Primer

#### PCR-Programm (Techne)

5 min 95 °C  
32 Zyklen:  
    1 min 95 °C  
    2 min 64 °C  
    1 min 72 °C  
10 min 72 °C

#### Primer

GUS-for: ATG TTA CGT CCT GTA GAA AC

GUS-rev: CCT CAC TGC CAC TGA CCG GA

PicA-for: ATG CGC ATG AGG CTC GTC TTC GAG

PicA-rev: GAC GCA ACG CAT CCT CGA TCA GCT

Rubisco-for (*W. australiana*): CTG GAT TCA AAG CTG GTG TTA AA

Rubisco-rev (*W. australiana*): CAT TTG CAA GCT TCA CGG ATA AT

Rubisco-for (*W. brasiliensis*): CTG GAT TCA AAG CTG GTG TTA AA

Rubisco-rev (*W. brasiliensis*): CAT TTG GCA GCT TCA GCC ATA AC

### 2.4. Medien und Lösungen

Alle Medienangaben beziehen sich auf einen Liter. Alle Flüssigmedien sind nach dem Autoklavieren zusätzlich sterilfiltriert worden, um einen Ausfall von Derivaten zu vermeiden. Das Autoklavieren erfolgte bei allen Medien und Lösungen für 15-20 Minuten bei 121 °C. Vitamine und/oder Antibiotika sind nach dem Abkühlen hinzugegeben worden.

#### Bradford-Lösung

100 mg Coomassie Brilliant Blue G (250)

100 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %ig)

50 ml EtOH

über Nacht abgedunkelt rühren und mit demin. Wasser auf einen Liter auffüllen, filtrieren.

Dunkel aufbewahren.



Hutner-Medium (nach Hutner 1953)

400 mg  $K_2HPO_4$

500 mg EDTA

200 mg KOH

200 mg  $NH_4NO_3$

352 mg  $Ca(NO_3)_2 \times 4 H_2O$

500 mg  $MgSO_4 \times 7 H_2O$

17,9 mg  $MnCl_2 \times 4 H_2O$

65,9 mg  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$

3,95 mg  $CuSO_4 \times 5 H_2O$

14,2 mg  $H_3BO_3$

25,2 mg  $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$

0,2 mg  $Co(NO_3)_2 \times 6 H_2O$

24,9 mg  $FeSO_4 \times 7 H_2O$

pH 6,0 HCl

für Festmedium: 7 g Mikroagar

CHU-Medium (nach Chu *et al.* 1975)

3,952 g CHU-Mineralstoffe

1.0 g CHU-Vitamine, sterilfiltriert

pH 6,0 KOH

für Festmedium: 7 g Mikroagar

CPS (Merck)

0,5 g lösliche Stärke

0,5 g Pepton

0,5 g Caseinhydrolysat

1 ml Glycin

0,2 g  $KH_2PO_4$

0,05 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$

4 Tropfen 0,01 % (v/v)  $FeCl_3 \times 6 H_2O$

für Festmedium 15 g Mikroagar

pH 6,9

Detection-Medium (DM; Beine, persönliche Mitteilung)

15 g Pepton

3 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

5 g Glucose

in 1/10 Hutner lösen

pH 7, für Festmedium 10 g Microagar

Extraktionspuffer für die DNA-Isolierung aus *Wolffia*

100 mM Tris, pH 8

50 mM EDTA

500 mM NaCl

10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)

Extraktionspuffer für die Protein-Isolierung aus *Wolffia*

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10 mM EDTA

10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

0,2 % Tween 20

pH 7

Growth-Medium (nach Bowker *et al.* 1980)

$2 \times 10^{-4}$  M Ca<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O

$1 \times 10^{-3}$  M KHPO<sub>4</sub>

$2 \times 10^{-4}$  M MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

$2 \times 10^{-5}$  M KCl

1 ml Trace elements (170 mg/l MoO<sub>3</sub>, 550 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2205 mg/l EDTA (freie Säure), 30 mg/l ZnSO<sub>4</sub>, 180 mg/l MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 550 mg/l FeCl<sub>3</sub>, 15 mg/l CoCl x 6 H<sub>2</sub>O, 2,5 mg/l CuCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 100 mg/l Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>)

pH 6,8

GUS-Färbelösung

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

10 mM NaEDTA

0,5 mM Kaliumferricyanid

0,5 mM Kaliumferrocyanid

0,1 % (v/v) Triton-X 100

aufbewahrt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

1 mM X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glycopyranosid) frisch zugesetzt

#### Infiltrationsmedium

MS-Medium

2 % (w/v) Saccharose

10 mM MES

+ 200  $\mu\text{M}$  Acetosyringon (frisch zugesetzt)

#### Kallus-Medien (Induktion und Erhaltung)

Siehe Tabelle 18

#### LB-Medium (nach Sambrook & Russell 2001)

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

pH 7,0

für Festmedium 15 g Bacto-Agar

#### LM-Medium (nach Landolt, persönliche Mitteilung)

0,6 g MES

0,6 g Caseinhydrolysat (vitaminfrei)

0,1 g Hefeextrakt

in 1/10-Hutner-Medium

pH 5,9

5 g Phytoagar für Festmedium

#### MS-Medium (Murashige & Skoog 1962)

4,3 g MS-Salze

1,03 g MS-Vitamine

30 g Saccharose

pH 5,7 KOH

für Festmedium 10 g Microagar

MUG-Lösung

1 mM MUG

20 % (v/v) Methanol

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10 mM EDTA

10 mM β-Mercaptoethanol

0,2 % Triton X-100

pH 7

PDA (Potato Dextrose Agar, Merck Handbuch Mikrobiologie)

39 g Potato Dextrose Agar

nach dem Autoklavieren pH 3,5 mit 14 ml steriler 10 %iger (w/v) Weinsäure einstellen

SH-Medium (Schenk-& Hildebrandt-Medium, Schenk und Hildebrandt 1971)

3,2 g SH-Salze

1 g SH-Vitamine, sterilfiltriert

pH 6,0 KOH

für Festplatten 7 g Microagar

SHI-Medium (nach Horsch *et al.* 1985)

4,6 g MS-Salze

30 g Saccharose

0,5 g MES

pH 5,7

7 g Microagar für Festmedium

nach dem Autoklavieren: + 1 mg BAP und 0,1 mg NAA

Stopplösung

0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

50x-TAE-Puffer

242 g TrisHCl

57,1 g Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

ad 1 Liter demin. H<sub>2</sub>O

TSA (Tryptone-Soja-Agar)

15 g Trypton (pankreas-verdaut)

5 g Soytone (Sojabohnenmehl)

5 g NaCl

pH 7,3

15 g Microagar

YEB-Medium (nach Vervliet *et al.* 1975)

5 g Beefextrakt

1 g Hefeextrakt

5 g Pepton

5 g Saccharose

pH 7,2 bzw. 5,6 KOH

für Festmedium 15 g Bactoagar

+ 5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> (steril nach dem Autoklavieren dazugeben)

## **2.5 Medienversuche für *Wolffia*-Pflanzen**

Zur Identifizierung des Mediums, welches für die jeweilige Spezies optimale Wachstumsbedingungen gewährleistet, wurden in folgender Weise Vorkulturen angelegt. Die Pflanzen wurden mit einer sterilen Pinzette vorsichtig aus dem Originalröhrchen in verschiedene, aus der pflanzlichen Zell- und Gewebekultur bekannte Kulturmedien (1/10-Hutner-Medium, Schenk- & Hildebrandt-Medium (SH), CHU-Medium, Landolt-Medium (LM), LM + 1 % (w/v) Saccharose, Kapitel 2.4) in 6-Well-Platten mit je 10 ml Mediumvolumen pro Well überführt. Nach einer, zwei und vier Wochen wurde anhand einer einfachen optischen Beurteilung ein Medium ausgewählt, welches für die jeweilige *Wolffia*-Spezies geeignet schien. Pflanzen der Landolt-Sammlung sind zudem auf das jeweilige Festmedium in Petrischalen (Sterilin) überführt worden, um eine keimarme Backup-Kultur (Percival, Kapitel 2.3.1) zu erhalten.

Der Medientest wurde für alle Spezies anhand einer optischen Bonitur vorgenommen, die z. T. durch digitale Bilder dokumentiert wurde. Diese Aufnahmen dienten zugleich dazu, den gemessenen Yield-Wert (Kapitel 2.9) und die optischen Beobachtungen miteinander korrelieren zu können.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* zusätzlich auf Growth-Medium (GM; Bowker *et al.* 1980) getestet (Kapitel 2.13).

## 2.6 Unsterile Dauerkulturen in Aquarien

Um eine möglichst pflegeextensive und vitale Vermehrungskultur zu etablieren, wurden *Wolffia*-Pflanzen in 40-Liter-Glas-Aquarien in einem Mischungsverhältnis Leitungswasser und demineralisiertem Wasser (Elga-Anlage) von 1:1 kultiviert (Abbildung 4). Um die Pflanzen keinen großen Temperaturschwankungen auszusetzen, betrug die Endtemperatur des zugegebenen Wassers 25 °C. Als Zusätze wurden ein Süßwasserpflanzendünger (Amtra) und Torfextrakt (Serva) nach Angaben des Herstellers zur Regulierung des pH-Wertes verwendet. Der pH-Wert dieses Aquariumwassers lag je nach aktueller Wasserqualität der Wahnbachtalsperre zwischen 6,8 und 7,2 (Lackmusstreifen, Merck). Weiterhin wurden folgende Parameter ermittelt: Die Gesamthärte betrug  $< 3$  °d, wobei die Carbonathärte im Bereich  $3 < x < 6$  gemessen wurde. Der Nitratgehalt ( $\text{NO}_3^-$ ) lag zwischen 0 und 10 mg/l, wohingegen kein Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) gemessen werden konnte. Der  $\text{CO}_2$ -Gehalt des Aquariumwassers differierte zwischen 2 und 6 mg/l; der Phosphat-Meßwert ( $\text{PO}_4^-$ ) lag konstant bei ca. 0,5 mg/l (Testsystem Amtra).

Die Einstellungen der Phytotronkammer (York, England) sind Kapitel 2.3.1 zu entnehmen. Die Lichtphase wurde nach sechs Stunden durch eine zweistündige Dunkelphase unterbrochen, um einem potentiellen Algenwachstum entgegenzuwirken ([www.fisheries.nsw.gov.au](http://www.fisheries.nsw.gov.au)).

Allen Aquarien wurden Süßwasserschnecken (*Physia fontinalis*) zugesetzt, um die Aquarienwände sauber zu halten. Zur Gewährleistung eines kontinuierlichen Gasaustausches und zur Vorbeugung von Kontaminationen durch Pilze und Algen wurde jedes Aquarium an eine Pumpe (Dohse) mit Aquarienwolle (Dohse) und Biopur (Serva) als Filtermaterial angeschlossen. Bei beginnender Trübung durch z. B. Algen wurde die Pumpe kurzzeitig an einen Diatomeenfilter (Dohse) angeschlossen. Der Wasserwechsel erfolgte 14-tägig durch einen aquarieneigenen Ansaugschlauch, wobei ein Restvolumen von ca. 10 l in den Aquarien verblieb. Für Wasserentnahme und Befüllung wurden je eigene Eimer verwendet, um eine Durchmischung der verschiedenen *Wolffia*-Spezies zu vermeiden.



Abb. 4) Unsterile Aquarien-Dauerkulturen von *Wolffia*

## 2.7 Sterilisation der Pflanzenkulturen

Für die Anlage steriler Pflanzenkulturen war es notwendig, ein Protokoll zu entwickeln, welches sämtliche Kontaminationen beseitigt, ohne jedoch die *Wolffia*-Pflanzen in ihrer Vitalität zu beeinflussen. Allen Versuchsansätzen ist folgende Prozedur gemein:

Die zu sterilisierenden Pflanzen wurden durch ein mit Miracloth (Calbiochem, USA) ausgelegtes, metallenes Haushaltssieb mit 8 cm Durchmesser (nachfolgend Miracloth-Sieb genannt, Abbildung 5) gegossen und die möglicherweise noch vorhandenen Schnecken entfernt. Das anschließende Spülen mit ca. 250 ml demineralisiertem Wasser diente zur ersten Verringerung der oberflächlichen Kontaminanten. Alle beschriebenen Schritte (Kapitel 2.7.1-2.7.7) wurden nachfolgend unter der Sterilbank (Holten, LaminAir) mit sterilen Utensilien durchgeführt. Für die Kontrolle des Dekontaminationserfolges dienten verschiedene Medien: Das Standard-Medium (ST; Merck) ist ein universeller Bakteriennähragar, an dessen Zusammensetzung das Detection-Medium (DM; Beine, persönliche Mitteilung) angelehnt ist. Es ist so modifiziert, daß es neben seinem wachstumsfördernden Effekt auf Bakterien ebenso für die kurzfristige Kultivierung von *Wolffia*-Pflanzen geeignet ist. Da weder ST- noch DM-Medium optimales Pilzwachstum gewährleisteten, ist zur Pilzkontrolle Kartoffel (Potato)-Dextrose-Agar (PDA, Merck) hinzugezogen worden. In die Flüssigkulturen wurde zur Überprüfung des Sterilisationserfolges 1 % Saccharose (w/v) hinzugegeben (Zuckertest). Der Test galt als bestanden, wenn nach drei Tagen keine erkennbare Trübung des Mediums sichtbar geworden war.



Abb. 5) Miracloth-Sieb

Während der gesamten Sterilisationsprozedur wurden die *Wolffia*-Pflanzen täglich einer Bonitur (Kapitel 2.8) unterzogen. Alle Kulturen, die für nicht ausreichend vital erachtet wurden, sind ohne Ausnahme 20 min bei 121 °C autoklaviert worden.

### 2.7.1 Behandlung der Pflanzen mit demineralisiertem Wasser, Ethanol, Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid

Um eine Verringerung der bakteriellen Kontamination durch Erzeugung osmotischen Druckes zu erreichen, wurden die vorbereiteten Pflanzen zehn Minuten in einer Petrischale oder einem 50-ml-Falcon-Gefäß (Greiner) in sterilem demineralisiertem Wasser gebadet und dabei regelmäßig leicht geschwenkt bzw. invertiert, bevor sie in ein Miracloth-Sieb abgegossen wurden. Anschließend wurden diese Pflanzen mit einem Spatel in kleine Häufchen zu ca. zehn Pflanzen auf Petrischalen mit Detection-Medium zur Kontaminationskontrolle gesetzt, diese mit Parafilm (Pechiney, USA) verschlossen und im Kulturschrank (Percival) bei einem Licht-/Dunkelrhythmus von 12/12 Stunden und 25 °C bis zu 21 Tage kultiviert.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden *Wolffia*-Pflanzen in 50- und 70 %igem (v/v) Ethanol (0,5/1/2/3/4/5 und 10 min), in 1,0/2,0 und 5,0 %igem Natriumhypochlorit (v/v) (30 sec/1 sowie 2 min) und 10/15 und 20 %igem (v/v) Wasserstoffperoxid (3 min) sowohl in einer Petrischale (leicht schwenkend) als auch alternativ in einem 50-ml-Falcon-Gefäß (invertierend), jeweils mit und ohne 0,002 % (v/v) Silwet L-77 als Detergenz, gebadet. Das Abgießen erfolgte jeweils durch ein neues Miracloth-Sieb, wobei die Pflanzen z. T. erneut mit ca. 250 ml demineralisiertem Wasser gespült wurden. Das Detergenz sollte durch die Herabsetzung der Oberflächenspannung dazu beitragen, auch die Taschen der Mutterfronds für das Sterilisationsmittel zugänglich zu machen. Anschließend erfolgte das Umsetzen der Pflanzen auf ST-Medium, DM und PDA. Zudem wurde der Versuch unternommen, ein auf Natriumhypochlorit basierendes Sterilisationsprotokoll für Lemnaceen nach Bowker *et al.* (1980) auf *Wolffia* anzuwenden. Das Protokoll sieht vor, Pflanzen einer NaOCl-Lösung auszusetzen, wobei eine definierte Anzahl Fronds in Minutenintervallen aus der Lösung entnommen wird. Es ist dokumentiert, daß 4 % der *Lemna*-Pflanzen überleben und nachhaltig erfolgreich steril kultiviert werden können. Die Abweichungen zum Originalprotokoll dieser Publikation waren wie folgt:

- Der pH-Wert wurde nicht mit Ammoniumhydroxid sondern mit Natronlauge eingestellt.
- Anstelle des Molybdäntrioxid wurde Ammoniummolybdat verwendet.
- Es wurde mit der Erstentnahme nicht gewartet, bis die Ränder der Pflanzen ausbleichten, sondern sofort nach der Überführung begonnen, die Pflanzen in 30-Sekunden-Intervallen aus der Lösung zu entnehmen.
- Es wurden 1/2 und 5 %ige (v/v) Natriumhypochlorit-Lösungen getestet.



Da eine Kontamination im Flüssigmedium erst spät erkannt werden kann, wurde die Kontaminationskontrolle auf Festmedium vorgenommen. Dies hatte den Vorteil, kontaminierte Pflanzen i. d. R. schon nach 2-3 Tagen von dekontaminierten separieren zu können.

Um die Effektivität verschiedener Dekontaminierungsschritte erhöhen oder sogar summieren zu können, wurden einige Versuche in Kombination angesetzt. So wurden Pflanzen, die zuvor 5 min 50 %igem Ethanol ausgesetzt waren, anschließend nicht ausschließlich auf DM, sondern ebenfalls auf PPM- und verschiedene Antibiotika-Festnährböden gesetzt (Kapitel 2.7.2 und 2.7.4).

### **2.7.2 Waschen und Kultivierung der Pflanzen in Plant Preservative Mixture (PPM)**

Das Waschen der Pflanzen in Plant Preservative Mixture (PPM) erfolgte wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben sowohl in Falcon-Tubes als auch in Petrischalen in 0,5/1/1,5/2/3/4/5/6/8/10/12/14 und 16 %iger (v/v) Lösung. Auch hier wurden die Pflanzen für die Kontaminationskontrolle auf DM überführt und wie beschrieben kultiviert (Kapitel 2.7.1). Ein weiterer Ansatz bestand aus der mehrtägigen Kultivierung der Pflanzen in einer 6-Well-Platte (Greiner) in je 10 ml Medium, welches eine Konzentration von 0,5/1/1,5/2/3 % (v/v) PPM enthielt. Eine Kontrolle ohne PPM diente als Referenz. Die Vitalitätsmessung erfolgte mit dem Fluoreszenzometer PAM-2000 (Schreiber *et al.* 1994, Kapitel 2.9).

### **2.7.3 Tests zur Antibiotika-Verträglichkeit von *Wolffia*-Pflanzen**

Bevor Versuche zur Sterilisation von *Wolffia*-Pflanzen mit Antibiotika begonnen werden konnten, mußten zunächst diejenigen Wirksubstanzen und die dazugehörigen Konzentrationen identifiziert werden, die keine letalen Schädigungen der Fronds bewirkten. Die Kultivierung der Pflanzen mit den verschiedenen Wirksubstanzen (Tabelle 4) erfolgte in mit Parafilm verschlossenen 6-Well-Platten mit je 10 ml Medium und 50-100 Pflanzen pro Well im Kulturschrank (Rumed, 2.3.1). Alle Antibiotika wurden erst nach dem Bestücken der Wells mit Pflanzen zugegeben. Die Fungizide Nystatin, Tebuconazol und Iprodion sowie die fungistatische Wirksubstanz Amphotericin wurden in einer Bandbreite von 1-1000 µg/ml getestet. Die Bakteriozide Ampicillin, Cefotaxim, Ciprofloxacin, Doxycyclin, Ofloxacin, Penicillin, Piperacillin, Rifampicin, Tetracyclin, Ticarcillin und Vancomycin sowie z. T. Mixturen aus diesen (Tabelle 7) wurden ebenfalls in verschiedenen Bandbreiten untersucht (insgesamt 10-1000 µg/ml). Zudem wurden Antibiotika getestet, die nach Transformation der Pflanzen eine Selektion ermöglichen sollten; getestet wurden Hygromycin B (1/5/10/50/100/150/200/250/300 µg/ml) und Kanamycin (100/1000/10000 µg/ml). Alle Vitalitätsmessungen erfolgten wie in Kapitel 2.9 beschrieben mit dem Puls-Amplitude-Measurement-Fluorometer (PAM-2000).

Tab. 7) Auf *Wolffia spec.* getestete Antibiotika (-Konzentrationen)

Wirksubstanzen gegen Pilze	getestete Konzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ]	getestete <i>Wolffia</i> Spezies
Amphotericin	25/50/100/200/400/500/1000	<i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. columbiana</i> <i>W. neglecta</i>
Nystatin N	1/5/25/50/100/200/500/1000	<i>W. columbiana</i>
Rovral (Iprodion)	10/100/1000	<i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. columbiana</i> <i>W. neglecta</i>
Tebuconazol	10/100/1000	<i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. columbiana</i>
Wirksubstanzen gegen Bakterien		
Ampicillin Natrium	50/100/200/300/500/1000	<i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. columbiana</i> <i>W. microscopica</i>
Cefotaxim	250	<i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. columbiana</i>
Ciprofloxacin	50/100/150/200/300	<i>W. arrhiza</i> 7193 <i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. columbiana</i>
Doxycyclin	20/40/60/80/100	<i>W. angusta</i> <i>W. arrhiza</i> 7193 <i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. cylindracea</i> <i>W. globosa</i> <i>W. microscopica</i>
Hygromycin B	1/5/10/50/100/150/200/250/300	<i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. columbiana</i>
Kanamycin	100/1000/10000	<i>W. columbiana</i>
Ofloxacin	20/30/50/80/100/300/500/ 800/1000	<i>W. angusta</i> <i>W. arrhiza</i> 7193 <i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. cylindracea</i> <i>W. globosa</i> <i>W. microscopica</i>
Penicillin G Natrium	50/100/200/300/500/1000	<i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. columbiana</i> <i>W. microscopica</i>
Piperacillin	50/100/150/200/300	<i>W. arrhiza</i> 7193 <i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. columbiana</i>
Rifampicin	20/50/100/200/500	<i>W. arrhiza</i> 7193 <i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. columbiana</i>
Tetracyclin	50/100/150/200/300	<i>W. arrhiza</i> 7193 <i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. columbiana</i>
Ticarcillin/Clavulanic Acid	10/50/80/100/200/500	<i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. columbiana</i> <i>W. microscopica</i>

Vancomycin HCl	10/50/100/150/200/300	<i>W. arrhiza</i> 7193 <i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. columbiana</i>
<b>Andere Wirksubstanzen</b>		
Plant Preservative Mixture	0,5/1/2/3/4/5 [% (v/v)]	<i>W. angusta</i> <i>W. arrhiza</i> 7193 <i>W. arrhiza</i> 8272 <i>W. australiana</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. columbiana</i> <i>W. cylindracea</i> <i>W. elongata</i> <i>W. globosa</i> <i>W. microscopica</i> <i>W. neglecta</i>
<b>Mixapplikationen</b>		
Ampicillin/Penicillin	100:100	<i>W. columbiana</i>
Ampicillin/Vancomycin	100:100	<i>W. columbiana</i>
Ampicillin/Penicillin/Amphotericin	100:100:100	<i>W. columbiana</i>
Ampicillin/Amphotericin	100:100	<i>W. columbiana</i>
Ticarcillin/Vancomycin	100:100	<i>W. columbiana</i>

#### 2.7.4 Sterilisation mit Antibiotika

Nicht alle getesteten Antibiotika bzw. Konzentrationen konnten als kompatibel mit *Wolffia* festgestellt werden (Kapitel 3.3.6). Die Wirksubstanzen, die keine letalen Schäden verursachten, wurden im Folgenden mit ihrer festgesetzten Arbeitskonzentration (Kapitel 3.3.6) auf ihre Sterilisationskapazität sowohl auf Festmedium als auch in Flüssigkultur getestet. Die Arbeitskonzentration für das zu evaluierende Sterilisationsprotokoll wurde so gewählt, daß die Applikation auch in der sensitivsten *Wolffia*-Kultur keine Vitalitätseinbußen bewirkte, jedoch einen Dekontaminationseffekt beinhaltet. Für den Versuchsansatz auf Festmedium wurden die vorbehandelten Pflanzen (Kapitel 2.7.1 und 2.7.2) in kleinen Häufchen auf ihr spezifisches Medium mit den Bakterioziden Penicillin/Ampicillin, Penicillin/Ticarcillin, Vancomycin/Ampicillin, Vancomycin/Ticarcillin, Ofloxacin/Ampicillin, Ofloxacin/Ticarcillin, Piperacillin/Ampicillin und Piperacillin/Ticarcillin verbracht. Jedes Bakteriozid wurde mit 100 µg/ml im Festmedium eingesetzt. In jedem Versuch dienten Platten ohne Antibiotika als Kontrolle für den Dekontaminationserfolg der verschiedenen Antibiotika-Anwendungen.

Die *Wolffia*-verträglichen Antibiotika wurden nachfolgend ebenso im Flüssigmedium, d. h. 100-ml (50 ml) Medium in 250-ml (150-ml) -Erlenmeyerkolben, auf ihren Dekontaminationserfolg überprüft. Hierzu wurden den Pflanzen in den Erlenmeyerkolben die entsprechenden Antibiotika (Endkonzentration 100 µg/ml) zugegeben und die Kolben danach leicht geschwenkt. Es wurde darauf geachtet, daß alle Pflanzen im Medium verblieben und nicht an der Innenseite oberhalb des Mediumspiegels hafteten. Bei beginnender Trübung durch Bakterien im Flüssigkolben wurden die Pflanzen entweder durch ein Miracloth-Sieb entnommen, gespült und einer neuen Antibiotika-

Behandlung unterzogen oder bei einer Pilzentwicklung mit einem Langstiel-Siebchen (Abb. 6) separiert.

Pflanzen und Mediumausstriche auf verschiedenen Nährmedien (DM, ST, Luria-Bertani (LB), CPS, TSA und PDA, Kapitel 2.4) dienten der optischen Kontaminationskontrolle. Die Inkubationen dieser Kontrollplatten wurden teils unter aeroben, teils unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C, 28 °C, 21 °C und bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde zusätzlich das besonders für Wasserorganismen geeignete Nährmedium R2A (Merck) eingesetzt, welches in der Trinkwasseranalyse Verwendung findet.

Das Ausplattieren von kontaminiertem Pflanzenmedium aus den Flüssigkulturen auf die genannten Kontrollmedien wurde ebenfalls dazu verwendet, eventuelle Sensitivitäten der Kontaminanten durch Hemmhöfe sichtbar zu machen. Hierfür wurden verschiedene Antibiotikaplättchen (Fluka) mit einem Gehalt von je 5 µg/Plättchen auf die Ausstriche ausgelegt und analog inkubiert.



**Abb. 6) Langstiel-Siebchen (Eigenbau) mit geernteten *Wolffia*-Pflanzen**

### **2.7.5 Sterilisation durch Antibiotika-Infiltration**

*Wolffia*-Pflanzen beherbergen endogene Mikroorganismen, die mit einer einfachen Zugabe von Antibiotika ins Kulturmedium nicht vollständig erreicht werden können. Durch Infiltration des antibiotikahaltigen Mediums wurde versucht, auch diese Bakterien abzutöten (Kapitel 4.2.4).

Die Pflanzen aus einer vitalen und oberflächensterilen Kultur (Kapitel 2.7.4) wurden in 6-Well-Platten mit einem Medienvolumen von jeweils 10 ml und der jeweiligen Antibiotikakonzentration (Tabelle 8) überführt. In einem Exsikkator (Ø 30 cm) wurde zwei mal je 5 min ein Unterdruck (ca. 200 atm) angelegt und der Exsikkator danach über ein Ventil belüftet. Hierbei wurde darauf geachtet, daß der plötzliche Überdruck nicht zu einer Explosion innerhalb des Exsikkators führte. Die auf Platten überführten Pflanzen wurden im Percival-Kulturschrank inkubiert (Kapitel 2.3.1) und zwei Wochen einer täglichen Vitalitätsmessung mittels PAM-2000 unterzogen (Kapitel 2.9).

**Tab. 8) Infiltration von *Wolffia*-Pflanzen mit verschiedenen Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen**

<i>Wolffia</i> -Spezies	Antibiotika (mit Konzentrationsangabe)	Medium
<i>W. australiana</i>	10/50/100 µg/ml Penicillin 10/10 µg/ml Penicillin/Ampicillin 100/100 µg/ml Penicillin/Ampicillin 10/50/100 µg/ml Ticarcillin 10/10 µg/ml Ticarcillin/Vancomycin 100/100 µg/ml Ticarcillin/Vancomycin 10/50/100/150/200 µg/ml Piperacillin 10/50/100/150/200 µg/ml Ofloxacin	SH
<i>W. brasiliensis</i>	10/50/100 µg/ml Penicillin 10/10 µg/ml Penicillin/Ampicillin 100/100 µg/ml Penicillin/Ampicillin 10/50/100 µg/ml Ticarcillin 10/10 µg/ml Ticarcillin/Vancomycin 100/100 µg/ml Ticarcillin/Vancomycin 10/50/100/150/200 µg/ml Piperacillin 10/50/100/150/200 µg/ml Ofloxacin	SH
<i>W. columbiana</i>	10/50/100 µg/ml Penicillin 10/10 µg/ml Penicillin/Ampicillin 100/100 µg/ml Penicillin/Ampicillin 10/50/100 µg/ml Ticarcillin 10/10 µg/ml Ticarcillin/Vancomycin 100/100 µg/ml Ticarcillin/Vancomycin	CHU

Nach Überprüfung der generellen Verträglichkeit einer Antibiotika-Infiltration wurde versucht, unsterile aber pilzfreie Aquariumpflanzen mit Antibiotika in folgender Reihenfolge nach oben beschriebenem Protokoll zu sterilisieren:

- 1) 100/100 µg/ml Penicillin/Ampicillin
- 2) 100/100 µg/ml Ticarcillin/Vancomycin
- 3) 150 µg/ml Ofloxacin
- 4) 100 µg/ml Piperacillin

Der Zeitraum zwischen den einzelnen Infiltrationen betrug jeweils zwei bis drei Tage. Die Überprüfung des Sterilisationserfolges wurde täglich anhand von Aliquots unter Zuhilfenahme des Mikroskops vorgenommen. Zusätzlich wurden sowohl Aliquots des Mediums als auch homogenisierte Pflanzenmasse (Mörser und Pistill) auf R2A- bzw. DM-Medium ausplattiert und mit Antibiotikaplättchen (Ampicillin, Ticarcillin, Penicillin, Ofloxacin, Piperacillin, Ciprofloxacin (Fluka)) versehen. So konnten evtl. erworbene Resistenzen durch Hemmhöfe festgestellt und noch wirksame Antibiotika identifiziert werden.

### 2.7.6 Sterilisation durch Ultraschall, pH-Shift und Algenvernichtungsmittel

In allen Versuchsansätzen sind sowohl die Auswirkungen der Behandlung auf die Pflanzen als auch der Effekt auf die Kontaminationen im Parallelansatz untersucht worden. Unsteriles Aquarien-Medium (50 ml) wurde in 150-ml-Erlenmeyerkolben gegeben und zehn Sekunden, 0,5/1/2/3/4/5/10

und 15 min im Ultraschallbad (Bandelin Souvrex RK 100) belassen. Analog hierzu wurden Kolben mit Medium und Pflanzen behandelt. Anschließend wurden alle Kolben im Rumed-Kulturschrank (Kapitel 2.3.1) 3-5 Tage inkubiert. Des Weiteren wurde eine PH-Verschiebung sowohl in den alkalischen (bis pH 12 mit 1 M NaOH) als auch in den sauren Bereich (bis pH 3 mit 1 M HCl) vorgenommen. Die Inkubierung der Kulturen erfolgte wie beschrieben.

Dem Medium (mit und ohne Pflanzen) wurde nach Herstellerangabe auch Algenmaster (Amtra, 1:100 und 1:4000) zugesetzt, leicht geschüttelt und analog inkubiert.

### 2.7.7 Identifikation der Kontaminanten

Die Kontaminationen wurden durch Mehrfach-Ausstrich und Umimpfen von Kolonien vereinzelt und separat bei RT, 28 °C, 37 °C auf Standard-Medium (ST), PDA und CPS kultiviert. Pilzmycel wurde alle vier Wochen auf PDA bzw. CPS-Agar umgesetzt, um einer Verarmung des Mediums entgegenzuwirken. Für die Identifikation (Kapitel 3.4) der vereinzelt Bakterien sind Gram-Färbung und API-Testreihen (Merck) unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen herangezogen worden (M. Frechen, Bonn). Die isolierten Pilze identifizierten Dr. W. Heller (Wädenswil) sowie das Centraalbureau voor Schimmelcultures (Niederlande).

### 2.8 Bonitur der *Wolffia*-Pflanzen

Um die Auswirkung der verschiedenen Versuche aus den Medien- und Sterilisationsansätzen auf die Pflanzen vergleichen und um einen Vitalitätsstatus erfassen zu können, sind die Fronds einer Bonitur unterzogen worden.

Als der optimale Phänotyp mit den potentiell besten Boniturnoten sind jeweils die *Wolffia*-Pflanzen aus der unsterilen Vermehrungskultur der Aquarien als Referenz herangezogen worden. Die Gesamtbewertung bezog sich auf die Intensität der Farbe, den Habitus, die vegetative Vermehrung und den Kontaminationsstatus, wobei zwischen pilzlicher, bakterieller und anderer Kontamination (Algen, Schnecken) differenziert wurde. Die Intensität der Farbe war während der Bonitur ein wichtiger Faktor. Zu beachten war dabei, daß jeder *Wolffia*-Spezies ein typischer Grünton zuzuordnen ist, der einen guten optischen Indikator für die Gesamtvitalität der Pflanzen darstellt. Solche, dem optimalen Farbphänotyp entsprechende Pflanzenkulturen, die zudem ein deutliches Frondwachstum zeigten, wurden mit der Boniturnote „+++“ bewertet. In Abstufung bezogen auf den Grad der Aufhellung (Chlorose), Verfärbung und Frondwachstum wurden die Boniturnoten „++“ (deutliche Aufhellung des Grüntons gegenüber dem optimalen Phänotyp, weniger Frondwachstum) und „+“ (sehr stark aufgehellt, gelblich bis weiße Verfärbung, kaum noch Frondwachstum) vergeben. Die Boniturnote „-“ wurde vergeben, wenn die Pflanzenkultur augenscheinlich abgestorben war (nur noch vereinzelt bis gar keine grünen Pflanzen, Verbräunung,

kein Frondwachstum). Wenn auch nach zwei Wochen kein neuerliches vegetatives Wachstum zu beobachten war, wurden die betreffenden Kulturen vernichtet.

Der Kontaminationsstatus bezogen auf Pilze (P), Bakterien (B) und andere Kontaminanten wie Schnecken (S) und Algen (A) wurde im Einzelfall berücksichtigt. Bei Unsicherheit, ob es sich bei einem leichten Film auf der Oberfläche der Flüssigkulturen um Bakterien oder um z. B. Stoffwechselprodukte der Pflanzen oder Derivate des Mediums handelte, konnte durch leichtes Schütteln der Kolben festgestellt werden, ob sich die Anordnung der Pflanzen auflöste oder ob eine Bakterien-Kahmhaut die Pflanzen in einem festen Zusammenschluß hielt (Schüttelprobe).

Zudem konnte die Betrachtung von Aliquots aus der Flüssigkultur oder Abstrichen vom Festmedium unter dem Mikroskop (Leitz) bei 40-facher Vergrößerung Aufschluß geben. Aliquots des Mediums wurden auf ST-Medium, welches generell für Bakterien optimiert ist, ausplattiert und z. T. bei drei verschiedenen Temperaturen inkubiert (RT; 28 °C, 37 °C).

Alle Boniturdaten, der Kontaminationsstatus und gegebenenfalls die notwendigen Maßnahmen zur Erhaltung der Kultur wie Aufteilung der Pflanzen in neue Kolben, Wechsel des Mediums oder Antibiotikaeinsatz wurden in einer Pflanzenakte festgehalten. Hierfür wurde für jede Kultur ein separates Datenblatt angelegt und mit einer Nummer katalogisiert, die sich bei nötiger Neuaufteilung chronologisch fortsetzte.

## 2.9 Bewertung der Pflanzenvitalität mit Hilfe des PAM-2000

Das PAM-2000 (Schreiber *et al.* 1994) mißt mit einer zu definierenden Lichtintensität und einer wählbaren Anzahl von Lichtimpulsen letztlich die Intaktheit der Elektronentransportkette von Photosystem II auf Photosystem I und drückt dies im Quotienten (Yield) = [Maximalfluoreszenz (Fm) minus Grundfluoreszenz (Ft)] geteilt durch Fm aus.

$$\text{Yield} = \frac{(F_m - F_t)}{F_m}$$

Unter Maximalfluoreszenz ist die 100 %ige Absättigung des Photosystems nach den sättigenden Lichtimpulsen zu verstehen, während die Grundfluoreszenz dem Status entspricht, der sich beim Fall der Elektronen auf das Ursprungsenergieniveau (vor der Anregung) einstellt.

Der errechnete Yield-Wert wurde als ein Maß für die Vitalität der *Wolffia*-Pflanzen unter den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen definiert. Tages- und Lampenlicht, Abstand der Pflanzen zum Sensor und die Menge des Chlorophylls oder die Anzahl der grünen Pflanzen wurden durch die Berechnung des Yield relativiert, was eine direkte Vergleichbarkeit unterschiedlicher Versuchsansätze ermöglichte. Die Messung erfolgte mit je zwei Lichtimpulsen pro Probe; die genauen Einstellungen für die Messungen sind Abbildung 7 zu entnehmen.

ZFo:	Light Meas	Act. Light	Sat. Pulse	Far Red
MfM:	1 Int: 9	2 Int: 2	3 Int: 8	4 Int: 6
Fv:m	5 600 Hz	6 s : 0	7 0.1s: 8	8 s : 3
Fo':	Gain 3	H LED	Clk s: 20	Run 1
Fm':	Damping 5	9 Auto20K	Pulse Seq.	Kinetic Scr
Ft:	0 ML: 0	PAR:	No:	Tmp:
Yield:	ETR:	qP:	qN:	Volt: 13.5

Abb. 7) Grundeinstellungen der Software des PAM-2000

## 2.10 Frisch- und Trockenmassebestimmung

Zur Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse (FM bzw. TM) wurden die Pflanzen aus der Flüssigkultur in ein Miraclothsieb abgossen; das restliche Medium, welches sich noch zwischen den Pflanzen befand, konnte danach auf sterilen Tüchern aufgesogen werden. Das Umlegen und Abtupfen der in das Miracloth-Gewebe eingeschlossen Pflanzen auf immer neue Tücher wurde so lange fortgeführt, bis sich auch nach sanftem Druck keine feuchten Abdrücke mehr auf den Tüchern zeigten. In zuvor gewogenen Pergamenttüten konnte nun das Netto-Gewicht der eingesetzten Pflanzen ermittelt werden. Anschließend wurden die Tüten im vorgeheizten Trockenschrank fünf Stunden bei 120 °C getrocknet. Jede Stunde wurde das Gewicht mit einer Feinwaage bestimmt.

## 2.11 Messung der Sauerstoffproduktion mit Hilfe des Cell-Scans

Das Prinzip des Cell-Scans basiert auf der Messung des Sauerstoffpartialdrucks in wachsenden und sauerstoffverbrauchenden Zellkultur-Systemen. Hierzu diente ein Sensor am Boden einer 6-Well-Platte sowie ein Sensortisch, der in einzustellenden Intervallen in jedem Well den Sauerstoffpartialdruck messen konnte (Key *et al.* 2001). Da es sich bei *Wolffia* um ein sauerstoffproduzierendes System handelt, wurden Modifikationen am Originalaufbau vorgenommen (Abbildung 8). Zum einen mußte ein luftdichter Abschluß jedes einzelnen Wells gewährleistet werden. Hierfür wurden mehrere Lagen Parafilm, Tesafilm, kleine Schraubzwingen, die den Deckel der 6-Well-Platte vorsichtig auf die Ränder drückten, sowie eine mit Spiegelkleber (Kömmering 226) verklebte 3-mm-Glasplatte als Deckel getestet. Zum anderen war zur Kontrolle der Meßdaten der Einsatz einer sterbenden Pflanzen-Kultur erforderlich (pflanzliche Negativkontrolle), um den Einfluß der Photosynthese, der Sauerstoffdifferenz und damit des Sauerstoffpartialdrucks in vitalen und letalen Kulturen vergleichen zu können. Zu diesem Zweck wurde eine Pflanzenvergiftung mit 70 % (v/v) Ethanol p. a. oder pflanzenunverträglichen Antibiotikakonzentrationen (Tabelle 9, Kapitel 3.3.3) vorgenommen. Zusätzlich wurde ein Well, das keine Pflanzen und kein Vergiftungsmittel enthält, als systemische Nullkontrolle verwendet.





**Abb. 8)** Cell-Scan-Anlage mit Meßtisch (a), Versuchsaufbau mit Glasplatte und Schraubzwingen (b) und 6-Well-Platte mit schwarzen Sensoren (c)

Die Kultivierungs- und Meßdauer der Versuche betrug vier Tage bis vier Wochen, wobei eine automatische und kontinuierliche Reihen-Messung 24 Stunden lang aktiv war. Um festzustellen, inwiefern Antibiotika die Messung als solche oder gar den Meßfühler beeinträchtigen, wurden zuvor Kontrollen ohne Pflanzen gemessen (Wasser, SH-Medium, SH-Medium + CO<sub>2</sub>-Tablette, SH-Medium + 200 µg/ml Penicillin, SH-Medium + 200 µg/ml Rifampicin, SH-Medium + 200 µg/ml Penicillin + CO<sub>2</sub>-Tablette, SH-Medium + 200 µg/ml Rifampicin + CO<sub>2</sub>-Tablette).

Die Daten wurden am ICB in Münster ausgewertet und dem Institut zur Verfügung gestellt.

**Tab. 9) Versuchsansätze zum Cell-Scan**

\* Den Wells wurde eine CO<sub>2</sub> Tablette zugegeben, um auszuschließen, daß ein CO<sub>2</sub>-Mangel in den Wells die Photosyntheseleistung der Pflanzen limitierte.

<i>Wolffia</i> -Spezies	vergiftet mit	abgedichtet mit	Versuchsdauer [Tagen]
<i>W. brasiliensis</i>	70 % EtOH	Parafilm	4
<i>W. brasiliensis</i>	70 % EtOH	Parafilm	4
<i>W. arrhiza</i> 8272	200 µg/ml Nystatin	Parafilm + Schraubzwingen	8
<i>W. arrhiza</i> 8272	400 µg/ml Nystatin	Parafilm + Schraubzwingen	6
<i>W. brasiliensis</i>	70 % (v/v) EtOH	Parafilm + Schraubzwingen	6
<i>W. australiana</i>	70 % (v/v) EtOH	3-mm-Glasplatte	21
<i>W. cylindracea</i>	200 µg/ml Penicillin, 200 µg/ml Rifampicin 70 % (v/v) EtOH	3-mm-Glasplatte	12
<i>W. brasiliensis</i> *	200 µg/ml Penicillin, 200 µg/ml Rifampicin 70 % (v/v) EtOH	3-mm-Glasplatte	6

## **2.12 Kultursysteme für *Wolffia*-Pflanzen**

Verschiedene Kultursysteme wurden getestet, um den Pflanzen optimale Wachstumsbedingungen zu ermöglichen und den Arbeitsaufwand in der Kulturpflege so gering wie möglich zu halten.

### **2.12.1 Erlenmeyerkolben**

Die Pflanzen wurden in 150 ml (mit 50 ml Medium), 250 ml (mit 100 ml Medium) bzw. 500 ml (mit 200 ml Medium) sterilen Erlenmeyerkolben, die teils mit Zellstoff-Stopfen, teils mit Aluminiumfolie verschlossen waren, kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte 14-tägig, bei Bedarf (z. B. Kontaminationen) entsprechend öfter. Es wurde darauf geachtet, daß die Pflanzenmasse im Kolben ein bestimmtes Maß nicht überschritt, da sonst negative Effekte durch Verarmung des Mediums oder Absterben der Kultur nicht auszuschließen waren.

### **2.12.2 Zellkulturflaschen**

Sowohl beschichtete und unbeschichtete als auch ventilierte und luftdichte Zellkulturflaschen der Firmen Nunc und Greiner wurden in den Volumina 150 ml (mit 50 ml Medium) und 500 ml (mit 200 ml Medium) mit verschiedenen *Wolffia*-Spezies getestet. Der mögliche Vorteil dieses Systems wurde, da übereinander stapelbar, in der Platzersparnis gesehen. Analog zu den Erlenmeyerkolben wurde das Medium 14-tägig gewechselt. Dekontaminationsversuche, bei denen das Behältnis u. U. täglich hätte gewechselt werden müssen, wurden mit den Zellkulturflaschen aus Kostengründen nicht durchgeführt.

### **2.12.3 Festmedium-Platten**

Kleine Häufchen zu ca. zehn Pflanzen wurden mit Hilfe eines Spatels auf Festmedium in Petrischalen überführt und vorsichtig auf den Agar gedrückt, um einen sicheren Kontakt zu den Nährstoffen zu gewährleisten. Zu Beginn der Experimente wurden die Medien z. T. mit 0,6 g/l MES, 0,5 g/l Caseinhydrolysat, 0,1 g/l Hefeextrakt und 1 % (w/v) Saccharose supplementiert. Späteren Erkenntnissen folgend sind Festmedium-Platten ohne jeden Zusatz bzw. nur mit geringem Saccharose-Anteil (bis max. 2 % (w/v)) verwendet worden.

## **2.13 Bestimmung der Wachstumsrate**

Die Erfassung der Wachstumsrate erfolgte zum einen in 6-Well-Platten und zum anderen in Glasschalen durch manuelles Auszählen der Pflanzen bzw. durch eine bildgestützte Ermittlung des Oberflächendeckungsgrades.

### 2.13.1 Erfassung der Wachstumsrate in 6-Well-Platten

Die Erfassung der Wachstumsrate erfolgte zunächst in 6-Well-Platten mit je 10 ml Mediumvolumen und je zehn Pflanzen durch manuelles Auszählen mit Hilfe einer Zähluhr. Der erste Wachstumsversuch (Versuch 1) wurde für *W. microscopica* in ½ SH-Medium, *W. arrhiza* 8272 in 1/10-Hutner-Medium und *W. columbiana* in LM-Medium über einen Zeitraum von drei Wochen im Januar unternommen. Hierbei wurde pro Spezies eine Platte verwendet, so daß der Versuch als sechsfacher Parallelansatz ausgezählt werden konnte.

Der zweite Versuch (Versuch 2) erfolgte ohne Parallelansatz in 6-Well-Platten mit *W. angusta*, *W. arrhiza* 7193, *W. arrhiza* 8272 (alle 1/10-Hutner-Medium), *W. australiana*, *W. brasiliensis*, *W. elongata*, *W. globosa*, *W. neglecta* (alle SH-Medium), *W. microscopica* (1/2 SH-Medium), *W. columbiana* und *W. cylindracea* (beide CHU-Medium) über einen Zeitraum von 17 Tagen im April/Mai. In regelmäßigen Abständen wurden die Pflanzen ausgezählt und bonitiert.

### 2.13.2 Erfassung der Wachstumsrate in Glasschalen

Um das Wachstumsverhalten in den später zu testenden Fermentersystemen beurteilen zu können, sind Referenzwerte wünschenswert. Die Wachstumsangaben aus der Literatur deckten sich nur unzufriedenstellend mit den erworbenen Erfahrungswerten. Als Referenzsystem wurden Glasschalen mit einer Fläche von 153,9 cm<sup>2</sup> gewählt. Diese Größe wurde als ausreichend erachtet, um das Pflanzenwachstum über einen zwei- bis dreiwöchigen Zeitraum zweidimensional beobachten zu können, ohne daß aufgrund von Platzmangel die Pflanzen gezwungen wären, submers auszuweichen. Das oberflächensterile Pflanzenmaterial (ca. 0,2 g FM) wurde mit einem Langstiel-Siebchen in die autoklavierten und getrockneten Glasschalen in 100 ml Medium (1/10-Hutner-Medium, CHU, SH und GM) überführt und in der Phytokammer (Kapitel 2.3.1) kultiviert (Tabelle 10). Schalen, die im Laufe des Versuches kontaminierten, wurden aus den weiteren Messungen ausgeschlossen und ausnahmslos durch Autoklavieren vernichtet. Ab Versuchsbeginn erfolgte eine regelmäßige Messung der Zuwachsrates. Die Schalen (je drei Schalen pro Art) wurden auf einem Flachbettscanner (Agfa Duoscan) plaziert, mit fliederfarbenen Din-A4-Blättern abgedeckt (die Farbe Lila ermöglicht in der Bildbearbeitung einen optimalen Kontrast zu grün) und mit Agfa Photolook 5.0 gescannt. Auf diese Weise wurde zudem der Versuch unternommen, das Pflanzenwachstum in den Zellkulturflaschen zu messen.

Über die Wachstumsrate sollten ebenso verschiedene Medien (GM, SH, konditioniertes Medium (KM=sterilfiltriertes Aquarienwasser zwei Wochen nach dem letzten Wasserwechsel)) und Medienzusätze (1 % (v/v) Kokosnußwasser und 0,1 mM Kinetin) bezüglich ihres Einflusses auf das Wachstum von *W. australiana* geprüft werden. Die Untersuchung der Medienzusätze wurde im

April analog zu der bereits beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt und der Pflanzen-Netto-Zuwachs bestimmt.

**Tab. 10) Versuchsaufbau der Wachstumsversuche mit verschiedenen *Wolffia*-Spezies und unterschiedlichen Medien und Zusätzen**

S = Schalenversuch; H = 1/10-Hutner-Medium; Koko = 1 % (v/v) Kokosnußwasser; K = 0,1 mM Kinetin; SH = Schenk- & Hildebrandt-Medium; GM = Growth-Medium

Versuch	Getestete Spezies (Medium)	Dauer	Zeitpunkt
S2	<i>W. arrhiza</i> 7193 (H), <i>W. arrhiza</i> 8272 (H), <i>W. australiana</i> (SH), <i>W. brasiliensis</i> (SH), <i>W. columbiana</i> (CHU), <i>W. cylindracea</i> (CHU), <i>W. neglecta</i> (H), <i>W. angusta</i> (H)	3 Wochen	Februar
S3	<i>W. arrhiza</i> 7193 (H), <i>W. arrhiza</i> 8272 (H), <i>W. australiana</i> (SH), <i>W. brasiliensis</i> (SH), <i>W. columbiana</i> (CHU), <i>W. cylindracea</i> (CHU), <i>W. microscopica</i> ( <sup>1</sup> / <sub>2</sub> SH)	3 Wochen	April
S4	<i>W. arrhiza</i> 7193 (H), <i>W. arrhiza</i> 8272 (H), <i>W. australiana</i> (SH), <i>W. brasiliensis</i> (SH), <i>W. columbiana</i> (CHU), <i>W. cylindracea</i> (CHU), <i>W. neglecta</i> (H), <i>W. angusta</i> (H), <i>W. elongata</i> (SH)	3 Wochen	Juni
S5	<i>W. arrhiza</i> 8272 (H), <i>W. australiana</i> (SH), <i>W. brasiliensis</i> (SH), <i>W. cylindracea</i> (CHU)	3 Wochen	Aug/Sep
S7	<i>W. australiana</i> (SH) KM, SH, SH + Koko	11 Tage	Mai
S8	<i>W. australiana</i> (SH) KM, GM, GM + Koko, SH, SH + Koko, SH + Koko + Kinetin, SH + Kinetin	2 Wochen	Juni

### 2.13.3 Auswertung der Wachstumsversuche mit der SigmaScan-Software

Eine Photobearbeitung (Photoshop 7.0) war erforderlich, um die gescannten Bilddaten mit dem Programm SigmaScan 5.0 auswerten zu können. Vom Originalbild wurde die Schalenfläche mit den darin enthaltenen Pflanzen mit dem Kreisausschnitt-Werkzeug ausgeschnitten und in eine neue Datei kopiert. Im Menü „Bild“ wurde in folgender Reihenfolge vorgegangen:

- 1.) Bild umkehren
- 2.) Tonwertkorrektur

Bei der Tonwertkorrektur war es wichtig, genau die Einstellung zu finden, in der kein Rotumschlag der dunklen Flächen geschah, jedoch gleichzeitig dafür zu sorgen, daß die Pflanzen noch deutlich sichtbar waren, ohne in der Schwarzverschiebung zu verschwinden.

- 3.) Helligkeit/Kontrast

Bei dieser Einstellung sollte der Kontrast maximiert werden, um SigmaScan eine möglichst stringente Abgrenzung der Pflanzen zum Hintergrund zu ermöglichen. Hier war es hilfreich, den Helligkeitsgrad vorerst soweit wie möglich zu minimieren, ohne das gesamte Bild zu dunkel werden zu lassen.

- 4.) Farbbalance

Um die in Folge der Bildbearbeitung nun blau erscheinenden Pflanzen optimal vom Hintergrund abgrenzen zu können, wurde die Farbbalance einmalig um 100 % in den Blaubereich verschoben.

5.) Die weißen Ecken mit dem Füllwerkzeug „Eimer“ schwarz auffüllen

6.) mit dem Hintergrund auf eine Ebene reduzieren

Das so bearbeitete Bild (Abb. 9a) wurde in SigmaScan 5.0 geladen und mit einem definierten Rot-Farb-Overlay (30 % Threshold) versehen, der in der Option „Area“ die pflanzenfreien Flächen (in Pixeln) erfaßte (Abb. 9b).

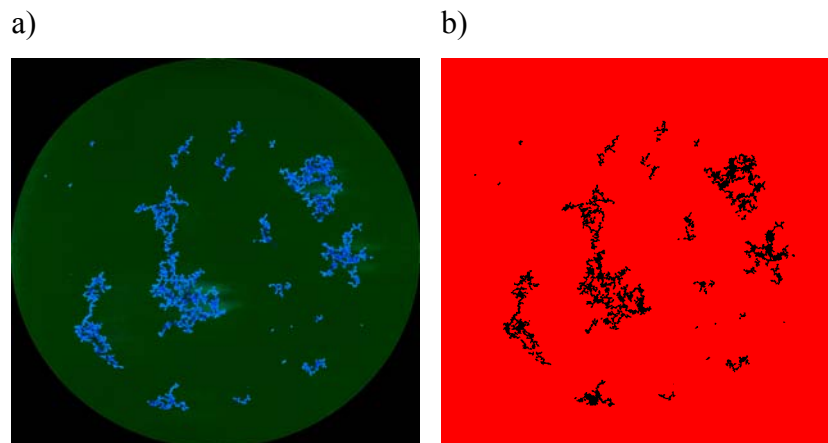


Abb. 9) Eine *Wolffia*-Schale nach der Bildbearbeitung (a) und nach dem Rot-Overlay (b)

Eine direkte Erfassung der Pflanzenfläche war generell zwar möglich, jedoch als weitaus zeitaufwendiger zu beurteilen. Mit Hilfe des ermittelten Overlays und der Grundfläche konnte nun als Differenz der Anteil der Fläche (in Pixeln) berechnet werden, den die Pflanzen eingenommen hatten. Da *Wolffia*-Pflanzen jahreszeitlich bedingten Größenunterschieden unterliegen und sich die einzelnen Arten in Form und Größe ebenfalls unterscheiden, mußte zu Beginn einer jeden Auswertung die Anfangscharge zum Zeitpunkt „Tag Null“ manuell ausgezählt werden, um die Anzahl der Pixel zu ermitteln, die eine *Wolffia*-Pflanze im jeweiligen Versuchsansatz einnahm. Erst dadurch war es möglich, auf eine genaue Anzahl der Individuen zurückzurechnen. Als Grundwert (Pixel pro *Wolffia*-Pflanze) für die Charge diente der Mittelwert aus allen drei gezählten Schalen. Die Erfassung und Berechnung der End-Daten erfolgte in Excel 4.0, die graphische Darstellung in Prism 3.0.

#### 2.13.4 Statistische Auswertung (univariate Varianzanalyse)

Die statistische Auswertung der als lateinisches Rechteck angeordneten Wachstumsversuche erfolgte mit SPSS 11.0 für Windows (Janssen und Laatz 1999). Optional erstellt SPSS eine deskriptive Statistik sowie homogene Untergruppen. Je ein Wertelabel für die univariate

Varianzanalyse im allgemeinen linearen Modell (ANOVA) wurde allen im Test verwendeten Parametern (*Wolffia*-Spezies (nominales Meßniveau), Zeitpunkt (ordinales Meßniveau) und der Netto-Zuwachs nach drei Wochen in Pflanzenindividuen (nominales Meßniveau)) zugewiesen. Als  $H_0$ -Hypothesen wurden formuliert:

$H_{01}$ : Die verschiedenen *Wolffia*-Spezies unterscheiden sich nicht in ihrer Netto-Zuwachsrate.

$H_{02}$ : Die Pflanzen unterliegen bezüglich des Faktors Wachstum keiner Jahresrhythmik.

Die Daten wurden in vier verschiedenen Zeiträumen (Februar, April, Juni und August/September) erhoben. Der Februarversuch mußte nach 15 Tagen abgebrochen werden, alle anderen Versuche sind über drei Wochen gemessen worden.

Ob die Varianzen in der Gesamtheit der Versuche homogen waren, wurde durch den Levene-Test festgestellt. Im Falle einer signifikanten Null-Hypothese im Test auf die Verletzung der Gleichheit der Fehlervarianzen wurde der Post-Hoc-Test mit Games-Howell durchgeführt (sonst Scheffé).

Die unabhängigen Faktoren „Spezies“ und „Zeitpunkt“ wurden somit je einem Mehrfachvergleich unterworfen, wobei der Netto-Zuwachs in Fronds als variabler Faktor definiert wurde. So wurde geprüft, ob sich eine *Wolffia*-Spezies signifikant von einer anderen unterscheidet ( $H_{01}$ ) bzw. ob ein Zeitpunkt, bezogen auf das Wachstum, besser zu beurteilen ist als ein anderer ( $H_{02}$ ). Für den Test auf Zuwachs und Zeitpunkt galt ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0.05$ . Dies bedeutet, daß im signifikanten Fall 95 % der betrachteten Grundgesamtheit repräsentiert werden (Konfidenzintervall 95 %).

Für die Schalenversuche S7-S9, die hauptsächlich Aufschluß über das Wachstum durch verschiedene Medienzusätze geben sollten, wurde *W. australiana* verwendet und wie folgt vorgegangen: Nach Zuweisung der Wertelabels für die Medien KM, GM, SH, GM + 1 % (v/v) Kokosnußwasser, SH + 1 % (v/v) Kokosnußwasser, SH + 0,1 mM Kinetin, SH + 1 % (v/v) Kokosnußwasser + 0,1 mM Kinetin (nominales Meßniveau) wurde die Varianzanalyse für *W. australiana* (nominales Meßniveau) durchgeführt, bei der folgende Null-Hypothese formuliert wurde:

$H_{03}$ : Das Kulturmedium und Medienzusätze haben keinen Einfluß auf die Netto-Zuwachsrate von *W. australiana*.

Im Falle einer signifikanten Null-Hypothese im Test auf Varianzhomogenität wurde der Post-Hoc-Test mit Games-Howell durchgeführt (sonst Scheffé).

Für den Mediumtest galt ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0.05$  (Konfidenzintervall = 95 %).

### 2.13.5 Wachstumsmessung mit dem Scannalyzer

Der Scannalyzer der Firma Lemnatec (Würselen) ist ein Gerät, welches u. a. für die Auszählung von *Lemna*-Pflanzen und deren Auswertung optimiert ist ([www.lemnatec.de](http://www.lemnatec.de)). Der Versuch, Wachstumsraten für *Wolffia* zu ermitteln, lag daher nah. Die Versuche wurden mit den Pflanzen *W. arrhiza* 8272, *W. columbiana* und *W. microscopica* auf 1/10-Hutner- bzw. CHU-Medium, sowohl in ventilierten 150-ml-Zellkulturflaschen (Ausgangszustand 1-2,5 % Oberflächendeckungsgrad) als auch in 6-Well-Platten sowie in Petrischalen auf Festagar unternommen. Pro Spezies und Variation der Kultivierungsgefäße wurden je drei Parallelansätze angelegt. Der Ausgangspunkt der 6-Well-Platten betrug 1-2 %, der auf Festagar ca. 0,5 % Oberflächendeckungsgrad. Für die Datenerhebung auf den Festmedium-Platten wurden vor den digitalen Aufnahmen die Pflanzen, die aufeinander und somit in die Höhe gewachsen waren, vorsichtig mit einem Rundspatel zweidimensional verteilt. In den 6-Well-Platten betrug das Volumen 10 ml pro Well, für die Ventflaschen wurden je 50 ml Medium verwendet. Ein Mitarbeiter der Firma war für die Datenaufnahme sowie die Auswertung verantwortlich. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise dem Institut überlassen.

### 2.14 Fermentersysteme für *Wolffia*

Wie in Kapitel 1.8 aufgeführt, sollte ein Bioreaktor für *Wolffia* diversen Ansprüchen genügen. Ein Hauptaugenmerk bezüglich der ersten Testsysteme war das Pflanzenwachstum unter sterilen Bedingungen, was eine optimale Pflanzenfitness beinhalten sollte.

#### 2.14.1 Waver

Beim Waver der Firma WaveTec (Wädenswil, Schweiz) handelt es sich um einen maximal 5 l fassenden Zellkulturbeutel (Cellbag) mit diversen Ventilen und Öffnungen, die ein steriles Befüllen und eine sterile Entnahme von Medium gewährleisten sollen. Dieser Beutel liegt auf einer Waver-Vorrichtung, die die Kultur wellenartig nach Bedarf hin und her schwenkt (Abbildung 10). Zudem beinhaltet dieses System die Option auf eine zuschaltbare Meßstation, die über eine serielle Schnittstelle ansteuerbar ist ([www.wavetec.ch](http://www.wavetec.ch)).

Oberflächensterile *Wolffia*-Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen mit 1 bzw. 1,5 l Medium in den Waver-Beutel gefüllt und auf einer selbstgebauten Vorrichtung plaziert (Abbildung 10). Als Antrieb diente ein Scheibenwischermotor, der die Wellenbewegung mit 2 V und damit ca. 15 Kippbewegungen pro Minute induzierte.

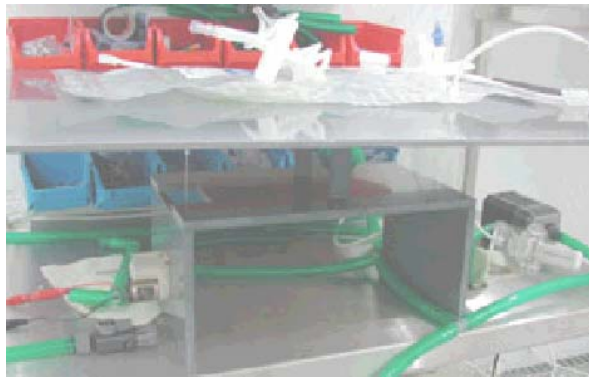


Abb. 10) WaveTec-Konstruktion und Cellbag

Das System wurde bis zu drei Wochen in der Phytokammer (Kapitel 2.3.1) betrieben (Tabelle 11), wobei der Wave-Mechanismus während der Dunkelphase ausgeschaltet wurde, um die Pflanzen keiner permanenten mechanischen Beanspruchung auszusetzen. Während des gesamten Versuches wurde kein Mediumwechsel vorgenommen. Eine bildgestützte Auswertung war aufgrund der vielen Anschlüsse am Beutel nicht möglich. Die zwei durchgeführten Versuche begannen im Mai.

Tab. 11) Versuchsdaten zu den Fermentationsversuchen im WaveTec-System

<i>Wolffia</i> -Spezies	Medium	Startgewicht [g]	Volumen [l]	Kultivierungszeit [Tagen]
<i>W. australiana</i>	SH	0,5	1	18
<i>W. australiana</i>	SH	0,5	1,5	21

### 2.14.2 Biobeutel

Die Biobeutel der Firma VivaScience (Göttingen) bestehen aus einem atmungsaktiven Material. Sie sind in den Größen 50 ml, 1 l und 3 l erhältlich. Die Entnahme und Befüllung erfolgt über einen eingearbeiteten Loer-Port (Abbildung 11).

Um eine generelle Kompatibilität des Biobeutel-Systems mit *Wolffia* zu testen, wurden zwei kleine Biobeutel mit einem Volumen von 50 ml mit SH-Medium und *W. australiana* befüllt und photographiert. Dieser erste Vorversuch wurde im Juli/August durchgeführt. Danach wurden größere Biobeutel (500 ml Volumen) mit *W. australiana* über einen Zeitraum von vier Wochen bis zehn Monate getestet. Die Versuche Nr. 1 und 2 wurden im April/Mai durchgeführt, Nr. 3 und 4 im Mai und die Versuche Nr. 5-7 im Juli begonnen (Tabelle 12). Die Befüllung der Beutel erfolgte mit einer sterilen Loer-Lock-Spritze, wobei die Pflanzen zuerst in eine Petrischale mit Medium überführt werden mußten. Die Kultivierung erfolgte in der Phytokammer (Kapitel 2.3.1), wobei die Beutel auf eine stabile Pappe als Unterlage gelegt wurden, um beim Transport das empfindliche Material und die anfälligen Schweißnähte nicht zu überansprechen. Eine bildgestützte Auswertung mittels Scanner konnte aufgrund der labilen Nähte nicht erfolgen. Am Ende des Versuchs wurde der



Beutel aufgeschnitten, die Pflanzen in einem Miracloth-Sieb aufgefangen, die Frischmasse bestimmt und der pH-Wert des Mediums gemessen.

**Tab. 12) Versuchsdaten zu den Fermentationsversuchen von *W. australiana* mit SH-Medium im 500 ml Biobeutel-System**

<i>Wolffia</i> -Spezies	Versuch Nr.	Startgewicht [g]	Volumen [ml]	Kultivierungszeit
<i>W. australiana</i>	1	0,6	300	28 Tage
<i>W. australiana</i>	2	0,6	300	28 Tage
<i>W. australiana</i>	3	0,6	300	10 Monate
<i>W. australiana</i>	4	0,5	500	10 Monate
<i>W. australiana</i>	5	0,6	300	84 Tage
<i>W. australiana</i>	6	0,6	300	84 Tage



**Abb. 11) Biobeutel mit *Wolffia*-Pflanzen**

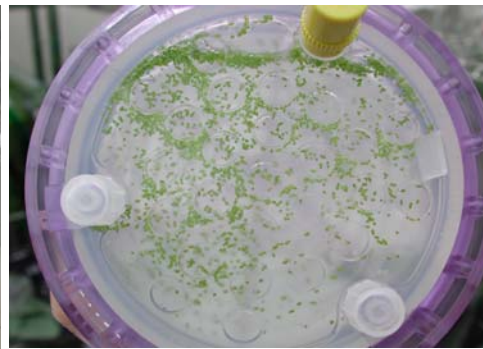
### 2.14.3 MiniPerm

Der MiniPerm-Fermenter HDC 50 der Firma VivaScience (Göttingen) besteht aus einem 500 ml fassendem Versorgungsmodul (VM) und in der vorliegenden Anwendung einem 50 ml fassenden Produktionsmodul (PM). Beide Module sind durch eine semipermeable Membran getrennt. Nährstoffe gelangen aus dem VM ins PM, wohingegen Proteine an der Membran des PM verbleiben und nicht aus dem PM hinausdiffundieren. Das MiniPerm System wird auf einer Drehvorrichtung (Abbildung 12a) für maximal vier Fermenter kontinuierlich gedreht.

a)



b)



**Abb. 12) Das MiniPerm-System auf einem Turner (a) und die Frontansicht eines Produktionsmoduls mit *W. australiana* (b)**

Ca. 0,4 g FM *Wolffia*-Pflanzen wurden durch den Loer-Port in das PM gegeben, wobei darauf geachtet wurde, daß der Druck durch die mitgespritzte Luft die äußere Hülle nicht zum Platzen brachte. Hierzu mußte die Spritze immer wieder abgesetzt und die Luft vorsichtig herausgedrückt werden, bis die gewünschten 50 ml Medium inklusive der Pflanzen ins PM verbracht worden waren. Die Kultivierung erfolgte im Phytotron (Kapitel 2.3.1), wobei die Rollvorrichtung durch einen Trafo mit 2 V angetrieben wurde (ca. zehn Umdrehungen pro Minute). In der Dunkelphase wurden auch hier die Fermenter in Ruhe belassen. Nach vierwöchiger (Nr. 1 und 2) bis dreimonatiger (Nr. 3 und 4) Fermentation wurde das PM aufgeschnitten, die Pflanzen in einem Miracloth-Sieb aufgefangen und die Frischmasse gewogen. Die Versuche Nr. 1 und 2 wurden im April, Nr. 3 und 4 im Juli begonnen.

#### 2.14.4 Osmotek-Fermenter

Der Fermenter der Firma Osmotek (Jehovot, Israel) ist für pflanzliche Embryonenkulturen optimiert, wobei die kontinuierliche Begasung des Beutels eine Besonderheit darstellt (www.osmotek.com). Der Beutel wurde unter sterilen Bedingungen mit 1,5 l Medium und Pflanzen befüllt und an das System angeschlossen (Abbildung 13). Die vom Hersteller empfohlene Rena-Pumpe zur Begasung wurde durch eine äquivalente WISA-Pumpe ersetzt. Die Kultivierung erfolgte im Phytotron (Kapitel 2.3.1), wobei die Pumpe in der Dunkelphase ausgeschaltet wurde. Nach zwei bzw. fünf Wochen wurden die Pflanzen entnommen (Tabelle 13), die Frischmasse gewogen und der pH-Wert gemessen. Die Versuche wurden im Juli (*W. australiana*) bzw. im August (*W. brasiliensis*) begonnen.

Tab. 13) Fermentationsversuche von *W. australiana* und *W. brasiliensis* im Osmotek-System

<i>Wolffia</i> -Spezies	Medium	Startgewicht [g]	Kultivierungszeit
<i>W. australiana</i>	SH	2,6	5 Wochen
<i>W. brasiliensis</i>	SH	3,0	14 Tage

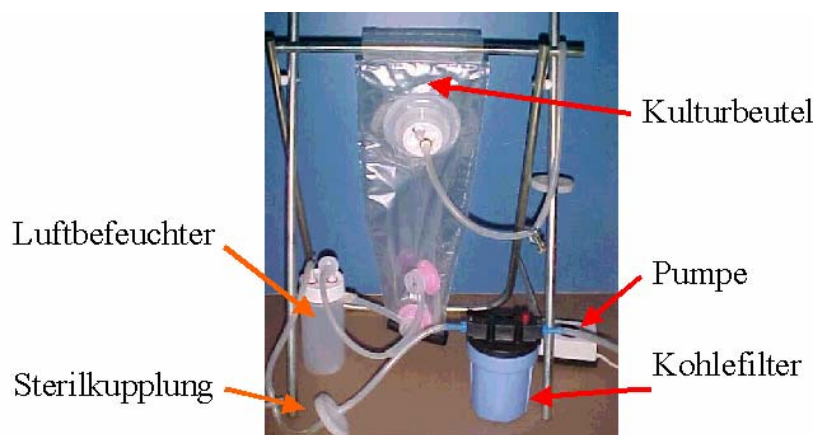


Abb. 13) Der Osmotek-Fermenter

### 2.14.5 JACES (Der IMBIO-*Wolffia*-Fermenter)

Um die während dieser Arbeit für *Wolffia* evaluierten optimalen Wachstumsbedingungen erfüllen zu können, wurde ein eigener Fermenter mit komplett autoklavierbaren Bestandteilen entwickelt (Abbildung 14). Der Labormaßstab von ca. 3 l ist durch Einfügen eines Zwischenstückes einfach erweiterbar. JACES verfügt über eine einfache Befüllungs- und Entnahmemöglichkeit durch die einfache Abnahme der Deckelplatte. Für die optimale Nutzung des Fermentervolumens, ohne die Pflanzen durch Verwirbelung des Mediums mechanisch zu beanspruchen, wurden mehrere Anströmungen der Pflanzen getestet. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Vorrichtungen (z. B. Siebplatten) gekoppelt mit einer 323U-Pumpe (Watson-Marlow) mit 80, 90 und 100 rpm und dazugehörigem Schlauchmaterial (Tygon, Watson-Marlow) verwendet.

Die Pflanzen wurden steril in einer eigens angefertigten Sterilbank (Spetec) in den autoklavierten JACES-Fermenter gegeben und im Phytotron (Kapitel 2.3.1) kultiviert. Die Pumpe wurde in der Dunkelphase ausgeschaltet. Nach einer bzw. drei Wochen wurden die Pflanzen entnommen und die Frischmasse bestimmt. Zeitweise standen für den Vergleich von Parallelansätzen zwei Pumpen für zwei Fermenter (JACES 1 und JACES 2) zur Verfügung (Tabelle 14). Beide Fermenter wurden über das gleiche Pumpenmodell, das jedoch mit verschiedenen Pumpenköpfen (Modell RL bzw. D, Watson-Marlow) ausgestattet war, betrieben. Der Versuch, in welchem *W. arrhiza* 7193 untersucht wurde, wurde parallel in einem 10-l-Plastikaquarium mit gleichen Medienbedingungen durchgeführt. Im Aquarium wurde keine Pumpe verwendet, um einen möglichen Unterschied im Wachstum zwischen ruhenden und angeströmten *Wolffia*-Pflanzen feststellen zu können. Aus einigen Fermenterversuchen sind Medien-Proben (45-100 ml) zurückbehalten und nach einer pH-Wert-Messung in 50-ml-Falcongefäßen liegend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren worden. Diese Proben können später für Proteinuntersuchungen verwendet werden.

**Tab. 14) Fermentationsversuche von *W. arrhiza* 7193, *W. columbiana*, *W. australiana* und *W. brasiliensis* im JACES-Fermenter**

KM = konditioniertes Medium aus dem Aquarium inkl Pflanzendünger und Torfextrakt (sterilfiltriert)

SH = Schenk- & Hildebrandt-Medium

\*Aquarium

<i>Wolffia</i> -Spezies	Versuch Nr.	Medium	Startgewicht [g]	rpm	JACES	Kultivierungszeit [Tage]
<i>W. arrhiza</i> 7193	1	KM	2,5	100	1	7 (Oktober)
<i>W. arrhiza</i> 7193	1a	KM	2,5	-	*	7 (Oktober)
<i>W. columbiana</i>	2	KM	6,0	100	1	21 (Juli)
<i>W. columbiana</i>	3	KM	6,0	100	2	21 (Juli)
<i>W. australiana</i>	4	SH	1,7	60	1	21 (Juli/August)
<i>W. australiana</i>	5	SH	1,7	60	2	21 (Juli/August)
<i>W. brasiliensis</i>	6	KM	4,8	80	1	14 (August/September)
<i>W. brasiliensis</i>	7	SH	2,4	80	1	14 (Oktober)

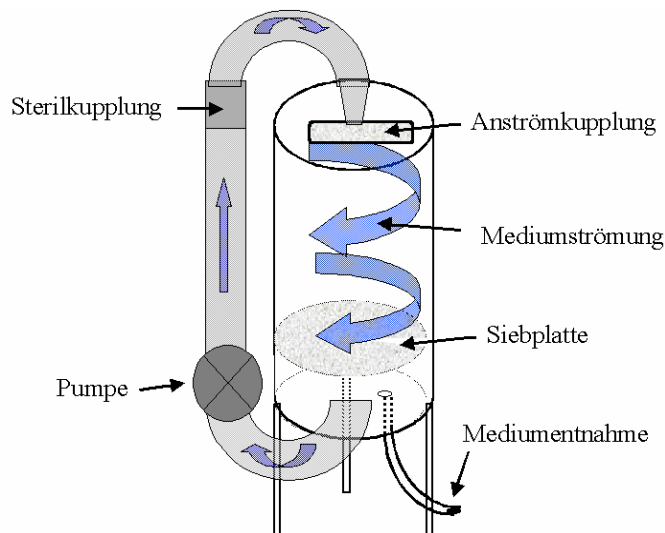


Abb. 14) Schematischer Aufbau des JACES-Fermenters

### 2.15 Auswertung der Fermenter-Daten

Da nicht alle Fermenter in Bezug auf das Kulturwachstum mit einem bildgestützten System (Kapitel 2.13.3) ausgewertet werden konnten, wurde auf die Frischmasse zurückgegriffen. Die Bestimmung der Frischmasse erfolgte wie in Kapitel 2.10 beschrieben.

### 2.16 Transformation von *Wolffia*

Für alle Transformationsversuche wurden nur Pflanzen verwendet, deren Medialiquot auf DM nach drei Tagen keine Kontaminationen aufwies.

#### 2.16.1 Reportersysteme

Das favorisierte Reportersystem für eine erfolgreiche Transformation stellte ein GFP (**G**reen **F**luorescent **P**rotein) dar, da dieses Genprodukt transgener Pflanzen *in vivo* detektiert werden kann. Auf diese Weise selektierte Pflanzen stehen somit einer Weiterkultivierung zur Verfügung. Das Plasmid pCAMBIA 1302 (CAMBIA, Australien; Roberts *et al.* 1998) enthält *mGFP5* unter dem konstitutiven Promotor CaMV-35S (Franck *et al.* 1980). Für die Detektion stand das Fluoreszenzmikroskop Nikon TE 300 mit einem entsprechenden Filter (Extinktion 340-380 nm, Immission 400 nm) zur Verfügung.

Das Plasmid pCAMBIA 1301 (CAMBIA, Australien; Roberts *et al.* 1998) enthält als ein weiteres Reportersystem ein GUS ( $\beta$ -**G**lucoronidase)-Gen (*gusA*) unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV-35S-Promotors. Zur Betrachtung der in den Transformationsversuchen verwendeten Pflanzen wurde das Binokular Olympus SZH herangezogen.

### 2.16.2 Verwendete Stämme von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformationsversuche wurden die Agrobakterienstämme GV3101 mit dem Helferplasmid pMP90 (Imani) und LBA4404 (Hoekema *et al.* 1983) mit verschiedenen Plasmiden getestet (Tabelle 15). Die Anzucht erfolgte jeweils über Nacht mit entsprechenden Antibiotika in sterilen Glasröhrchen in ca. 5 ml YEB-Medium mit einem pH-Wert von 7,2 (Vorkultur). Die Vorkultur wurde danach in 250-ml-Erlenmeyerkolben und 100 ml YEB-Medium mit einem pH-Wert von 5,6 überimpft (Hauptkultur). Sowohl Vor- als auch Hauptkultur wurden im Schüttelinkubator (3031, GFL) bei 200 rpm und 28 °C kultiviert. In der Vorkultur wurde zudem 20 µM, in der Hauptkultur 200 µM Acetosyringon (Sigma) zugesetzt. Bei allen Versuchen dienten sowohl der jeweilige Agrobakterien-Wildtyp (Agrobakterienstamm ohne binäres Plasmid) als auch das Infiltrationsmedium incl. eventueller Zusätze als Kontrollen.

**Tab. 15) Verwendete Agrobakterien-Stämme mit Resistenzen und verwendeten Antibiotika-Konzentrationen**

Agrobakterien-Stamm	Genomische Resistenz	Helferplasmid-Resistenz	Binäres Plasmid + vermittelte Resistenz	Antibiotika-Konzentrationen
GV3101 pMP90	Rifampicin	Gentamycin	-	50 µg/ml Rifampicin 50 µg/ml Gentamycin
GV3101 pMP90	Rifampicin	Gentamycin	pCAMBIA 1302 ( <i>GFP</i> ) Kanamycin (bakteriell) Hygromycin (pflanzlich)	50 µg/ml Rifampicin 50 µg/ml Gentamycin 100 µg/ml Kanamycin
GV3101 pMP90	Rifampicin	Gentamycin	pCAMBIA 1301 ( <i>GUS</i> ) Kanamycin (bakteriell) Hygromycin (pflanzlich)	50 µg/ml Rifampicin 50 µg/ml Gentamycin 100 µg/ml Kanamycin
LBA4404	-	Streptomycin	-	100 µg/ml Streptomycin
LBA4404	-	Streptomycin	pCAMBIA 1302 ( <i>GFP</i> ) Kanamycin (bakteriell) Hygromycin (pflanzlich)	100 µg/ml Streptomycin 100 µg/ml Kanamycin
C58	-	Streptomycin	-	100 µg/ml Streptomycin
C58	-	Streptomycin	pCAMBIA 1301 ( <i>GUS</i> ) Kanamycin (bakteriell) Hygromycin (pflanzlich)	100 µg/ml Streptomycin 100 µg/ml Kanamycin

### 2.16.3 Transformation durch Co-Kultivierung mit Agrobakterien

Die angezogenen Bakterien wurden in 50-ml-Falcon-Gefäße überführt und mit 4000 rpm bei 20 °C für 20 min zentrifugiert. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte in Infiltrationsmedium (Kapitel 2.4), wobei die OD auf 0,8-1,0 eingestellt wurde (Shimadzu). Es folgte eine erneute Inkubation der Bakterien-Kultur für ca. zwei Stunden mit den in Kapitel 2.16.2 genannten Parametern. Die *Wolffia*-Pflanzen (Tabelle 16) wurden in die Agrobakteriensuspension überführt und für 1,5 bis 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Die Co-Kultivierung erfolgte sowohl in Ruhe als auch bei sanftem Schütteln mit 60 rpm. Die Pflanzen wurden in ein Miracloth-Sieb dekantiert, mit sterilem demineralisiertem Wasser gespült und auf MS-Agar mit 200 µg/ml Cefotaxim im Percival-Schrank (Kapitel 2.3.1) für 6-8 Wochen kultiviert.

Diese Methode wurde ebenso mit verletzten *Wolffia*-Pflanzen getestet, wobei die Verletzungen sowohl durch Vortexen mit Korund (30 und 60 Sekunden jeweils im Verhältnis 1:1 zur verwendeten Pflanzenmasse) in 15-ml-Falcons als auch durch Beschuß (Particle Gun, Biolistic PDS-1000/He) mit 0,4- $\mu$ m-Wolfram-Partikeln (Biorad) herbeigeführt wurden. Die Parameter für den Beschuß waren ein Abstand von 9 cm und ein Druck von 1100 psi. Das Pflanzenmaterial wurde zuvor in einer Schicht auf 2 % (w/v) Agarose-Agar ( $\varnothing$  6 cm Petrischale) entsprechend der zu erreichenden Fläche der Partikel plaziert. Zur Herabsetzung der Oberflächenspannung und leichteren Überwindung der hydrophoben Oberfläche der Pflanzen für die Agrobakterien wurde teilweise 0,002 % (v/v) Silwet L-77 zugegeben.

#### 2.16.4 Transformation durch Infiltration mit Agrobakterien

Die in 15-ml-Falcon-Gefäße überführten Pflanzen wurden z. T., wie in Kapitel 2.16.3 beschrieben, mit Korund oder durch Particle Bombardment verletzt und mit 5 ml Agrobakteriensuspension (teilweise mit 0,002 % (v/v) Silwet L-77) versehen. Der Unterdruck (200 atm) wurde zwei mal fünf Minuten angelegt, wobei der Exsikkator (Kartell, Italien) jeweils schnell belüftet wurde. Um möglichst alle Pflanzen in ein Miracloth-Sieb zu überführen und gleichzeitig zu vermeiden, daß die Agrobakterien abgewaschen werden, wurden die im Gefäß verbliebenen Pflanzen mit max. 5 ml Infiltrationsmedium (IM) aus dem Falcon-Gefäß herausgespült. Die Co-Kultivierung erfolgte auf MS-Agar in der Phytokammer (Kapitel 2.3.1). Die durchgeführten Versuche sind in Tabelle 16 dargestellt.

**Tab. 16) Parameter der Transformation von *Wolffia* via Agrobakterien**

p01 = pCAMBIA 1301, p02 = pCAMBIA 1302,  
 WT<sub>G</sub> = Wildtyp *A. tumefaciens* GV3101 pMP90, WT<sub>L</sub> = Wildtyp *A. tumefaciens* LBA4404,  
 WT<sub>C</sub> = Wildtyp *A. tumefaciens* C58  
 IM = Infiltrationsmedium (Kontrolle)  
 L = LBA4404 + entspr. Plasmid, G = GV3101 pMP90 + entspr. Plasmid, C = C58

<b><i>Wolffia</i>-Spezies</b>	<b>durchgeführte Versuche</b>					
<i>W. arrhiza</i> 7193	WT <sub>L</sub>	WT <sub>G</sub>	Lp02	Gp02		IM
<i>W. arrhiza</i> 8272	WT <sub>L</sub>	WT <sub>G</sub>	Lp02	Gp02	Gp01	IM
<i>W. australiana</i>		WT <sub>G</sub>		Gp02	Gp01	WT <sub>C</sub> / Cp01
<i>W. brasiliensis</i>		WT <sub>G</sub>		Gp02	Gp01	IM
<i>W. columbiana</i>		WT <sub>G</sub>		Gp02	Gp01	IM
<i>W. cylindracea</i>		WT <sub>G</sub>		Gp02	Gp01	IM
<i>W. elongata</i>		WT <sub>G</sub>		Gp02	Gp01	IM
<i>W. globosa</i>		WT <sub>G</sub>		Gp02	Gp01	IM
<i>W. microscopica</i>		WT <sub>G</sub>		Gp02	Gp01	IM
<i>W. neglecta</i>		WT <sub>G</sub>		Gp02	Gp01	IM

Parallel zur Transformation von *Wolffia*-Pflanzen wurden kleine sterile Tabakblätter (*Nicotiana tabacum*) in 15-ml-Falcon-Gefäßen mit ca. 10 ml Agrobakteriensuspension infiltriert. Hierfür wurde der Stamm GV3101 pMP90 mit dem Plasmid pCAMBIA 1302 verwendet. Die transiente

Transformation dieses Materials sollte als Kontrolle für die Infiltration und als Referenz für die GFP-Expression dienen und wurde parallel zu der Infiltration der *Wolffia*-Pflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wurden im Anschluß an die Infiltration auf MS-Agarplatten in der Phytokammer (Kapitel 2.3.1) weiterkultiviert und nach drei Tagen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon TE 300) mit dem Filtersatz 340-380 nm (Emission) und 400 nm (Immission) auf eine GFP-Expression untersucht.

Die Versuche zur Infiltration mit *A. tumefaciens* C58 als Wildtyp und mit dem binärem Plasmid pCAMBIA 1301 fanden ausschließlich mit *W. australiana* statt. Zudem wurde keine Cefotaxim-Behandlung zum Abtöten der Agrobakterien durchgeführt. Die Co-Kultivierung der drei mal sechs Minuten infiltrierte Pflanze (ca. 200 atm) erfolgte auf SH-Medium in 6-Well-Platten im Percival-Kulturschrank (Kapitel 2.3.1). Bei den so behandelten Pflanzenkulturen wurden nach einem Zeitraum zwischen sechs und 28 Tagen eine Gesamtproteinisolation (Kapitel 2.17.6) sowie eine RNA-Isolation vorgenommen (Kapitel 2.17.3).

### **2.16.5 Transformation mittels Agrobakterien-Injektion (Agroinjektion)**

Die im Hause entwickelte Methode der Agroinjektion in *Wolffia*-Pflanzen (Boehm, unpubl. Daten) wurde ebenfalls an mehreren *Wolffia*-Spezies getestet (Tabelle 17). Hierzu wurde die Agrobaktériensuspension mit unveränderter OD mittels einer von Hand ausgezogenen feinen Kapillare unter dem, mit einer Mikroinjektions-Anlage ausgestatteten, Binokular (Olympus SZH) direkt in die meristematische Zone der Fronds injiziert. Die Injektionssuspension wurde teilweise mit 0,5 % (v/v) Mazerozym supplementiert, um den Agrobakterien durch ein leichtes Andauen der Zellwand den Zugang zu den Zellen zu erleichtern. Die Fixierung der *Wolffia*-Pflanzen war durch die Einbettung in 1,75 %ige Agarosetropfen gewährleistet. Nach drei- bis sechstägiger Co-Kultivierung (Percival-Kulturschrank) mit den Agrobakterien wurde jede Pflanze aus der Agarose entnommen, in 50 ml Medium (150-ml-Erlenmeyerkolben) überführt und für drei bis zwölf Tage einer Cefotaxim-Behandlung (250 µg/ml) unterzogen. Danach erfolgte ein Umsetzen der Pflanzen in Medium ohne Antibiotikum. Bei z. T. auftretenden Kontaminationen wurden die potentiell transgenen Pflanzen mit unterschiedlichen Antibiotika kultiviert. Nach sechs bis zwölf Wochen Regenerationszeit wurden 50 % einer Charge einem Selektionsdruck von 100 µg/ml (*W. columbiana*, *W. brasiliensis*) oder 300 µg/ml (*W. australiana*) Hygromycin B ausgesetzt und die potentiell transgenen Pflanzen unter Starklichtbedingungen (6400 Lux) 2 bis 14 Tage im Percival-Kulturschrank (Kapitel 2.3.1) kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Pflanzen auf Medium (SH bzw. CHU) ohne Selektionsantibiotikum umgesetzt, um der Kultur eine Revitalisierungszeit vor der GUS-Färbung zu ermöglichen. Die verbleibende Hälfte der Charge, die nicht einer Selektion

unterworfen wurde, diente der Erhaltung. Teile aus dieser Erhaltungs-Kultur sind z. T. einem GUS-Expressionstest unterzogen worden.

**Tab. 17) Transformationparameter der Agrobakterien-Injektion**

Alle Versuche wurden mit *A. tumefaciens* GV3101 pMP90/pCAMBIA 1301 und dem *A. tumefaciens*-Wildtyp durchgeführt.

Bei 50 % jeder Pflanzencharge sind zur Injektionssuspension jeweils 0,5 % (v/v) Mazerozym gegeben worden.

Im Anschluß an die Co-Kultivierung wurde allen Kulturen 200 µg/ml Cefotaxim zugesetzt.

a: Das Selektionsmedium wurde alle 2-3 Tage erneuert, um negative Rückkopplungseffekte durch absterbende Pflanzen zu vermeiden.

b: Die Pflanzen wurden für die Selektion auf ein größeres Volumen verteilt (3 x 50 ml), um negative Rückkopplungseffekte durch absterbende Pflanzen auszuschließen.

c: Selektion auf Grund von Kontamination nicht möglich → GUS-Färbung ohne Selektion

d: Pflanzen mit abnehmender Vitalität → GUS-Färbung ohne Selektion

Versuchs Nr.	<i>Wolffia</i> -Spezies	Co-Kultivierung [Tage]	Dauer der Cefotaxim-Behandlung [Tage]	Erfolgreich resterilisiert	Hygromycin-Konz. [µg/ml]	Dauer der Selektion [Tage]
1	<i>W. australiana</i>	3	7	ja	300	14
2	<i>W. australiana</i>	3	7	ja	300	14
3	<i>W. australiana</i>	5	9	ja	100	7
4	<i>W. australiana</i>	5	9	ja	100	7
5	<i>W. australiana</i>	5	9	ja	100	7
6	<i>W. australiana</i>	3	12	ja	100	7
7	<i>W. australiana</i>	3	12	ja	100	7
8	<i>W. brasiliensis</i>	6	7	nein (Pilz)	100	10 <sub>a</sub>
9	<i>W. brasiliensis</i>	6	7	ja	100	10 <sub>a</sub>
10	<i>W. australiana</i>	3	4	ja	100	8 <sub>b</sub>
11	<i>W. brasiliensis</i>	3	3	ja	100	6 <sub>b</sub>
12	<i>W. brasiliensis</i>	3	3	nein (Pilz)	c	c
13	<i>L. minor</i>	3	5	nein (Pilz)	c	c
14	<i>L. minor</i>	3	5	nein (Pilz)	c	c
15	<i>W. brasiliensis</i>	4	4	nein (Bakt.)	c	c
16	<i>W. brasiliensis</i>	4	4	nein (Bakt.)	c	c
17	<i>W. australiana</i>	4	5	nein (Bakt.)	c	c
18	<i>W. australiana</i>	4	5	nein (Bakt.)	c	c
19	<i>W. columbiana</i>	4	7	nein (Pilz)	c	c
20	<i>W. columbiana</i>	4	7	nein (Pilz)	c	c
21	<i>W. columbiana</i>	3	7	nein (Pilz)	c	c
22	<i>W. columbiana</i>	3	7	nein (Pilz)	c	c
23	<i>W. cylindracea</i>	4	11	ja	d	d
24	<i>W. cylindracea</i>	4	11	ja	d	d
25	<i>W. australiana</i>	3	5	ja	100	3
26	<i>W. australiana</i>	3	5	ja	300	8
27	<i>W. cylindracea</i>	3	5	nein (Bakt.)	c	c
28	<i>W. cylindracea</i>	3	5	nein (Bakt.)	c	c
29	<i>W. brasiliensis</i>	6	10	ja	100	7
30	<i>W. brasiliensis</i>	6	10	ja	100	2

Tabelle 17a gibt die Anzahl der tatsächlich behandelten Fronds sowie deren Anteile an einer Mazerozymbehandlung wieder. Eine genaue Erfassung der tatsächlich kultivierten Pflanzenanzahl war unmöglich, da zum einen die Einbettung der Fronds in die Agar-Tropfen bedingte, daß nicht



100 % der Pflanzen injiziert werden konnten, zum anderen war die Wachstumsdynamik der Kultur nicht zu verfolgen.

**Tab. 17a) Gesamtzahl der mit Agrobakterien injizierten *Wolffia*-Pflanzen und deren Anteile an einer Mazerozymbehandlung (Maz)**

Spezies	$\Sigma$ injizierter Pflanzen	
	mit Maz	ohne Maz
<i>W. australiana</i>	1735	
	312	1423
<i>W. brasiliensis</i>	1438	
	577	861
<i>W. columbiana</i>	1178	
	622	556
<i>W. cylindracea</i>	844	
	420	424

## 2.17 Nachweise transgener Pflanzen

Die Nachweise für transgene *Wolffia*-Pflanzen wurden durch X-Gluc-Färbung, DNA-/ bzw. RNA-Isolation mit anschließender (RT-) PCR sowie durch Proteinuntersuchungen durchgeführt.

### 2.17.1 Nachweis der Transformanten durch X-Gluc-Färbung

Die Substanz 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (X-Gluc) führt als Bestandteil einer Färbelösung (Kapitel 2.4.3) zu einem blauen Farbumschlag. Als Voraussetzung hierfür muß das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase anwesend sein, welches das Molekül  $\beta$ -Glucuronosid spaltet. Der so entstandene blaue Enzym-Substrat-Komplex repräsentiert transgene Zellen.

Für die Durchführung der X-Gluc-Färbung wurde ca. ein Drittel der betreffenden Pflanzencharge mittels eines Spatels in Petrischalen (5 cm Durchmesser) überführt. Das Volumen der zugegebenen Färbelösung mußte so gewählt sein, daß die Pflanzen vollständig bedeckt waren. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und am folgenden Tag unter dem Binokular ausgewertet.

### 2.17.2 DNA-Extraktion aus einer *Wolffia*-Pflanze

Eine *Wolffia*-Pflanze wurde in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Eppendorf-Mikrohomogenisator aus Kunststoff gequetscht. Das Pflanzenmaterial konnte danach in 20  $\mu$ l Extraktionspuffer (+ 2  $\mu$ l 20 %ige (w/v) SDS-Lösung, Kapitel 2.4) aufgenommen werden. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 65 °C wurden 10  $\mu$ l einer 5 M Kaliumacetatlösung hinzugegeben und der Ansatz für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Der Überstand nach der Zentrifugation (5 Minuten, 14000 rpm, 4 °C) wurde in ein neues 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 17,5  $\mu$ l Isopropanol versetzt, vorsichtig invertiert und weitere fünf Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (30 Minuten, 14000 rpm, 4 °C) konnte der Überstand verworfen werden. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit 70 %igem (v/v), eiskaltem Ethanol gewaschen, abschließend getrocknet und in 5 µl demin. Wasser aufgenommen. Die resuspendierte DNA lagerte bis zur Verwendung bei 4 °C.

Da die DNA-Menge aus einem einzigen Frond nicht für ein analytisches Agarose-Gel ausreichte, wurde der Erfolg der Extraktion über eine PCR-Reaktion (Techne, Kapitel 2.3.2) mit der isolierten DNA und RubisCo-Primern überprüft.

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden folgende Komponenten eingesetzt:

- 1 µl Template (1:10 Verdünnung)
- 5 µl Primer for (10 pM)
- 5 µl Primer rev (10 pM)
- 0,3 µl dNTPs
- 2 µl MgCl<sub>2</sub> (Ampliqon)
- 2 µl 10 x Puffer (Ampliqon)
- 0,3 µl Taq-Polymerase (Ampliqon, 1500 u)
- 4,4 µl H<sub>2</sub>O

### **2.17.3 RNA-Isolation aus *W. australiana***

Alle Utensilien sind, wenn möglich, eine Stunde bei 121 °C autoklaviert worden, um RNase-Freiheit zu gewährleisten. Verwendet wurden das Shredder-Kit und das RNA-Isolationskit von Qiagen. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Ca. 50 *W. australiana*-Pflanzen wurden mit einem Spatel in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt, in die zuvor 50 µl Aufschlußpuffer gegeben worden waren. Die Homogenisation des Pflanzenmaterials erfolgte mit einem spitz zulaufenden Eppendorf-Homogenisator. Nach der Zugabe weiterer 450 µl Aufschlußpuffer wurden die Proben kurz anzentrifugiert bevor die Lyse bis maximal drei Minuten bei 56 °C im Wasserbad fortgesetzt wurde. Alle weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde, falls nicht sofort verwendet, bei -80 °C gelagert und zur weiteren Untersuchung auf Eis erneut aufgetaut. Für die stabile Lagerung wurde zusätzlich ein RNase-Inhibitor verwendet.

### **2.17.4 Reverse-Transkription (RT)**

Für die Durchführung der RT-Reaktion wurde das Sensiskript-Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl, wovon 7 µl RNA-Template und 5 µl [10 pM Arbeitslösung) eines Oligo-dT-17-Primers (MWG) eingesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei 37 °C.

### **2.17.5 Nachweis transgener Pflanzen durch PCR auf DNA bzw. cDNA**

Der Nachweis der Transgenität wurde über eine PCR auf das *gusA*-Gen nach dem in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt, wobei das Plasmid pCAMBIA 1301 als Template für die Positivkontrolle diente. Die Negativkontrolle für Agrobakterien wurde, falls notwendig, mittels einer PIC-PCR (Protokoll analog) durchgeführt. Die PIC-Region ist Teil einer nativen Gen-Kassette in Agrobakterien (Rong *et al.* 1991). Eine In-Cell-PCR des Agrobakterien-Wildtyps wurde als Positivkontrolle der PIC-PCR herangezogen. Ein Ansatz ohne Template diente als Negativkontrolle der PCR. Im Falle der PCR auf cDNA wurde ein Template aus der RNA-Isolation (Kapitel 2.17.3) als zusätzliche Kontrolle herangezogen. Die Amplifikationen wurden mittels Gelelektrophorese (0,8 %iges Agarose-Gel) überprüft.

### **2.17.6 Proteinuntersuchungen**

Für die Untersuchungen auf Proteinebene wurden nach einer Proteinisolation sowohl der Gesamtproteingehalt nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt als auch ein MUG-Assay (Jefferson *et al.* 1987) durchgeführt.

#### **2.17.6.1 Proteinisolation aus *W. australiana***

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Pflanzen wurden mit 1 ml Exreaktionspuffer und wenigen Körnchen Quarzsand in eine Mörserschale gegeben und mehrere Minuten homogenisiert. Nach der Überführung des Pflanzenmaterial in 2,5 ml-Eppendorfgefäße und anschließender Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4 °C) konnte der proteinhaltige Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß transferiert werden. Der Gesamtproteingehalt wurde anschließend in einer Dreifachbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) gemessen. Die Lagerung des Proteinextraktes erfolgte bei –20 °C.

#### **2.17.6.2 MUG-Assay**

Der MUG (4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid)-Assay dient der Quantifizierung der β-Glucuronidase-Expression (*gus*-Gen) in Pflanzen, welche in transgenem Material als

überdurchschnittlich angenommen wird. Das Enzym spaltet Glucuronsäure vom Methylumbelliferyl ab, welches durch seine nun erworbene Fluoreszenzfähigkeit nachgewiesen werden kann (Jefferson *et al.* 1987). Hierzu wurde 1 ml Proteinextrakt in einem 2,5 ml-Eppendorfgefäß mit 500 µl MUG-Lösung vermischt und anschließend für 15 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach dem Hinzufügen der Stopplösung konnten die Proben in 1 ml-Küvetten (Brandt) überführt und im Fluorometer gemessen werden. Bei allen Versuchen ist eine Dreifachbestimmung durchgeführt worden. Den Berechnungen lag folgende Formel zu Grunde:

$$\text{GUS/mg Protein [ng]} = \frac{\text{Absorption} * 2,47 * 10^{-7}}{\text{Protein [mg]}}$$

Der verwendete Faktor bezieht sich auf eine zuvor durchgeführte Eichreihe (Dresen-Scholz, pers. Mitteilung).

### **2.18 Kallusinduktion von *Wolffia*-Pflanzen**

Pflanzen der Spezies *W. brasiliensis* und *W. australiana* wurden mit Hilfe eines Rundspatels in einer Lage auf die Agarplatten (Ø 11 cm) mit verschiedenen Phytohormonen (Kallusinduktion bei pH 6) gegeben (Tabelle 18) und vorsichtig angedrückt, so daß ein ausreichender Kontakt zum Medium sichergestellt werden konnte. Zudem sind die Fronds teilweise mittels einer sterilen Rasierklinge verletzt worden. Die Inkubation der Pflanzen erfolgte im Doppelansatz im Percival-Kulturschrank (Kapitel 2.3.1). Ein Ansatz wurde im normalen Licht-/Dunkelrhythmus des Kulturschranks gehalten, während der andere Ansatz, in einer Box verschlossen, in Dunkelheit belassen wurde. Nach neun Wochen wurde der Zustand der Pflanzen final dokumentiert. *W. australiana*-Fronds wurden zudem nach sechs Wochen auf ein Regime umgesetzt, welches eine geringere Konzentration an Phytohormonen aufwies (Kalluserhaltung bei pH 6).

Einige kallöse Strukturen sind zwei bis drei Tage mit Agrobakterien (GV3101 pMp90/pCAMBIA 1301) co-kultiviert (Kapitel 2.16.3) und abschließend einer X-Gluc-Färbung (Kapitel 2.17.1) unterworfen worden.

**Tab. 18) Unterschiedliche Phytohormon-Regime (pH 6) zur Kallusinduktion und Kalluserhaltung für *W. australiana* und *W. brasiliensis***

MS = Murashige-Skoog-Medium, SH = Schenk- & Hildebrandt-Medium

SHI = Shoot-Induction-Medium

Alle Kombinationen (außer SHI) sind ebenso ohne Saccharosezusatz getestet worden.

Grundmedium	Kallusinduktion mit	Kalluserhaltung durch
SH	10 µM 2,4-D 1 µM Kinetin 2 % (w/v) Saccharose	1 µM 2,4-D 0,1 µM Kinetin 1 % (w/v) Saccharose
SH	10 µM 2,4-D 1 µM BAP 2 % (w/v) Saccharose	1 µM 2,4-D 0,1 µM BAP 1 % (w/v) Saccharose
SH	10 µM NAA 1 µM Kinetin 2 % (w/v) Saccharose	1 µM NAA 0,1 µM Kinetin 1 % (w/v) Saccharose
SH	10 µM NAA 1 µM BAP 2 % (w/v) Saccharose	1 µM NAA 0,1 µM BAP 1 % (w/v) Saccharose
DM	10 µM 2,4-D 1 µM Kinetin 2 % (w/v) Saccharose	1 µM 2,4-D 0,1 µM Kinetin 1 % (w/v) Saccharose
DM	10 µM 2,4-D 1 µM BAP 2 % (w/v) Saccharose	1 µM 2,4-D 0,1 µM BAP 1 % (w/v) Saccharose
DM	10 µM NAA 1 µM Kinetin 2 % (w/v) Saccharose	1,0 µM NAA 0,1 µM Kinetin 1 % (w/v) Saccharose
DM	10 µM NAA 1 µM BAP 2 % (w/v) Saccharose	1,0 µM NAA 0,1 µM BAP 1 % (w/v) Saccharose
MS	1 mg/l BAP 0,1 mg/l NAA 30 g/l (w/v) Saccharose (= SHI-Medium)	1 mg/l BAP 0,1 mg/l NAA 30 g/l (w/v) Saccharose (= SHI-Medium)

### 3. Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse dienen dem Ziel, das Expressionssystem „*Wolffia*“ im Hinblick auf die angestrebte Produktion von pharmazeutisch relevanten Proteinen in Bioreaktoren zu optimieren. Die Evaluierung grundlegender Parameter wie das Verhalten unter Laborbedingungen, wobei ebenso die Fermentationstauglichkeit beachtet wurde, sowie Wachstum und Transformierbarkeit sollten die für die Zielsetzung des Projekts am besten geeignete Spezies identifizieren.

#### 3.1 Vitalitätsmessung von *Wolffia* mit dem PAM-2000

Um neben der subjektiven Bonitur der Pflanzenkulturen meßbare, objektive Daten generieren zu können, wurde das Fluoreszenzmeter PAM-2000 der Firma Walz (Effeltrich) getestet.

Das PAM-2000 ist geeignet, die Intaktheit der Elektronentransportkette zu ermitteln (Kapitel 2.9) und liefert reproduzierbare Aussagen über die Pflanzenvitalität. Je nach *Wolffia*-Spezies konnten optimale Yield-Werte zwischen 0,65 und 0,75 ermittelt und mit den Boniturdaten korreliert werden. Es zeigte sich, daß hohe Yield-Werte eine hohe Pflanzenfitness bedeuten, wohingegen abnehmende Pflanzenvitalität am sinkenden Yield-Wert abgelesen werden konnte, bevor das Absterben der Kultur z. B. an aufgehellten Fronds optisch sichtbar wurde (Kapitel 4.2.3). Die PAM-gestützten Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

#### 3.2 Kulturmedien und Kulturgefäße zur Anzucht von *Wolffia spec.*

Die Eignung verschiedener Kulturmedien zur Anzucht diverser *Wolffia*-Spezies wurde über verschiedene Methoden evaluiert: Zum einen durch eine einfache optische Bonitur (Kapitel 2.8), zum anderen durch die Errechnung des Yield-Wertes mittels des Fluoreszenzmeters PAM-2000 (Kapitel 2.9). Mit dieser Meßmethode war es möglich, eine sehr schnelle und objektive Aussage über die Pflanzenvitalität machen zu können. Der Scannalyzer (Kapitel 2.13.5) der Firma Lemnatec kam zum Einsatz, um über die Messung der Pflanzenwachstumsrate, neben dem Medium, auch verschiedene Kulturgefäße auf ihre Eignung für die *Wolffia*-Kultivierung zu ermitteln.

##### 3.2.1 Bonitur von *Wolffia* auf verschiedenen Kulturmedien

Für die Evaluierung eines optimalen Nährmediums für jede *Wolffia*-Spezies wurden Versuche mit 1/10-Hutner-, SH- sowie CHU-Medium durchgeführt. Für diese ersten Versuche sind 6-Well-Platten (mit 10 ml Mediums-Volumen) als Kulturgefaß herangezogen worden. Zu einem

späteren Zeitpunkt wurde Growth-Medium in die Versuchsreihen integriert. Als Parameter für die optische Bonitur über einen Zeitraum von vier Wochen wurden der individuelle Farbphänotyp und das Frondwachstum herangezogen (Kapitel 2.8).

Die z. T. leicht aufgehellten *Wolffia*-Pflanzen begannen unmittelbar nach der Entnahme aus den Schrägagarröhrchen (Kapitel 2.2) mit vegetativem Wachstum. Der überwiegende Anteil der *Wolffia*-Spezies (*W. australiana*, *W. brasiliensis*, *W. cylindracea*, *W. globosa* und *W. neglecta*) gedieh nach vierwöchiger Kultivierung in SH-Medium gut bis sehr gut. CHU-Medium erwies sich für *W. columbiana* als sehr gut geeignet; *W. cylindracea* zeigte in CHU-Medium ebenfalls ein sehr gutes Wachstum. *W. angusta*, *W. arrhiza* 7193 und 8272 sind auf 1/10 Hutner-Medium als sehr gut beurteilt worden. Für *W. neglecta* konnte kein sehr gut geeignetes Medium identifiziert werden; das Wachstum war sowohl auf 1/10-Hutner-Medium als auch auf SH-Medium maximal gut (Tabelle 19).

**Tab 19) Boniturergebnisse nach ein-, zwei- und vierwöchiger Kultivierung der Pflanzen im jeweiligen Medium**

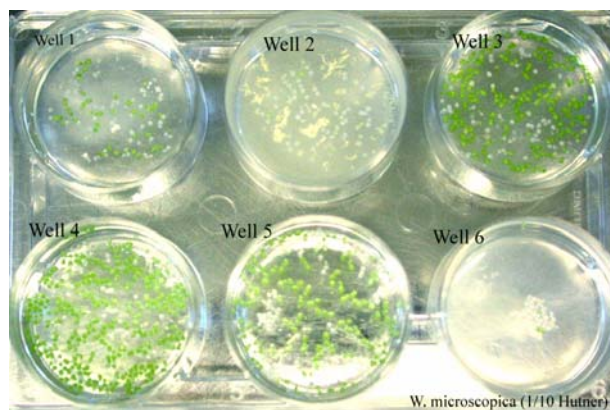
+++ = optimaler Farbphänotyp, deutliches Frondwachstum  
 ++ = deutliche Aufhellung des Grüntons gegenüber dem optimalen Phänotyp, weniger Frondwachstum  
 + = sehr stark aufgehellt, gelblich bis weiße Verfärbung, kaum noch Frondwachstum  
 - = nur noch vereinzelte bis gar keine grünen Pflanzen, Verbräunung, kein Frondwachstum  
*W. borealis* und *W. microscopica* waren zum Versuchsbeginn nicht verfügbar.

<i>Wolffia</i> -Spezies nach Woche	1/10-Hutner			CHU			SH		
	1	2	4	1	2	4	1	2	4
<i>W. angusta</i>	+++	+++	+++	+	+	-	+++	+	-
<i>W. arrhiza</i> 7193	++	++	+++	++	++	++	++	++	++
<i>W. arrhiza</i> 8272	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++
<i>W. australiana</i>	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
<i>W. brasiliensis</i>	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++
<i>W. columbiana</i>	+	+	+	+++	+++	+++	+	+	+
<i>W. cylindracea</i>	+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++
<i>W. elongata</i>	+	+	+	+	+	+	++	+++	+++
<i>W. globosa</i>	-	-	-	-	-	-	++	++	++
<i>W. neglecta</i>	++	++	++	+	-	-	++	++	++

In späteren Versuchen, in denen auch Growth-Medium (GM) getestet wurde, sind ausgehend von den ersten Boniturergebnissen *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* als sehr gut beurteilt worden. Habitus und Wachstum waren in der ersten Woche deutlich besser als Pflanzen aus Medien wie CHU- oder SH-Medium. Nach zweiwöchiger Kultivierungsdauer erwies sich jedoch das GM als ungeeignet, da die Pflanzen stark aufgehellt waren und einen kugelförmig gequollenen Habitus entwickelten, der aus einem abnormen Wachstumsverhalten resultierte.

Da *W. borealis* den Transfer von Fest- auf Flüssigmedium nicht überlebte und auf neuem Festmedium (1/10-Hutner) ebenfalls nicht dauerhaft kultivierbar war, kann davon ausgegangen werden, daß der Klon 9143 extrem streßanfällig ist und somit den für das Projekt grundlegenden Laboransprüchen nicht genügt.

Da *W. microscopica* erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung stand, wurde das Kulturmedium für diese Spezies in einem separatem Versuch evaluiert: Aus einem vierwöchigen Kultivierungsversuch mit sechs Medien (Landolt-Medium (LM), LM ohne Saccharose, SH, ½ SH, 1/20 Hutner und CHU) ist ½ SH nach der Boniturbewertung als geeignetes Medium für *W. microscopica* befunden worden (Abbildung 15).



**Abb. 15** *W. microscopica* in verschiedenen Kulturmedien nach einer Kultivierungszeit von vier Wochen

Well 1 = LM, Well 2 = LM ohne Saccharose, Well 3 = SH,  
Well 4 = ½ SH, Well 5 = 1/20 Hutner, Well 6 = CHU

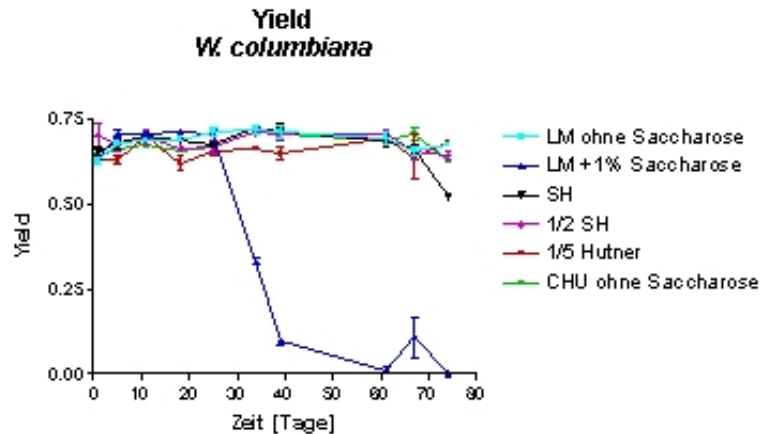
### 3.2.2 Kulturmedienversuch und PAM-2000-Messung für *W. columbiana*

Um auf einen objektiven Vitalitätsparameter zurückgreifen zu können, wurde der Einfluß verschiedener Medien auf die Vitalität von *W. columbiana* mittels des Fluoreszenzometers PAM-2000 (Kapitel 2.9) gemessen.

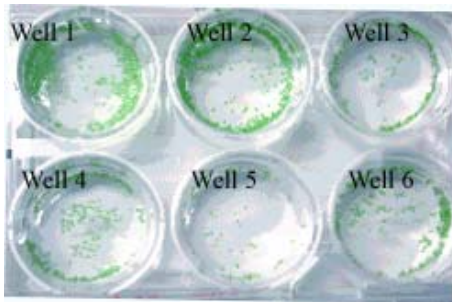
*W. columbiana* wurde über einen Zeitraum von 74 Tagen in 6-Well-Platten mit verschiedenen Medien (LM ohne Saccharose, LM mit 1 % (w/v) Saccharose, SH, ½ SH, 1/5 Hutner und CHU-Medium) kultiviert und die Vitalität mit dem Fluoreszenzometer PAM-2000 gemessen. Mit Ausnahme der Pflanzen auf LM mit 1 % (w/v) Saccharose erhielten alle Medien für *W. columbiana* über den gesamten Versuchszeitraum konstant einen guten bis sehr guten Yield-Wert zwischen 0,517 und 0,734 (Abbildung 16a). Nach vier Wochen sank der Yield der Pflanzen auf LM mit 1 % (w/v) Saccharose sehr schnell auf unter 0,1 ab, was in der optischen Beurteilung weißen Pflanzen entsprach (Abbildung 16c).



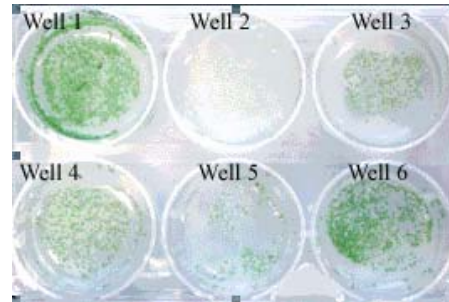
a)



b)



c)



**Abb. 16) PAM-2000-Vitalitätsmessung (a) und digitale Aufnahmen von *W. columbiana* in verschiedenen Kulturmedien am 14. (b) und 69. Versuchstag (c)**

Well 1 = LM ohne Saccharose; Well 2 = LM + 1 % (w/v) Saccharose; Well 3 = SH; Well 4 = 1/2 SH;  
Well 5 = 1/5 Hutner; Well 6 = CHU

Die digitalen Aufnahmen zeigen vom 14. zum 69. Versuchstag deutliche optische Unterschiede, bezogen sowohl auf die Pflanzenmasse als auch auf die Intensität der Grünfärbung. Die Pflanzen in Abbildung 16c in Well 1 (LM ohne Saccharose) und Well 6 (CHU ohne Saccharose) zeigen typisch dunkelgrüne *W. columbiana* mit deutlich mehr Pflanzenmasse als in den anderen Wells. Well 3 (SH) und Well 4 (1/2 SH) weisen vergleichsweise weniger Zuwachs auf. Zudem erscheinen die Pflanzen leicht aufgehellt. Einfüntel Hutner-Medium (Well 5) führt bei *W. columbiana* zu keiner atypischen Aufhellung, jedoch ist nur ein minimales Pflanzenwachstum zu beobachten. Der abfallende Yield-Wert in LM mit 1 % (w/v) Saccharose spiegelt sich in den digitalen Aufnahmen (z. B. Well 2) wieder: Es sind keine grünen Pflanzen mehr vorhanden. Dem relativ geringen Unterschied der Pflanzen im Yield-Wert aus verschiedenen Medien muß demnach hohe Bedeutung beigemessen werden. Bei genauer Betrachtung läßt sich feststellen, daß die optisch

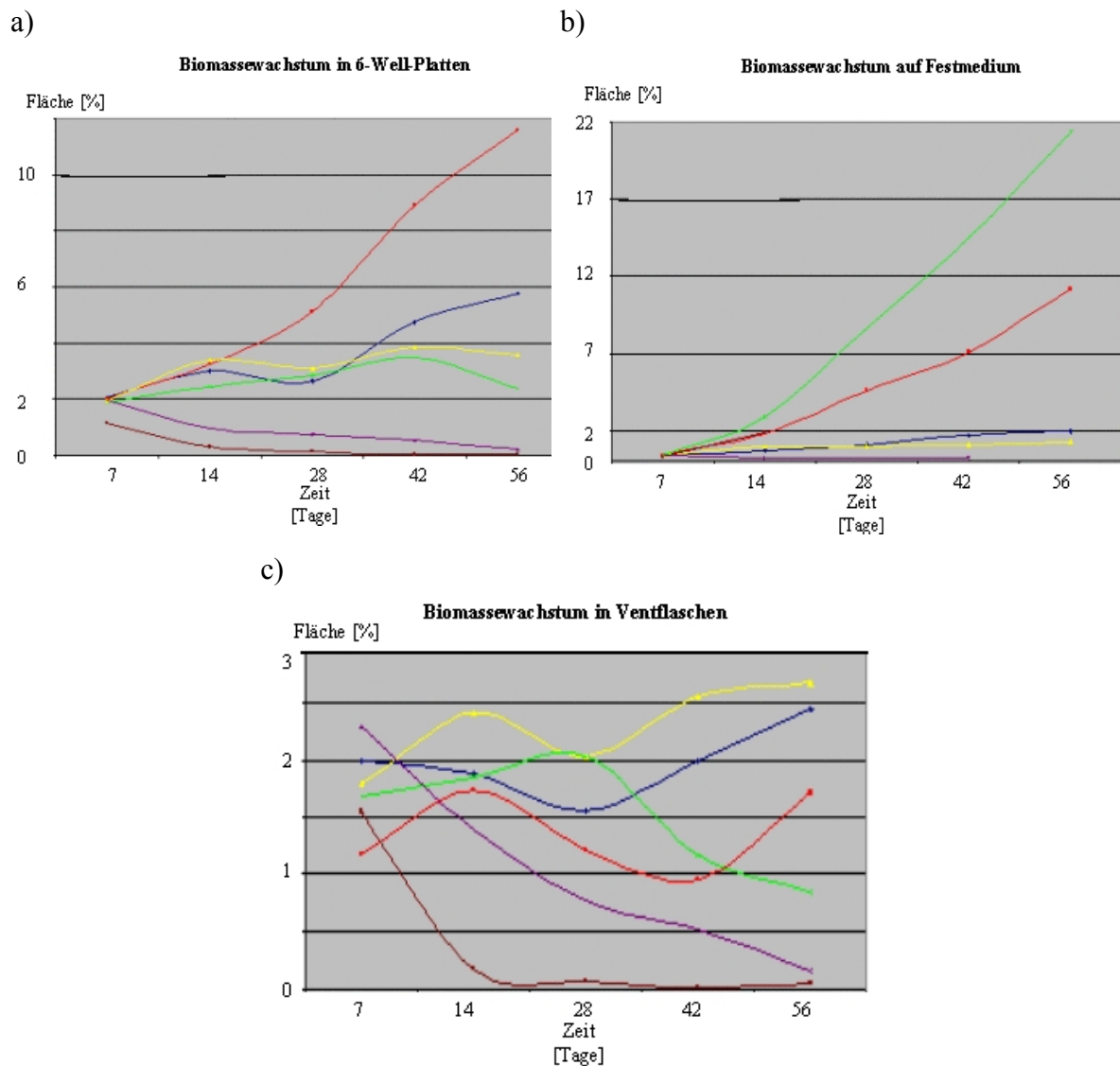
sehr gut beurteilten Wells (1 und 6) auch die höchsten Yield-Werte aufweisen, wohingegen die Wells 3, 4 und 5 diese Maximalwerte nicht erreichen.

Generell kann gesagt werden, daß das Fluoreszenzometer PAM-2000 als ein sehr gut geeignetes Meßinstrument zur Bestimmung der Vitalität von *Wolffia spec.* herangezogen werden kann.

### 3.2.3 Medien- und Kulturgefäßversuche mit dem Scannalyzer

Um eine Aussage über den möglichen Einfluß der Medien unter zusätzlicher Berücksichtigung der Kulturgefäße treffen zu können, wurde der Versuch unternommen, Wachstumsdaten von *W. columbiana*, *W. microscopica* und *W. arrhiza* 8272 mit dem Scannalyzer zu ermitteln. Die Absicht war, die subjektive optische Bonitur durch eine objektive Datenerhebung zu ergänzen. Getestet wurden 6-Well-Platten, Petrischalen mit Festmedium sowie Ventflaschen. Die in den nachfolgenden Abbildungen (17a bis c) gezeigten Daten zeigen den Mittelwert des Biomassewachstums aus jeweils drei Parallelansätzen. Der Ausgangsdeckungsgrad auf den Festmediumplatten betrug bei allen Spezies ca. 0,5 %.

*W. columbiana* erreichte nach 56 Tagen auf CHU-Medium im Durchschnitt einen Oberflächendeckungsgrad von 11,5 %, auf 1/10-Hutner-Medium dagegen nur 5,8 %, was einer Netto-Zunahme von 475 % bzw. 190 % entspricht. Im gleichen Zeitraum bewuchs *W. arrhiza* 8272 auf CHU- und 1/10-Hutner-Medium nur zwischen 2,2 % und 3,8 % der Oberfläche (Netto-Zuwachs von 90 % auf 1/10-Hutner-Medium bzw. 10 % auf CHU-Medium). Im Gegensatz zu *W. columbiana* und *W. arrhiza* 8272 konnte für *W. microscopica* in keinem der beiden Medien ein Zuwachs, sondern nur das kontinuierliche Absterben der Pflanzen verzeichnet werden. Weiße Pflanzen sind von der verarbeitenden Software nicht berücksichtigt worden und tragen in dieser Auswertung somit nicht mehr zur Berechnung der Oberflächendeckung bei.



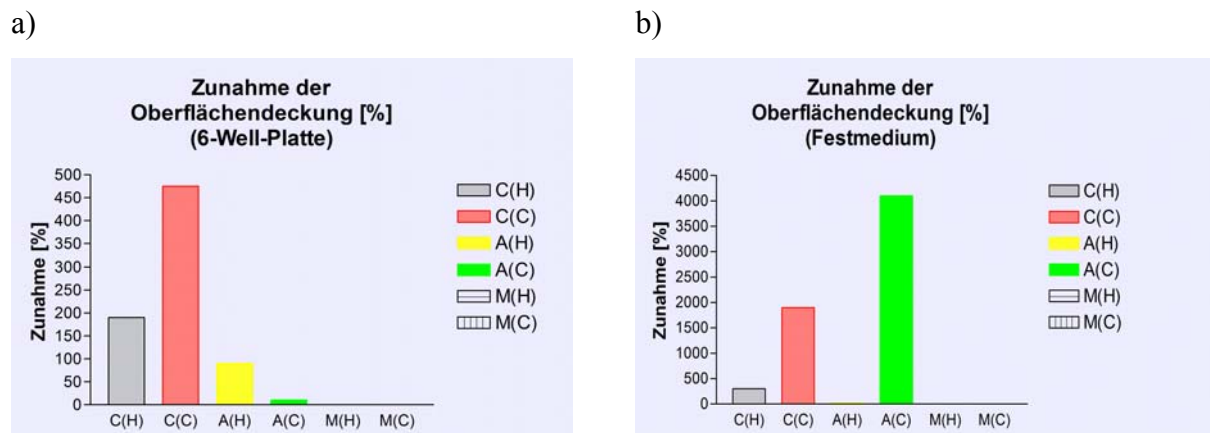
**Abb. 17)** Darstellung des Biomassezuwachses von *W. columbiana*, *W. arrhiza* 8272 und *W. microscopica* in CHU- bzw. 1/10-Hutner-Medium in 6-Well-Mikrotiterplatten (a), auf Festmedium (b) und in Ventflaschen (c)

blau: *W. columbiana*/1/10-Hutner; rot: *W. columbiana*/CHU; gelb: *W. arrhiza* 8272/1/10-Hutner; grün: *W. arrhiza* 8272/CHU; lila: *W. microscopica*/1/10-Hutner; braun: *W. microscopica*/CHU (Originaldaten Lemnatec)

*W. arrhiza* 8272 und *W. columbiana* erreichten nach 56 Tagen 21 % bzw. 10 % Deckungsgrad auf CHU-Festmedium. Dies entspricht einem Netto-Zuwachs von 4100 % bzw. 1900 %. Die Kombinationen *W. arrhiza* 8272 bzw. *W. columbiana* auf 1/10-Hutner-Medium überschritten einen Deckungsgrad von 2 % nicht. *W. microscopica* überlebte diesen Versuch weder auf 1/10-Hutner- noch auf CHU-Medium (Abbildung 18).

Für *W. microscopica* wurde auch im Ventflaschen-Versuch ein schnelles Absterben beobachtet. *W. columbiana* und *W. arrhiza* 8272 erreichten in keinem Ansatz einen Oberflächendeckungsgrad über 2,5 %. (Abbildung 17c). Die zyklischen Schwankungen beruhen an dieser Stelle auf Meßfehlern des Scannalyzers, die bei solch geringen

Deckungsgraden in diesem Versuchsaufbau nach Angabe des Herstellers gerätspezifisch sein können.



**Abb. 18) Zunahme des Oberflächendeckungsgrades [%] bei *W. columbiana*, *W. arrhiza* 8272 und *W. microscopica* in 6-Well-Platten (a) und auf Festmedium (b) jeweils auf 1/10-Hutner- und CHU-Medium nach 56 Tagen**

C = *W. columbiana*, A = *W. arrhiza* 8272, M = *W. microscopica*  
(H) = 1/10-Hutner-Medium, (C) = CHU-Medium

Als Ergebnis der Scannalyzer-Versuche kann festgehalten werden, daß die Ventflaschen als Kulturgefäß für *W. arrhiza* 8272, *W. columbiana* und *W. microscopica* in CHU- und 1/10-Hutner-Medium ungeeignet sind. Obwohl 6-Well-Platten aufgrund ihrer geringen Größe nur eine beschränkte Möglichkeit für eine Pflanzenvermehrung bieten, sind sie geeignet, für einen relativ langen Zeitraum (> 6 Wochen) zuverlässig Biomassezuwachs zu ermöglichen und zu erhalten. Zur schnellen Pflanzenvermehrung scheinen 1/10-Hutner- und CHU-Festmedium mit einem Zuwachs von bis zu 4100 % hervorragend geeignet zu sein.

Abschließend muß jedoch festgestellt werden, daß *W. arrhiza* 8272 in nachfolgenden Experimenten sehr schlecht auf Festmedium kultivierbar war (Kapitel 4.1.3).

### 3.2.4 Festlegung der Parameter Medium und Kulturgefäß für *Wolffia* spec.

Folgende Medien sind, basierend auf den vorangegangenen Versuchen, für die weitere Pflanzenkultivierung gewählt worden:

<i>W. angusta</i>	1/10-Hutner
<i>W. arrhiza</i> 7193	1/10-Hutner
<i>W. arrhiza</i> 8272	1/10-Hutner
<i>W. australiana</i>	SH
<i>W. brasiliensis</i>	SH

<i>W. columbiana</i>	CHU
<i>W. cylindracea</i>	CHU
<i>W. elongata</i>	SH
<i>W. globosa</i>	SH
<i>W. microscopica</i>	½ SH
<i>W. neglecta</i>	SH

Zudem konnten einige Erfahrungen bezüglich des individuellen Verhaltens der verschiedenen *Wolffia*-Spezies gesammelt werden. *Wolffia spec.* reagiert unterschiedlich auf vorgegebene Laborparameter wie Medium, Kulturgefäß und Handhabung. SH-, CHU- oder 1/10-Hutner-Medium konnten den einzelnen Spezies als geeignetes Kulturmedium zugeordnet werden. Für die standardisierte Kultivierung sind 250-ml-Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Medium gewählt worden. Die Haltung auf Festmediumplatten stellt einen erhöhten Anspruch an die Pflanzen, dem langfristig (> drei Monate) nicht alle Spezies gewachsen waren. Die Anzucht in Ventflaschen für eine kontinuierliche Biomassegewinnung kann als prinzipiell ungeeignet für *Wolffia spec.* betrachtet werden (Kapitel 3.5).

### 3.3 Sterilisationsversuche von *Wolffia spec.*

Schon während der ersten Versuche wurde deutlich, daß die originalen Pflanzen-Chargen nicht als keimfrei betrachtet werden konnten. Um Versuche ohne Kontaminationseinfluß durchführen und somit die erhaltenen Daten vergleichen zu können, wurde versucht, die Keime in den Kulturen zu beseitigen.

Zur Sterilisation der *Wolffia*-Pflanzen wurden verschiedene Reagenzien in Bezug auf ihre Dekontaminationsleistung und Pflanzenverträglichkeit untersucht. Unter Dekontaminationsleistung soll die Fähigkeit der Substanz verstanden werden, die Kontaminationen in den *Wolffia*-Kulturen abzutöten oder zumindest deutlich zu reduzieren. Demineralisiertes Wasser, Ethanol, Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid (Kapitel 2.7.1) wurden ebenso getestet wie Plant Preservative Mixture (Kapitel 2.7.2) und Antibiotika (Kapitel 2.7.4 und 2.7.5). Zudem wurden die Auswirkungen von Algenvernichtungsmittel, pH-Shift und Ultraschall auf die Kontaminationen bakterieller und pilzlicher Art geprüft (Kapitel 2.7.6).

### 3.3.1 Sterilisation mit demineralisiertem Wasser, Ethanol, Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid

Zur Sterilisation der *Wolffia*-Pflanzen wurden verschiedene Substanzen wie steriles demineralisiertes Wasser, Ethanol, Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid evaluiert.

Als Gesamtergebnis dieser Versuche kann festgehalten werden, daß unter den getesteten Parametern und Kultivierungsbedingungen keine nachhaltige Schnittmenge aus Sterilität und Vitalität der Pflanzen in den Protokollen basierend auf Ethanol, Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid gegeben ist. Es wurde deutlich, daß alle Behandlungen mit 70 %igem (v/v) Ethanol ausschließlich zu letalen Pflanzen führen. Behandlungen mit 50 %igem (v/v) Ethanol führten spätestens nach 21 Tagen zum gleichen Resultat. Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid hatten einen sehr hohen Dekontaminationseffekt, nachhaltig überlebten jedoch keine Pflanzen eine langfristige (> vier Wochen) Kultivierung. Da zwischen den einzelnen *Wolffia*-Spezies deutliche Unterschiede in der jeweiligen Verträglichkeit der Sterilisationsagenzien und der Überlebensdauer zu beobachten waren, sind die Einzelergebnisse der durchgeführten Versuche im Folgenden beschrieben.

Durch das Baden bzw. Waschen der Pflanzen in sterilem demineralisiertem Wasser konnte hinsichtlich der Anzahl der Kontaminanten ein deutlicher Verdünnungseffekt erzielt werden, wohingegen Pflanzen aus dem Aquarium ohne Behandlung nach zwei Tagen auf DM-Platte quantitativ stärker kontaminiert waren.

Keine der getesteten *Wolffia*-Spezies überlebte eine Behandlung mit 70 % (v/v) Ethanol, die über eine Minute andauerte. Auch das anschließende Spülen mit Wasser erhöhte die Überlebensquote nicht. Bei weniger als einer Minute Applikation war die Überlebensrate deutlich verbessert, reichte jedoch nicht für eine Dekontamination aus. Das fünfminütige Baden der Pflanzen in 50 % Ethanol und anschließendem Spülen mit Wasser überlebten ca. 20 % der behandelten *W. australiana*. Am 10. Tag auf DM-Medium waren nur noch 7 % des Ausgangsmaterials nicht offensichtlich kontaminiert und grün. Diese Pflanzen, mittlerweile auf Flüssigmedium (SH) umgesetzt und deren Medium z. T. mit Kokosnußwasser supplementiert, waren auch am Tag 17 noch grün und augenscheinlich nicht kontaminiert. Es konnte jedoch kein Wachstum beobachtet werden. Am Ende der dritten Woche waren alle Pflanzen auf den Grund des Kulturgefäßes abgesunken und verbräunt. *W. brasiliensis* überlebte dieses Protokoll nur neun Tage. Für beide Spezies bleibt festzuhalten, daß die Behandlung mit 50 %igem (v/v) Ethanol (fünf bzw. zehn Minuten) einen Dekontaminationseffekt aufweist, die Pflanzen diese Prozedur jedoch nicht nachhaltig überstehen. Wurden die Pflanzen weniger als fünf Minuten dem 50 %igen (v/v) Ethanol

ausgesetzt, konnte keine nachhaltige Dekontamination beobachtet werden, obgleich die Überlebensrate mit bis zu 50 % deutlich größer war.

Das Sterilisationsprotokoll auf Natriumhypochloritbasis für Wasserlinsen (Bowker *et al.* 1980), das mit einer Pflanzenentnahme aus der Bleichlösung in 30-Sekunden-Intervallen arbeitet, resultierte in den von Bowker dokumentierten 4 % überlebenden Pflanzen (hier: *W. arrhiza* 8272 und *W. arrhiza* 7193). Die Fronds waren stark aufgehellt und stagnierten im Wachstum. Nach 19 Tagen zeigten Fronds von *W. arrhiza* 8272 auf DM-Agar keine Kontamination. Sie waren zuvor acht Minuten einprozentiger (v/v) NaOCl-Lösung ausgesetzt. Bei einer zweiprozentigen (v/v) Lösung konnten die ersten Dekontaminationseffekte schon nach drei Minuten Einwirkzeit beobachtet werden, bei 3- bzw. 5 %igen (v/v) Lösungen schon ab der zweiten Entnahme (30 Sekunden). Je höher folglich die Konzentration der Natriumhypochlorit-Lösung, umso kürzer kann die Einwirkzeit für einen deutlichen Sterilisationseffekt sein. Keine der dekontaminierten Pflanzen überlebte die weitere Kultivierung in Growth-Medium, welches in den ersten Tagen der Kultivierung einen positiven Einfluß auf die Vitalität der Pflanzen hatte (Kapitel 3.2.1).

Nach der Sterilisation für drei Minuten mit 15 % bzw. 20 % (v/v) Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) konnte ein Dekontaminationseffekt während der Kultivierung auf DM-Agar beobachtet werden. Die Sterilisation resultierte bei *W. arrhiza* 7193 und *W. columbiana* final jedoch in letal geschädigten Pflanzen. Eine dreiminütige Behandlung von *W. columbiana* mit 10 % (v/v) Wasserstoffperoxid mit vorausgegangener und nachfolgender Spülung mit sterilem demineralisiertem Wasser lieferte nach vier Wochen grüne und vitale Pflanzen, die jedoch teilweise mit einem Pilz kontaminiert waren. Nach dem Umsetzen von DM auf CHU-Fest- bzw. Flüssigmedium starben alle Pflanzen in der nachfolgenden Kultivierung.

Zusammenfassend überlebte weder *W. arrhiza* 7193 noch *W. columbiana* einen Sterilisationsansatz mit Wasserstoffperoxid.

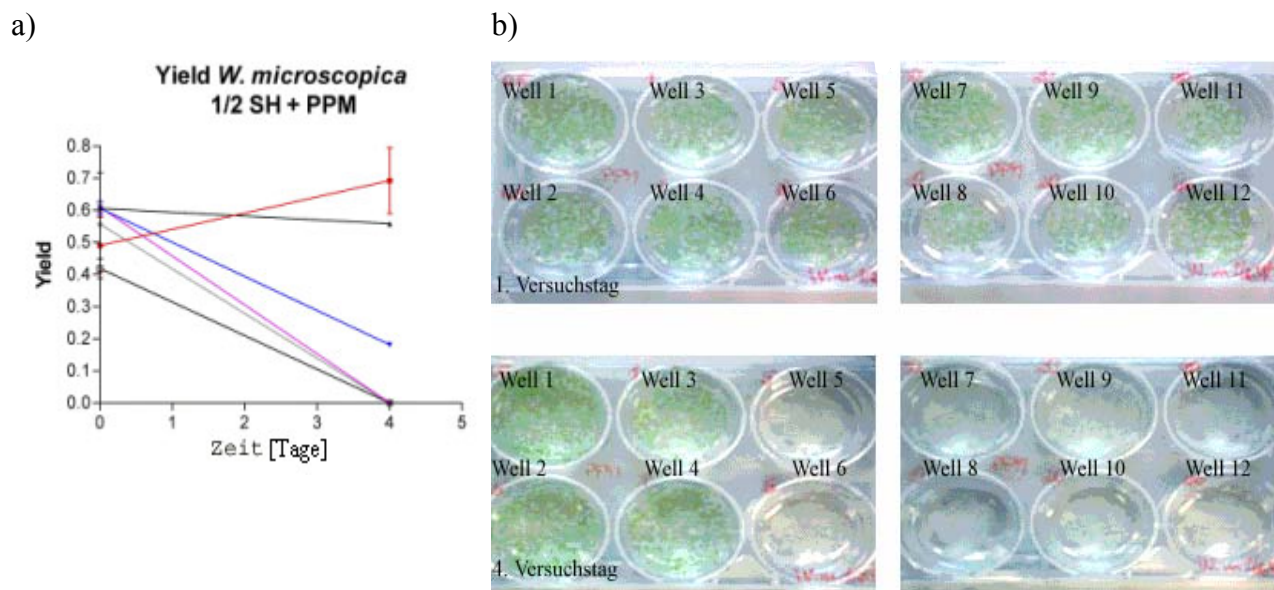
### 3.3.2 Sterilisation mit PPM

Plant Preservative Mixture (PPM) wird in der Literatur als „pflanzenschonendes Dekontaminationsagens auf Bleichbasis“ beschrieben ([www.ppm4plant-tc.com](http://www.ppm4plant-tc.com)). Ein Einsatz in *Wolffia*-Kulturen war deshalb naheliegend. Unter anderem wurde *W. microscopica* als sehr sensible Spezies dem PPM dauerhaft in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt. Neben dem optischen Eindruck wurde der Yield-Wert zur Vitalitätsbestimmung herangezogen. Bei anderen Spezies wurde das Medium nicht dauerhaft mit PPM supplementiert, sondern die

Pflanzen in verschiedenen PPM-Konzentrationen gewaschen und danach auf PPM-freiem Medium kultiviert.

Eine weiterführende Sterilisation nach PPM-Behandlung unter Antibiotikaeinsatz wurde ebenfalls durchgeführt. Hierbei wurden Pflanzen, die in PPM-supplementiertem Medium gewaschen wurden, z. T. in Flüssigmedium belassen oder auf Festmedium mit und ohne Antibiotika-Zusätze überführt (Kapitel 2.7.2).

Die Vitalität von *W. microscopica* wurde in einem einmaligen Versuchsansatz mit den Konzentrationen 0,5/1/5/10/20 und 40 % (v/v) PPM im Medium nach einem Zeitraum von vier Tagen mit dem PAM-2000 gemessen. Konzentrationen ab 5 % (v/v) PPM überlebten die Pflanzen bis zum Ende des vierten Versuchstages nicht. Ab einer 5 %igen (v/v) PPM-Konzentration war das Resultat ein stark abfallender Yield auf ca. 0,2 (Abbildung 19a), was weißen Fronds entsprach. Die Kultivierung in 0,5 und 1 % (v/v) PPM vertrugen die Pflanzen gut; sie waren über das Versuchsende hinaus grün und vital. Darüber hinaus konnte nachhaltiges Wachstum beobachtet werden.



**Abb. 19) Yield von *W. microscopica* (a) kultiviert mit verschiedenen PPM-Konzentrationen und digitale Aufnahmen am 1. und 4. Versuchstag (b)**

a) rot = 0,5 % (v/v) PPM; dunkelrot = 1 % (v/v) PPM; blau = 5 % (v/v) PPM; lila = 10 % (v/v) PPM; grau = 20 % (v/v) PPM; schwarz = 40 % (v/v) PPM

b) Well 1 + 2 = 0,5 % (v/v) PPM, Well 3 + 4 = 1 % (v/v) PPM, Well 5 + 6 = 5 % (v/v) PPM, Well 7 + 8 = 10 % (v/v) PPM, Well 9 + 10 = 20 % (v/v) PPM, Well 11 + 12 = 40 % (v/v) PPM

*W. arrhiza* 7193, *W. australiana*, *W. brasiliensis*, *W. columbiana*, *W. angusta*, *W. cylindracea*, *W. elongata*, *W. globosa* und *W. neglecta* wurden eine Woche mit verschiedenen PPM-Konzentrationen kultiviert und danach auf PPM-freies Medium umgesetzt.



PPM (0,5/1/2/3/4/5/10/20/40 % (v/v)) hat in Flüssigkultur generell einen negativen Effekt auf die kontaminierenden Organismen. Ab 2 % (v/v) PPM konnte kein Pilzwachstum mehr beobachtet werden, was darauf schließen läßt, daß PPM eine fungistatische Wirkung hat. Unter dem Mikroskop konnten in Aliquots aus behandeltem Pflanzenmedium jedoch Pilzsporen und bakterielle Stäbchen gefunden werden. PPM unterdrückt demzufolge das Mycelwachstum, tötet die Pilzsporen und Bakterien aber nicht vollständig ab. Pflanzen, die mit einer einprozentigen (v/v) PPM-Lösung kultiviert wurden, waren nicht vollständig dekontaminiert, was der Aliquotausstrich des Mediums auf DM-Agar zeigte. Zudem überstanden *W. arrhiza* 7193, *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* eine einwöchige Weiterkultivierung auf PPM-freiem Medium letztlich nicht, nachdem nur grüne Fronds umgesetzt worden waren. *W. angusta*, *W. cylindracea*, *W. elongata*, *W. globosa* und *W. neglecta* überlebten ebenfalls keine Kultivierung in 0,5 bzw. 1 % (v/v) PPM. Innerhalb einer Woche waren alle Pflanzen weiß und zeigten auch nach dem Überführen in Medium ohne PPM keine Regeneration. Eine vollständige Dekontamination konnte an dieser Stelle für keine Spezies erreicht werden, da auf DM ausgestrichene Mediumaliquots bakterielle Kontaminationen aufwiesen. Da eine dauerhafte Supplementierung des Mediums mit PPM zu letal geschädigten Pflanzen führte, wurde versucht, durch Waschen der Fronds in PPM-Lösung eine Dekontamination zu erreichen.

Das fünfminütige Waschen der Pflanzen in 5 %iger (v/v) PPM-Lösung wies zunächst bei *W. arrhiza* 7193 einen sichtbaren Dekontaminationserfolg auf. Am 15. Tag nach Beginn des Experiments konnte jedoch nur noch der Tod der Pflanzen festgestellt werden. *W. australiana* sowie *W. brasiliensis* und *W. columbiana* konnten in keinem Versuchsansatz mit 2, 5 und 8 %iger (v/v) PPM-Lösung ausreichend dekontaminiert werden. Hinzu kam die mangelnde Vitalität, die nur in sehr wenigen Ausnahmefällen bei über 8 % (v/v) PPM nicht zum Tod der Versuchspflanzen führte. Konnten grüne Fronds gerettet und umgesetzt werden, so belief sich die Anzahl auf < 5 % der eingesetzten Pflanzen. *W. brasiliensis* wurde eine Woche nach einer zweiminütigen Behandlung mit 12 % (v/v) PPM als dekontaminiert erachtet; die Fronds waren allerdings so stark geschädigt, daß sie verbräunten. Zwei Fronds *W. australiana* überlebten die gleiche PPM-Behandlung. Die Pflanzen erholte sich und hatten sich nach 155 Tagen auf > 20 Fronds vegetativ vermehrt. Die Kultur bestand jedoch den Zuckertest (Kapitel 2.7) nicht und mußte abschließend als nicht vollständig dekontaminiert oder rekontaminiert angesehen werden. In keinem Versuchsansatz konnten nach ca. einer Woche vitale *W. arrhiza* 7193 oder *W. columbiana* nach einer 10- bzw. 12 %igen (v/v) PPM-Behandlung bonitiert werden. Vierzehn- bis 16 %ige PPM-Behandlungen resultierten nach spätestens fünf Wochen

in totalem Verlust aller Pflanzen, die zu diesem Zeitpunkt keine Kontamination auf DM-Medium aufwiesen.

*W. brasiliensis* stellte hier eine Ausnahme dar, denn die Pflanzen dieser Spezies waren (nach 14 % (v/v) PPM) einmalig in der Lage, wieder vitale und grüne Fronds hervorzubringen. Die Kultur überlebte ebenso den Wechsel in Flüssigmedium ohne PPM, bestand jedoch, nach insgesamt 92 Tagen in Kultur, den Zuckertest nicht (pilzliche Kontamination).

Abschließend kann festgehalten werden, daß eine Erhöhung der PPM-Konzentration einen wachsenden Dekontaminationseffekt bei *W. australiana*, *W. arrhiza* 7193, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* erzielt. Bis auf wenige Ausnahmen werden die Pflanzen jedoch so stark geschädigt, daß sie eine weitere Kultivierung entweder nicht überleben oder letztendlich als nicht vollständig dekontaminiert angesehen werden müssen. Bei *W. australiana* und *W. brasiliensis* konnte eine generell höhere Resistenz gegenüber PPM festgestellt werden als bei *W. arrhiza* 7193 und *W. columbiana*. Allgemein kann gesagt werden, daß die Zugabe des Detergenz Silwet-77 in den Versuchen sowohl keinen sichtbaren Effekt auf die Pflanzen als auch keinen Einfluß auf den Dekontaminationserfolg hatte.

Durch die Kombination zweier Anwendungen (fünf Minuten Waschen in 50 % (v/v) Ethanol, Spülen mit demineralisiertem Wasser und Überführen auf SH-Festmedium mit 1 % (v/v) PPM) konnte bei *W. arrhiza* 7193, *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* eine sehr gute Dekontamination erreicht werden. Nur noch sehr vereinzelt konnten Bakterien detektiert werden. Pilzliche Kontaminationen waren nicht mehr zu beobachten. Die Pflanzen überlebten jedoch die erste (*W. arrhiza* 8272 und 7193, *W. brasiliensis*, *W. columbiana*) bzw. die zweite Kultivierungswoche (*W. australiana*) nicht. Ein Umsetzen der noch offensichtlich kontaminierten PPM-behandelten Pflanzen *W. australiana* und *W. brasiliensis* auf diverse Antibiotika-Konzentrationen (Kapitel 2.7.3) konnte die Kontamination zwar weiter verringern, schädigte die Pflanzen jedoch so sehr, daß nach zwei Wochen alle Pflanzen abgestorben waren.

In der finalen Betrachtung führte PPM in verschiedenen Applikationsformen (Kapitel 2.7.2) zu einem deutlichen Kontaminationsrückgang, war jedoch nicht mit einer ausreichenden Pflanzenvitalität vereinbar.

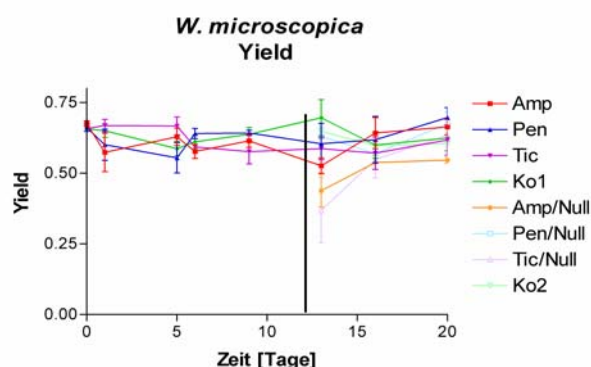
### 3.3.3 Antibiotika-Verträglichkeit von *Wolffia*

Werden Antibiotika zur Dekontamination von *Wolffia*-Pflanzen eingesetzt, so müssen die applizierten Konzentrationen exakt bestimmt werden, da sie einer Schnittmenge mit der Pflanzenvitalität gerecht werden müssen. Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen

wurden auf diverse *Wolffia*-Spezies getestet. Dabei kamen neben der jeweiligen Einzelapplikation auch Mixapplikationen zum Einsatz (Kapitel 2.7.3). Zunächst wurde *W. microscopica* als Leitspezies (da sehr sensibel) mit den ersten zur Verfügung stehenden Antibiotika behandelt und die Vitalität mit PAM-2000 gemessen. Wie sich im Verlauf der Versuche herausstellte, beherbergt *Wolffia spec.* endogene Mikroorganismen. Deshalb sind einige Pflanzenchargen mit antibiotikahaltigem Medium zudem vakuumfiltriert worden.

Einige der getesteten Antibiotika waren auch in der geringsten eingesetzten Konzentration letal und schieden deshalb trotz ihres Sterilisationspotentials für eine Anwendung in den Kulturen aus (Nystatin, Tebuconazol, Ciprofloxacin, Doxycyclin, Rifampicin; Kapitel 3.3.6). Generell konnte zumeist beobachtet werden, daß bei steigender Konzentration des Antibiotikums eine zunehmende Schädigung der Fronds und damit Vitalitätsverluste auftraten.

Penicillin, Ampicillin und Ticarcillin (jeweils 100 µg/ml Endkonzentration) im umgebenden Medium haben keinen nachhaltig negativen Einfluß auf die Vitalität von *W. microscopica* und können somit generell in *Wolffia*-Kulturen zum Einsatz kommen. Nach insgesamt 21 Tagen konnte, abgesehen von geringen Schwankungen, kein Abfall des Yield-Wertes beobachtet werden, was auf keine direkte oder indirekte Schädigung der Elektronentransportkette durch die getesteten Antibiotika hindeutet. Nach dem Wechsel der Pflanzen auf antibiotikafreies Medium konnte vereinzelt ein leichter Abfall des Yield beobachtet werden, was als Stressreaktion auf den Mediumwechsel bzw. das Umsetzen zurückgeführt werden kann (Abbildung 20). Die Weiterkultivierung der Pflanzen über Tag 21 hinaus erfolgte auf Medium ohne Antibiotikum problemlos, ohne eine Wachstumsstagnation beobachten zu können.



**Abb. 20) Einfluß der Antibiotika Penicillin, Ampicillin und Ticarcillin (je 100 µg/ml) und des Umsetzens der Pflanzen auf Null-Medium auf den Yield von *W. microscopica* (1/2 SH-Medium)**

Der vertikale Strich vor Tag 13 markiert das Umsetzen der Pflanzen auf antibiotikafreies Medium, Amp = Ampicillin, Pen = Penicillin, Tic = Ticarcillin, Null = Pflanzen aus der jeweiligen Antibiotikabehandlung, die auf Medium ohne Antibiotikum transferiert wurden, Ko1 = Medium ohne Antibiotikum, Ko2 = auf Frischmedium umgesetzte Pflanzen aus Ko1

Entsprechend Tabelle 7 sind später weitere Antibiotika und ihr Einfluß auf *Wolffia* spec. untersucht worden.

Generell ist Piperacillin für die getesteten Spezies *W. australiana*, *W. arrhiza* 7193, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* sehr gut verträglich. Im Vergleich zur Kontrolle wurden keine Abweichungen der Yield-Kurve beobachtet, die nicht auf geringe Schwankungen in der Messung zurückgeführt werden konnten. Der Yield hielt über drei Wochen einen konstanten Wert von ca. 0,7. Die Pflanzen waren auch in der Höchstkonzentration von 300 µg/ml optisch vital und reproduktiv (Abbildung 21).

Im Gegensatz dazu ist die Verträglichkeit von Ciprofloxacin für *Wolffia* schon in der geringsten Konzentration von 50 µg/ml sehr schlecht. Bereits ab dem ersten Tag der Kultivierung sank der Yield bei allen Pflanzen deutlich und weiterhin kontinuierlich bis auf 0,2 nach drei Wochen (*W. arrhiza* 7193 und *W. brasiliensis*). Eine etwas bessere Verträglichkeit konnte für *W. australiana* und *W. columbiana* festgestellt werden, deren Yield-Wert am Ende der dritten Woche bis auf 0,4-0,5 gesunken war. Anzumerken ist, daß die Kontrolle von *W. columbiana* ebenfalls auf diesen Wert absank (Abbildung 21). Daher kann für diese Spezies keine Aussage über den tatsächlichen Effekt von Ciprofloxacin gemacht werden. Für *W. australiana* konnte die optische Beurteilung die geringen Yield-Werte bestätigen. Die Pflanzen waren aufgehellt und das Wachstum stagnierte kurz darauf.

Bei einem Yield von > 0,4 kann generell nicht von letal geschädigten Pflanzen ausgegangen werden. Abhängig von verschiedenen Parametern wie Jahreszeit, Spezies und physiologischem Ausgangszustand der Pflanzen können sich die Kulturen durchaus revitalisieren (Kapitel 4.1.5).

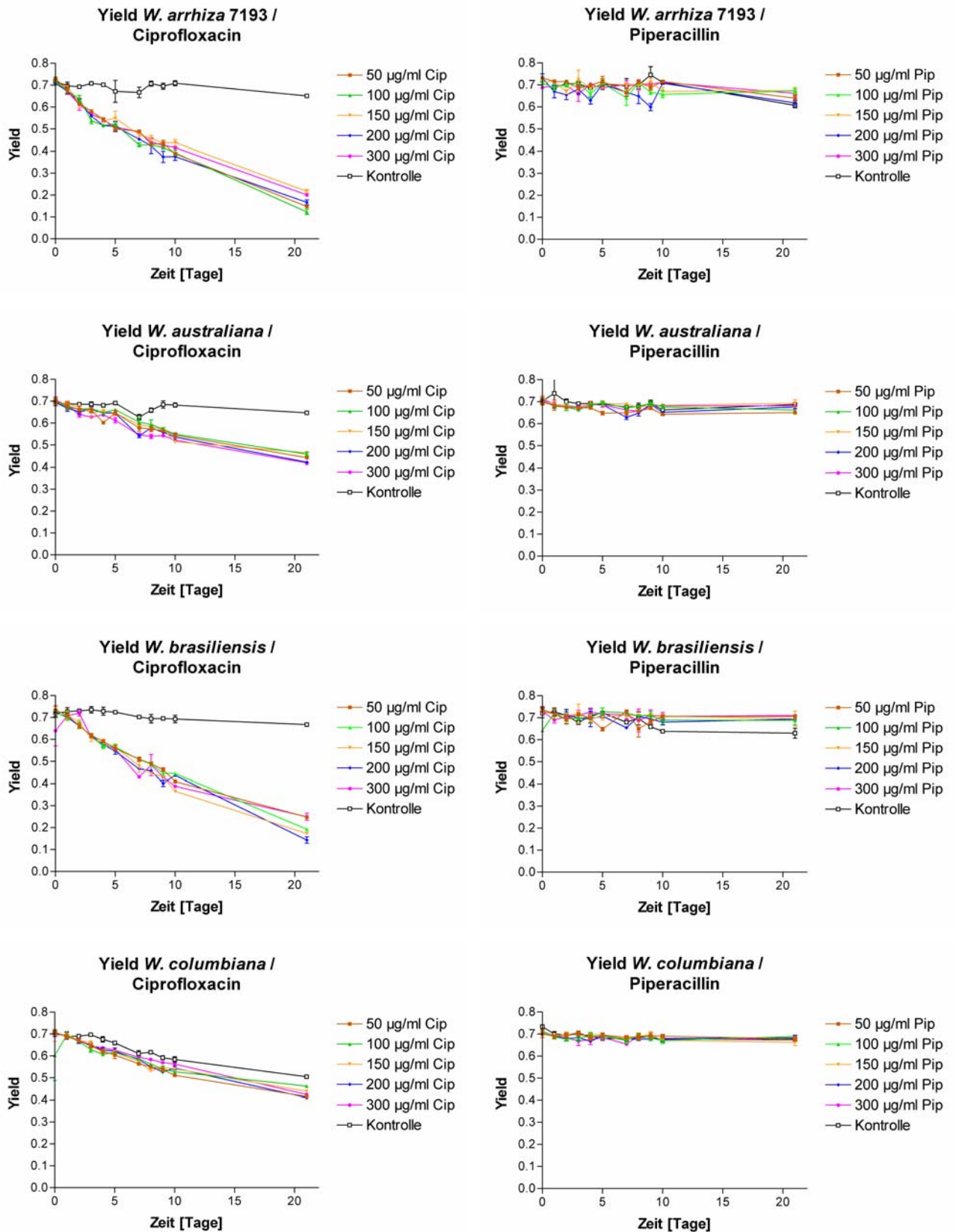


Abb. 21) Yield-Werte von *W. arrhiza* 7193, *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* unter dem Einfluß von Ciprofloxacin und Piperacillin in verschiedenen Konzentrationen

Kontrolle = Medium ohne Antibiotika, Cip = Ciprofloxacin, Pip = Piperacillin

Ein abschließender Sterilitätstest (Medium- und Pflanzenaliquot auf DM) zeigte, daß die alleinige Behandlung der unsterilen Pflanzen mit Ciprofloxacin und Piperacillin nicht ausreicht, um die Kultur zu dekontaminieren.

In einem weiteren Kultivierungsansatz sind *W. arrhiza* 8272, *W. columbiana* und *W. microscopica* mit 20 und 100 µg/ml Endkonzentration Vancomycin getestet worden, wobei festzustellen war, daß alle Pflanzen in der geringeren Konzentration des Antibiotikums ein besseres Wachstum zeigten als die Vergleichspflanzen mit 100 µg/ml. Trotzdem waren alle Pflanzen auch in der höheren Konzentration über einen Zeitraum von 26 Tagen grün und reproduktiv. Eine Mix-Applikation von je 100 µg/ml Vancomycin/Ampicillin resultierte in Pflanzen, die gegenüber der Kontrolle zwar aufgehellert waren, sich jedoch kontinuierlich vermehrten. Im Gegensatz dazu zeigte die Mix-Applikation Vancomycin/Ticarcillin (je 100 µg/ml) keinen optischen Unterschied zur Kontrolle. Die Pflanzen waren nach 26 Tagen grün und vermehrten sich normal. Penicillin und Ampicillin wurden ebenfalls in einer Mixapplikation getestet (je 100 µg/ml), wobei ein deutlich größerer Dekontaminationseffekt festgestellt werden konnte als bei der jeweiligen Einzelapplikation. *W. columbiana* zeigte zudem nach 26 Tagen Kultivierungsdauer keinen Unterschied in Farbe und Wachstum zur unbehandelten Kontrolle.

Da Mixapplikationen offensichtlich zu einem größeren Dekontaminationserfolg führen als Einzelbehandlungen, wurde auch eine Dreifachapplikation aus Ampicillin/Penicillin/Amphotericin (je 100 µg/ml) untersucht, mit dem Resultat, daß alle Pflanzen schon nach wenigen Tagen weiß wurden. In diesem Fall bedeutete eine Dreifachanwendung demnach einen Stressfaktor, den die Pflanzen nicht kompensieren konnten. Amphotericin erscheint gegenüber der Einzelapplikation (Kapitel 3.3.5) jedoch generell nicht gut als Kombinationspartner geeignet, da es im Mix mit Ampicillin (je 100 µg/ml) nach vier Tagen ebenfalls in weißen Pflanzen resultierte (Kapitel 3.3.6).

Während der Arbeiten mit den Kulturen stellte sich heraus, daß *Wolffia*-Pflanzen auch endogen Mikroorganismen beherbergen, welche beim natürlichen Absterben einzelner Pflanzen in die Kultur freigesetzt werden könnten. Es ist daher der Versuch unternommen worden, diese Kontaminationen durch Vakuum-Infiltration mit antibiotikahaltigem Medium zu beseitigen.

Keine der infiltrierten Pflanzenchargen von *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* (Tabelle 8) zeigte bis zum Abschluß des Versuches nach sechs Wochen Anzeichen einer Schädigung. Die gemessenen Yield-Werte blieben konstant im vitalen Bereich. Die Fronds waren grün und stagnierten zu keiner Zeit im Wachstum. Die auf DM-

Agar ausgestrichenen homogenisierten Pflanzenaliquots wiesen jedoch keine Verringerung der bakteriellen Kontaminationen gegenüber der Kontrolle auf. Somit kann das Verfahren der Antibiotika-Infiltration mit den beschriebenen Parametern (Kapitel 2.7.5) als unzureichend angesehen werden (Kapitel 4.2.2.2).

### 3.3.4 Antibiotika zur Selektion transgener Pflanzen

Nach Transformationsversuchen ist es notwendig, die potentiell transgenen Pflanzen einer Selektion zu unterziehen. Da zusammen mit den Zielgenen eine zusätzliche Antibiotikaresistenz in das Pflanzengenom transferiert wird, kann ein Selektionsdruck während der Kultivierung aufgebaut werden. Es muß jedoch gewährleistet sein, daß der untransformierte Wildtyp unter selektierenden Bedingungen nicht überlebensfähig ist. Hygromycin, welches die pflanzliche Resistenz des Reportersystems repräsentiert (Kapitel 2.16.1), und Kanamycin für die später zu testende Immuntoxin-Kassette wurden in verschiedenen Konzentrationen und Lichtbedingungen auf ihre letale Wirkung auf *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* getestet. Es stellte sich im Laufe der Experimente heraus, daß *Wolffia*-Pflanzen unterschiedlich auf verschiedene Lichtintensitäten reagieren, besonders dann, wenn das Medium mit Selektions-Antibiotika supplementiert war. Das Absterben der Fronds konnte im Starklicht (6400 lux) deutlich schneller detektiert werden (PAM-Messung und optische Bonitur) als unter Schwachlichtbedingungen (3500 lux). Hygromycin zeigte in den Endkonzentrationen 1, 5, 10 und 50 µg/ml sowohl im Schwachlicht als auch im Starklicht keine letale Schädigung auf *W. australiana*. Der überwiegende Anteil der Fronds war vital und grün. Die gemessenen Yield-Werte differierten nur minimal um die der Kontrolle und sanken zu keiner Zeit der Messung signifikant ab.

Höhere Konzentrationen führten zunehmend zu aufgehellten und weißen Pflanzen. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml Hygromycin konnte eine deutlich größere Schädigung als bei 50 µg/ml beobachtet werden. Die Konzentrationen 150, 200, 250 und 300 µg/ml führten zu einer letalen Schädigung, wobei Pflanzen im Starklicht deutlich schneller (6 bis 9 Tage) weiß wurden als im Schwachlicht (9-13 Tage). Es stellte sich heraus, daß bei einem Abfall des Yield < 0,2 die geschädigten Pflanzen nicht mehr in der Lage waren, zu regenerieren. Zu diesem Zeitpunkt waren die Pflanzen stark aufgehellt und zeigten kein vegetatives Wachstum mehr. Der Yield der Kontrolle der Starklichtpflanzen zeigte zu keiner Zeit eine signifikante Abnahme. Es kann demzufolge davon ausgegangen werden, daß eine Lichtintensität von 6400 lux im allgemeinen keinen letalen Faktor für *W. australiana* darstellt. In Folge der gewonnenen Erkenntnisse ist für die Selektion von potentiell transformierten *W. australiana*

eine Hygromycin-Konzentration von 300 µg/ml unter Starklichtbedingungen (6400 lux) gewählt worden.

*W. brasiliensis* und *W. columbiana* wurden ebenso unter Stark- als auch unter Schwachlichtbedingungen getestet (50, 100, 200, 300 und 500 µg/ml Hygromycin). Auch hier konnten über den Yield im Starklicht deutlich schneller (ab Tag 3) tote Pflanzen detektiert werden als im Schwachlicht (ab Tag 11). Schon 50 µg/ml Hygromycin stellte für *W. brasiliensis* und *W. columbiana* eine letale Konzentration dar. Im Starklicht waren am dritten Versuchstag alle Fronds in allen Konzentrationen ausnahmslos weiß, während alle Pflanzen aus dem analogen Schwachlichtansatz gegenüber der Kontrolle zum selben Zeitpunkt nur leicht aufgehellt waren. Der Yield der Kontrolle bei *W. brasiliensis* und *W. columbiana* im Starklicht war eine Woche lang konstant, bevor ein Abfall gemessen wurde (Abbildung 22).

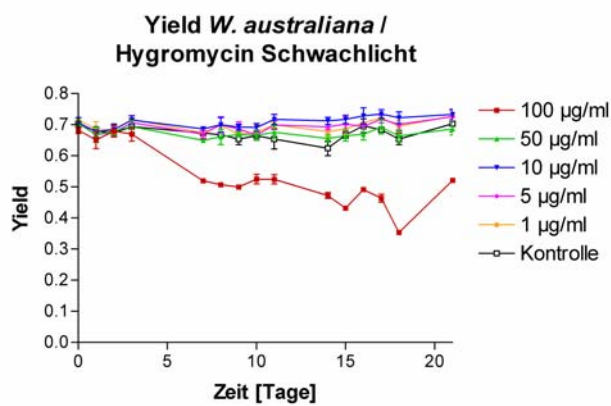
*W. brasiliensis* und *W. columbiana* reagierten demzufolge sensitiver auf längere Starklichtbedingungen (> 1 Woche) als *W. australiana*, wobei *W. columbiana* deutlich empfindlicher auf länger andauernde Starklichtbedingungen reagierte als *W. brasiliensis*. Für die Selektion von *W. brasiliensis* und *W. columbiana* wurde jeweils eine Konzentration von 100 µg/ml Hygromycin gewählt, wobei für *W. brasiliensis* Starklicht- und für *W. columbiana* Schwachlichtbedingungen festgelegt wurden.

Da aufgrund von Beobachtungen deutlich wurde, daß weiße und augenscheinlich tote Pflanzen noch funktionierende meristematische Zonen enthalten können, sollte abschließend die potentielle Regenerationsfähigkeit weißer Fronds überprüft werden. Selbst bei einem Yield von Null kann theoretisch keine finale Aussage darüber gemacht werden, ob die Meristeme in den Fronds tatsächlich tot oder noch vital sind. Um die Letalität der Selektionsantibiotika zu überprüfen, sind die weißen Fronds von *W. australiana* (aus 300 µg/ml Hygromycin), *W. brasiliensis* und *W. columbiana* (aus je 100 µg/ml Hygromycin) für zwei Wochen auf Medium ohne Antibiotikum und im Schwachlicht weiterkultiviert worden, mit dem Resultat, daß keine Pflanze ein erneutes Wachstum grüner Fronds zeigte. Die gewählten Selektionsbedingungen schädigen demzufolge auch die mit einem hohen Regenerationspotential ausgestatteten Meristeme letal. Da Hygromycin innerhalb weniger Tage zum Tod der Wildtypen führt, ist es nicht notwendig, die Kulturmedien dauerhaft mit dem Antibiotikum zu supplementieren. Der Selektionsdruck wurde in später folgenden Transformationsexperimenten (Kapitel 3.10.3) nur zwei (*W. brasiliensis*, *W. columbiana*) bzw. drei Tage (*W. australiana*) aufrechterhalten. Diesbezüglich kommt ein weiterer wichtiger Aspekt zum Tragen: Um die tatsächlich transformierten Pflanzen vor den negativen

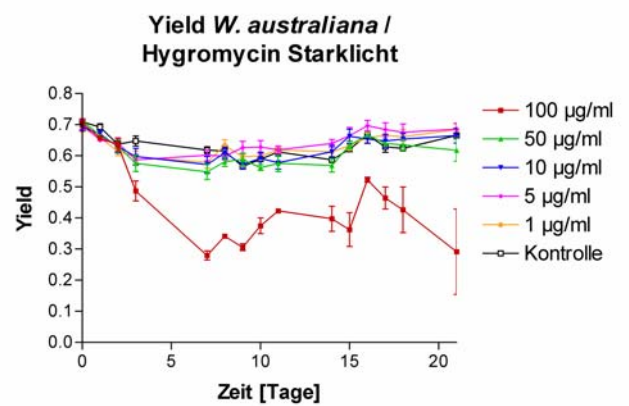


allelopathischen Einflüssen einer sterbenden Kultur zu schützen, wurde dazu übergegangen, die Weiterkultivierung nach der eigentlichen Selektion in einem deutlich größeren Volumen durchzuführen. Hierfür wurde ein Volumen von 50 ml für ca. 0,1 g Pflanzen gewählt, wobei diese bis zu drei Wochen alle zwei bzw. drei Tage auf frisches Medium umgesetzt wurde. Mit dieser Vorgehensweise sollte erreicht werden, daß diejenigen Stoffwechselprodukte, die eine negative Rückkopplung auslösen, so lange abgepuffert werden, bis die transgenen Pflanzen auch optisch bonitierbar waren. Diese Bonitur konnte erst erfolgen, wenn die letale Schädigung der Wildtypen durch den Chlorophyllabbau sichtbar geworden war (Kapitel 4.2.3).

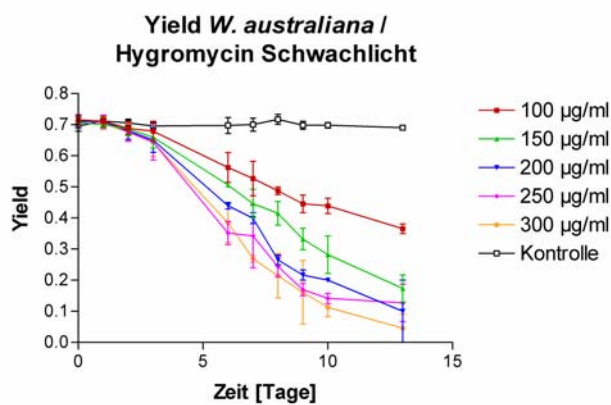
a)



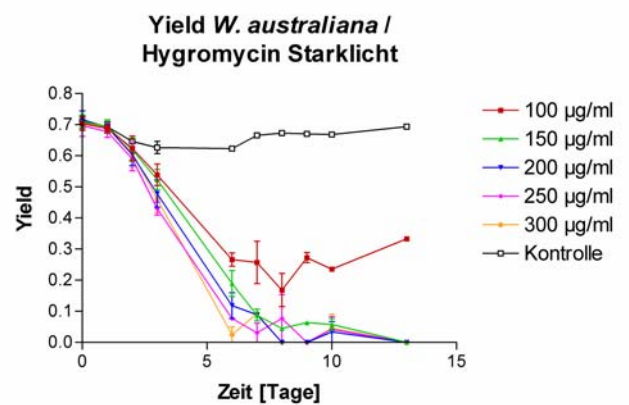
b)



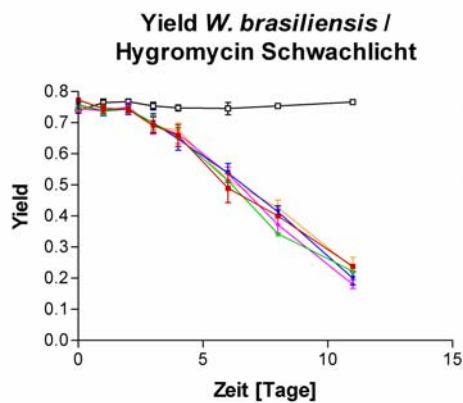
c)



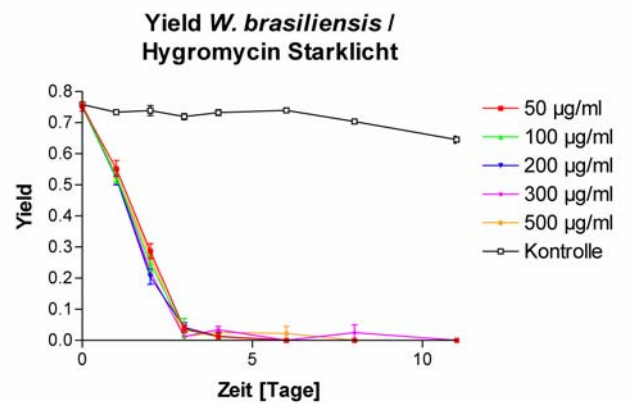
d)



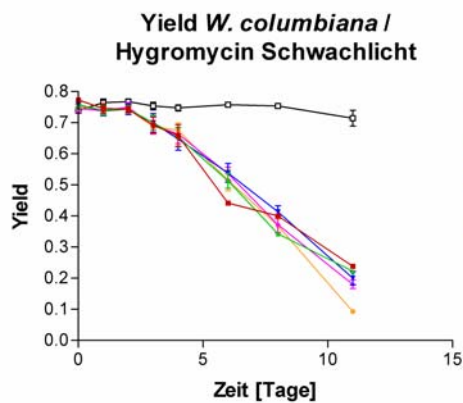
e)



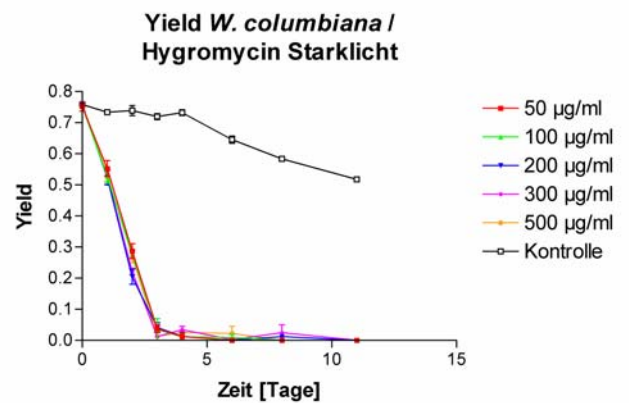
f)



g)



h)



**Abb. 22 ) Yieldentwicklung von *W. australiana* (a-d), *W. brasiliensis* (e+f) und *W. columbiana* (g+h) unter dem Einfluß verschiedener Hygromycinkonzentrationen unter Stark- und Schwachlichtbedingungen**

Kontrolle = Medium ohne Antibiotikum

Für *W. columbiana* wurde zusätzlich Kanamycin getestet, da vorliegende Genkassetten mit dem Resistenzgen *nptII* ausgestattet waren. Alle getesteten Konzentrationen Kanamycin führten sowohl im Schwachlicht als auch im Starklicht innerhalb der ersten drei Tage zu einem Yield-Wert von Null (Abbildung 23a und b). In der Schwachlichtvariante war zu erkennen, daß der Yield der geringsten Konzentration von 100 µg/ml Kanamycin erst am dritten Meßtag auf Null absank, wobei dies bei 1000 bzw. 10000 µg/ml schon nach 24 Stunden der Fall war. Danach konnte bis zum 30. Versuchstag (hier nur bis Tag 15 dargestellt) keine nachhaltige Erholung der weißen Pflanzen beobachtet werden. Auf Grund der Sensitivität gegenüber Starklicht ist unter Kanamycin-Selektionsdruck eine Kultivierung von *W. columbiana* im Schwachlicht vorzuziehen.

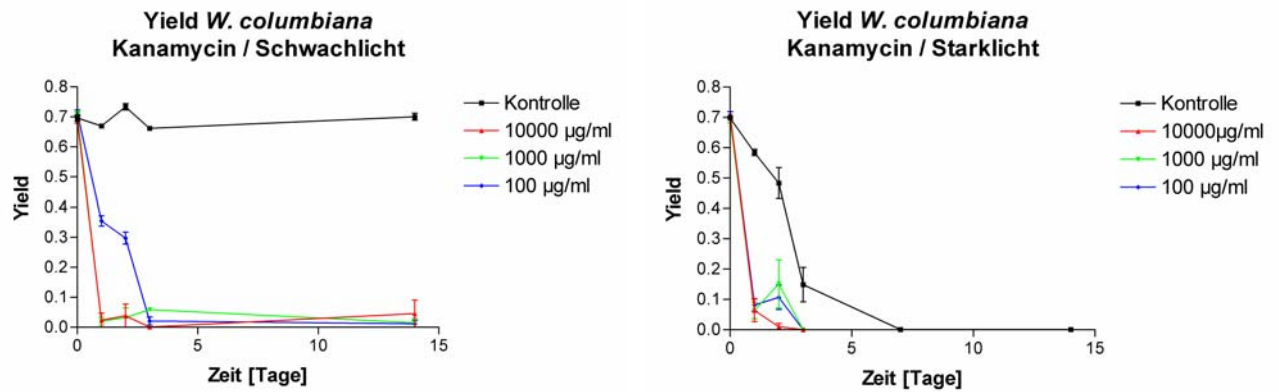


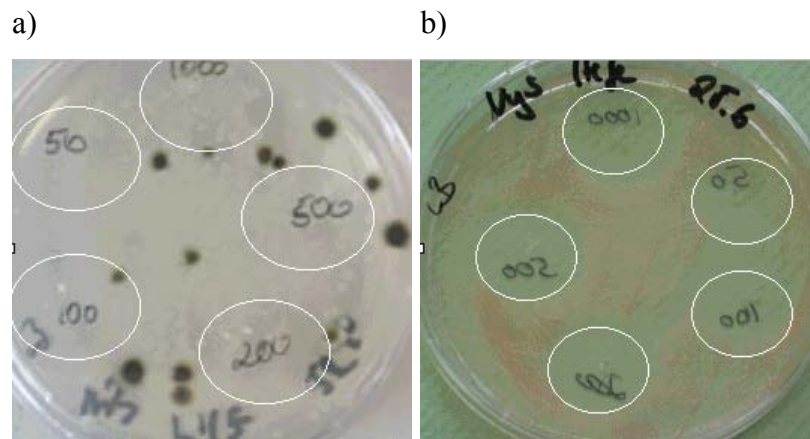
Abb. 23) Yieldentwicklung von *W. columbiana* unter verschiedenen Kanamycinkonzentrationen unter Stark- (6400 lux, a) und Schwachlichtbedingungen (3500 lux, b)

Kontrolle = Medium ohne Antibiotikum

### 3.3.5 Sterilisation durch Fungizide und Fungistatika

Da neben Bakterien auch Pilze als Kontaminanten in *Wolffia*-Kulturen auftraten, sind neben den bereits beschriebenen Antibiotika diverse Fungizide bzw. Fungistatika wie Nystatin, Amphotericin, Iprodion und Tebuconazol auf ihre Dekontaminationsleistung und ihre Wirkung auf *Wolffia* untersucht worden. Hierfür wurde zunächst kontaminiertes Medium auf einer Agarplatte ausplattiert; anschließend sind die jeweiligen Wirksubstanzen mit einer Pipette vorsichtig lokal in das Festmedium injiziert worden.

Das Fungizid Nystatin hat einen negativen Effekt sowohl auf das Mycel- als auch auf das Hefewachstum in den Ausstrichen von *Wolffia*-Medien auf PDA- bzw. LB-Agar. Es zeigten sich im Ausstrich der jeweiligen Medien deutliche Hemmhöfe bei allen getesteten Nystatinkonzentrationen (50, 100, 200, 500 und 1000 µg/ml), wobei bei den geringsten Konzentrationen 50 und 100 µg/ml einzelne kleine Pilzkolonien im Hemmhofbereich zu beobachten waren (Abbildung 24a und b). Die Hemmhöfe des mit Hefe kontaminierten Ausstrichs waren stets koloniefrei.

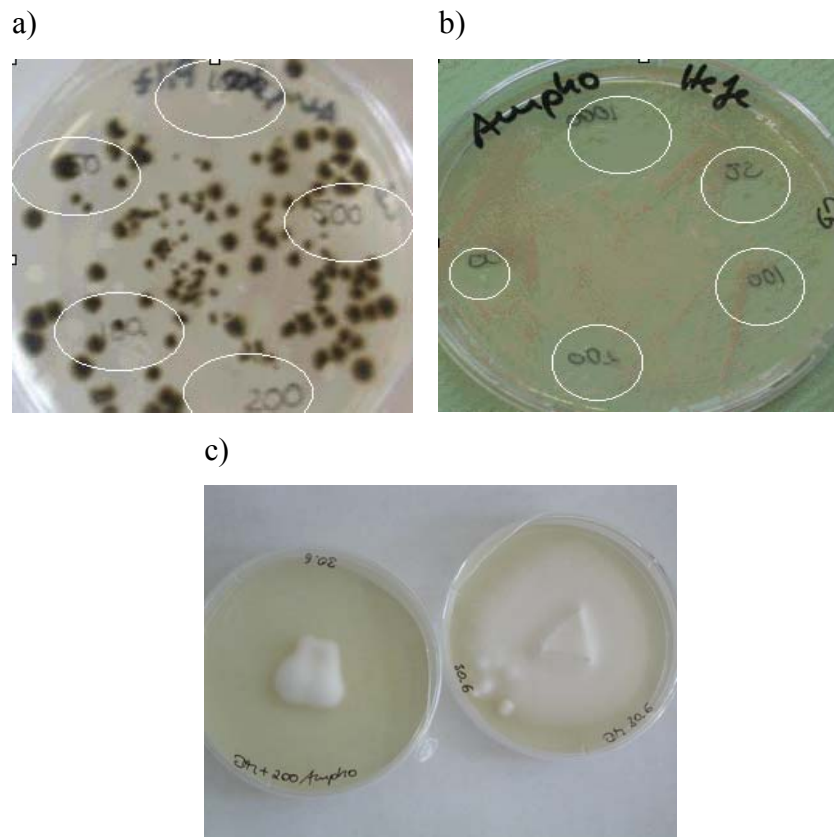


**Abb. 24) Hemmhöfe um Nystatin-Injektionen verschiedener Konzentrationen nach mycel- (a) bzw. hefehaltigem (b) Mediumausstrich auf PDA- bzw. LB-Agar.**

Die Wirkung von Nystatin auf die Pflanzen wurde in Flüssigkulturen von *W. columbiana* (CHU-Medium + 1 % (w/v) Saccharose) in den Konzentrationen 100, 200, 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  Nystatin getestet. Am zweiten Tag waren in allen Kolben Pflanzen abgesunken und z. T. aufgehellt. Nach fünf Tagen konnten zum überwiegenden Teil weiße Pflanzen beobachtet werden, von denen die Mehrzahl abgesunken war. Unter den am Boden liegenden Fronds waren noch einige hellgrüne Individuen, die jedoch kein Wachstum mehr zeigten. Die Kontrolle wies nur sehr wenige weiße Pflanzen auf und bestand zum größten Teil aus vitalen dunkelgrünen Fronds. Zudem zeigte sich in allen Fällen ein beginnendes Mycelwachstum.

Da keine ausreichende Hemmung des Pilzwachstums bei gleichzeitiger Pflanzenvitalität festgestellt werden konnte, konnte Nystatin somit nicht zur Dekontamination herangezogen werden.

Das Fungistatikum Amphotericin in den Konzentrationen 50, 100, 200, 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  hat wie Nystatin einen negativen Effekt auf das Mycel- und Hefewachstum in den Ausstrichen von kontaminierten Medien auf PDA- bzw. LB-Agar (Abbildung 25a und b). Die Hemmhöfe waren jedoch weniger ausgeprägt als bei Nystatin, wobei bei 50 und 100  $\mu\text{g/ml}$  kein Hemmhof zu beobachten war. Die Hemmhöfe im Hefeausstrich waren koloniefrei, jedoch deutlich kleiner als unter Nystatin-Einfluß. Amphotericin ist zudem in der Lage auch auf DM, welches einen sehr guten Nährboden für pilzliches Wachstum darstellt, Mycelwachstum zu unterbinden (Abbildung 25c).



**Abb. 25) Hemmhöfe um Amphotericin-Injektionen verschiedener Konzentrationen nach mycel- (a) bzw. hefehaltigem (b) Mediumausstrich auf PDA- (a) bzw. LB-Agar (b) sowie die Hemmung des Mycelwachstums (c) auf amphotericinhaltigem (200 µg/ml) DM (links) gegenüber der Kontrolle ohne Antibiotikum (rechts)**

Die getesteten Spezies *W. arrhiza* 8272 und *W. columbiana* vertrugen in Flüssigkultur alle getesteten Amphotericin-Konzentrationen. Die Pflanzen waren auch in höchster Konzentration (1000 µg/ml) des Fungistatikums vital und überwiegend grün. Die Wirkungseffizienz wurde über die Größe der Hemmhöfe definiert. Amphotericin hemmte sowohl Pilz- als auch Hefewachstum, war jedoch nicht in der Lage, eine pilzliche Dekontamination zu erreichen. Eine Applikation von 100-200 µg/ml Amphotericin bei einem sich entwickelnden Mycel oder beginnendem Hefewachstum in Pflanzenkulturen hemmte den Pilz soweit, daß in Kombination mit einem täglichen Umsetzen der Pflanzen in neues Medium eine pilzliche Dekontamination möglich war.

Der fungizide Wirkstoff Iprodion tötete in Flüssigkulturen in den Konzentrationen 100 und 1000 µg/ml zuverlässig Pilzmycel, welches zuvor durch dreiminütige Ultraschallbehandlung homogenisiert wurde. Die gleichbehandelte Kontrolle ohne Iprodion-Zusatz war vollständig mit Pilzmycel durchwachsen. Die Verträglichkeit von Iprodion für *W. arrhiza* 8272 und *W. columbiana* war in der Konzentration 1000 µg/ml weitaus schlechter als in einer Konzentration von 100 µg/ml, was sich in einer verstärkten Aufhellung, größerem Anteil

weißer Pflanzen und anhaltender Wachstumsstagnation widerspiegelte. Iprodion ist generell verträglich mit den getesteten *Wolffia*-Spezies, wobei *W. columbiana* etwas sensibler als *W. arrhiza* 8272 reagierte. Die Pflanzen benötigten nach dem Umsetzen auf Medium ohne Iprodion eine ca. zwei- bis vierwöchige Erholung, um erneut grüne Fronds hervorzubringen. Das Fungizid Tebuconazol hat in den Konzentrationen 100 und 1000 µg/ml eine hemmende Wirkung auf das Pilzmycel, ist jedoch nicht verträglich mit *W. arrhiza* 8272 und *W. columbiana*. Nach einer Woche waren alle Pflanzen weiß und erholten sich auch nach zweiwöchiger Kultivierung auf Medium ohne Tebuconazol nicht mehr. Als positive Nebenwirkung konnte ein negativer Effekt auf das unerwünschte Algenwachstum (Kapitel 3.3.7) in den *Wolffia*-Kulturen durch Tebuconazol beobachtet werden.

### 3.3.6 Schädigungspotential von Antibiotika bei *Wolffia*-Pflanzen

Im Rahmen der Sterilisationsversuche mit Antibiotika wurden Arbeitskonzentrationen festgelegt, die die Vitalität der Pflanzen so gering wie möglich negativ beeinflussten, jedoch gleichzeitig einen Dekontaminationseffekt hervorriefen. Die hier festgelegten Arbeitskonzentrationen (Tabelle 20) rufen maximal eine leichte Schädigung der Fronds hervor, die die Pflanzen in ihrer Vitalität (bestimmt durch Bonitur und PAM-Messung) nicht nachhaltig beeinflussen.

**Tab. 20) Boniturnoten von *Wolffia spec.* nach der Applikation verschiedener Antibiotika und deren gewählten Arbeitskonzentrationen zur Dekontamination der Flüssigkulturen**

Alle Auswirkungen sind im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bonitiert worden.

0	keine Schädigung:	Phänotyp und Wachstum differieren nicht von der Kontrolle
+	leichte Schädigung:	grün, Wachstum jedoch geringer als in der Kontrolle
++	stärkere Schädigung:	weniger grün, Wachstumsstagnation
+++	letale Schädigung:	stark aufgehellte oder weiße Pflanzen nach 48 Stunden

Fungistatika	Konzentrationen	Schädigung der <i>Wolffia</i> -Pflanzen	gewählte Arbeitskonzentration
Amphotericin	25-400 µg/ml	+	100 µg/ml
	500 µg/ml	++	
	1000 µg/ml	+++	
Nystatin	alle getesteten	+++	-
Rovral (Iprodion)	10-100 µg/ml	+	100 µg/ml
	1000 µg/ml	+++	
Tebuconazol	alle getesteten	+++	-
<b>Bakteriozide</b>			
Ampicillin	50-200 µg/ml	0	100 µg/ml
	300 µg/ml	+	
	500 µg/ml	++	
	1000 µg/ml	+++	
Cefotaxim	250 µg/ml	0	250 µg/ml
Ciprofloxacin	alle getesteten	+++	-
Doxycyclin	alle getesteten	+++	-

Ofloxacin	20-300 µg/ml	+	300 µg/ml
	500-800 µg/ml	++	
	1000 µg/ml	+++	
Penicillin	50-300 µg/ml	+	100 µg/ml
	500 µg/ml	+	
	1000 µg/ml	++	
Piperacillin	alle getesteten	0	150 µg/ml
Rifampicin	20 µg/ml	++	-
	≥ 50 µg/ml	+++	
Tetracyclin	alle getesteten	+++	-
Ticarcillin/ Clavulanic Acid	10-100 µg/ml	0	100 µg/ml
	200 µg/ml	+	
	500 µg/ml	++	
Vancomycin	10-150 µg/ml	0	100 µg/ml
	200 µg/ml	+	
	300 µg/ml	++	
<b>Mix</b>			
Ampicillin/ Penicillin	100/100 µg/ml	+	je 100 µg/ml
Ticarcillin/ Vancomycin	100/100 µg/ml	+	je 100 µg/ml
<b>Andere</b>			
PPM	≤ 1 % (v/v)	+	1 % (v/v)
	≥ 1 % (v/v)	+++	

### 3.3.7 Algenmaster, Ultraschall und pH-Shift

Beim Überführen der unsterilen Aquarienpflanzen in eine sterile Laborkultur wurde deutlich, daß neben Bakterien und Pilzen auch Algen bekämpft werden mußten. Zur Vernichtung von Bakterien und Pilzen ist, außer den in Kapitel 3.3.6 genannten Antibiotika, eine Ultraschallbehandlung und ein pH-Shift getestet worden. *Wolffia* verschiebt autark einen Medium-pH-Wert von 6,0 innerhalb kurzer Zeit (ca. drei Tage) in den sauren Bereich bis zu einem pH von 3,5. Aus dieser Erkenntnis resultierte die Idee, einen pH-Shift in den extremen sauren bzw. alkalischen Bereich vorzunehmen, um den Kontaminanten mit für sie suboptimalen physiologischen Bedingungen entgegenzutreten. Da die Pflanzen eine schnelle pH-Verschiebung offensichtlich ohne Schaden überlebten, erschien diese Möglichkeit erfolgsversprechend, um eine Keimverringerung bei ausreichender Pflanzenvitalität zu erreichen.

Das Algenvernichtungsmittel „Algenmaster“ (Amtra) hatte mit den nach Herstellerangaben gewählten Konzentrationen 1:1000 und 1:10000 keinen ausreichend negativen Effekt auf das Algenwachstum. Zudem überlebten *W. arrhiza* 8272, *W. australiana* und *W. columbiana* die Applikation nicht. Dieses Algenmittel kann demzufolge nicht in *Wolffia*-Kulturen zum Einsatz kommen.

Keiner der getesteten Zeiträume (10/30 sec 1/2/3/4/5/10 und 15 min) im Ultraschallbad war ausreichend, um Bakterien erfolgreich abzutöten. *W. arrhiza* 8272 und *W. columbiana* wurden durch eine Ultraschallbehandlung nicht negativ beeinflusst. Der Ultraschall hatte in allen

Versuchen eine homogenisierende Wirkung auf das Pilzmycel. Das Mycelwachstum war nach allen Versuchen gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht. Ein pH-Shift in beide pH-Extreme in kurzer Zeit (ca. zehn Minuten) war sowohl für *W. arrhiza* 8272 als auch *W. columbiana* letal. Die Pflanzen verbräunten in der nachfolgenden Kultivierung und sanken zu Boden. Die Bakterienflora wurde ebenso nicht in Mitleidenschaft gezogen, so daß ein pH-Shift nicht zur Dekontamination herangezogen werden kann. Das Mycelwachstum war bei einer Verschiebung in den alkalischen Bereich gegenüber der Kontroll-Kultur gehemmt, konnte jedoch nicht final gestoppt werden. Ultraschall und pH-Shift können zusammenfassend nicht zu einer Dekontamination in *Wolffia*-Kulturen beitragen.

### 3.4 Identifikation von Kontaminanten

Um gezielt gegen die Kontaminationen vorgehen zu können, war es naheliegend, die vorkommenden Bakterien und Pilze zu bestimmen. Die auf verschiedenen Medien vereinzelt Kontaminationen pilzlicher und bakterieller Natur wurden (teils unter Zuhilfenahme von Bunten Reihen, Api-Test Merck) identifiziert (Tabelle 21). Hinzu kommen noch koagulase-negative Staphylokokken und mit API-Testreihen nicht identifizierbare gram-negative Stäbchen (M. Frechen).

**Tab. 21) Liste der identifizierten Kontaminanten**

Dr. Heller, Eidgenössische Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Fachbereich Pflanzenschutz, CH-8820 Wädenswil  
 Dr. Westphal, Institut für Mikrobiologie, Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn  
 M. Frechen, Institut für Hygiene, Sigmund-Freud-Straße 25, 53105 Bonn  
 Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan 8, 3584 Utrecht  
 Prof. Dr. Imhoff, Institut für Meereskunde, Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel

Name	Medium	identifiziert durch
<i>Cladosporium</i> sp. (Ascomycetes)	CPS-Agar	Dr. Heller
<i>Flammulina velutipes</i> (Basidiomycetes)	PDA	Centraalbureau voor Schimmelcultures
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling (Deuteromycetes)	PDA	Centraalbureau voor Schimmelcultures
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Pseudomonas)	Standard, Merck	Dr. Westphal
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pseudomonas)	Standard, Merck	M. Frechen
<i>Pseudomonas xylooxidans</i> ssp. <i>Alcaligenes xylooxidans</i> (Achromobacter)	Standard, Merck	M. Frechen
<i>Micrococcus luteus</i> (Micrococcaceae)	TSA	Prof. Dr. Imhoff



### 3.5 Kultursysteme für *Wolffia*

Für eine zuverlässige Vermehrung von *Wolffia*-Pflanzen unter sterilen Laborbedingungen wurden verschiedene Kultursysteme getestet. Das System sollte optimale Bedingungen für eine vitale und arbeitsextensive Pflanzen-Kultur sicherstellen.

Ein geeignetes Kultursystem für *Wolffia*-Pflanzen unter Laborbedingungen sind Erlenmeyerkolben. Die Kolben bieten den Pflanzen in den verwendeten Größen 150 ml (mit 50 ml Medium), 250 ml (mit 100 ml Medium) und 500 ml (mit 200 ml Medium) ausreichend Medienoberfläche und eine genügend große Gasphase. Es ist darauf zu achten, daß eine gewisse Minimalmenge an Pflanzen für eine Starterkultur (ca. 2-3 % Oberflächendeckungsgrad) nicht unterschritten und eine Maximalmenge pro Volumen insgesamt nicht überschritten werden darf (Kapitel 4.1.3). Zum Verschließen der autoklavierten Kolben sind Zellstoff-Stopfen nicht zu empfehlen, da sie zum Aufweichen neigen und zudem keinen sicheren Abschluß der Außenluft zum Kolbenhals gewährleisten. Pflanzenkulturen, die mit Stopfen verschlossen waren, kontaminierten deutlich öfter als solche mit Deckeln aus Aluminiumfolie. Um das Auftreten von Kontaminationen zu minimieren, ist es ratsam, die autoklavierten Gefäße (Medienflaschen, Kolben, Utensilien) vor Gebrauch sehr gut im Trockenschrank bei 70 °C trocknen zu lassen. Für einen kurzfristigen Versuch (bis zu 4 Wochen) sind mit Parafilm verschlossene 6-Well-Platten mit 10 ml Medien-Volumen für *Wolffia* geeignet. Zur Vermehrung einer vitalen Pflanzenkultur mit maximaler Biomasse sind diese Titerplatten generell jedoch nicht geeignet, da sich durch das vegetative Wachstum die Dauer des Versuchs limitiert.

Zellkulturflaschen gewährleisten keine gleichmäßige Produktion von Biomasse. Es wurden Kulturen beobachtet, die nach dem Umfüllen in Zellkulturflaschen (beschichtet und unbeschichtet, ventiliert und nicht ventiliert) innerhalb weniger Tage weiß wurden, während andere Kulturen ein Jahr und länger erhalten werden konnten. Die Pflanzen blieben überwiegend grün, stagnierten aber im Wachstum. Eine vermehrte Turionbildung konnte wider Erwarten nicht beobachtet werden, wohl aber das vermehrte Auftreten von unterschiedlichen Phänotypen. Solche Pflanzen waren meist aufgebläht, kreisrund und von festem Habitus.

Das Halten der Pflanzen auf Festmedium ist für eine Backup-Kultur, d. h. für eine arbeitsextensive Langzeitkultur, unabdingbar. Kontaminationen sind hier schnell zu erkennen, und es bleibt die Möglichkeit erhalten, noch nicht kontaminierte Pflanzen zu retten. Festmedium-Kulturen sind arbeitsextensiv, jedoch extrem anfällig für saisonale Schwankungen. Dies erfordert gerade im Sommer und Winter eine erhöhte Aufmerksamkeit,

da diese Kulturen keine Turionen ausbilden und auf ein kontinuierliches vegetatives Wachstum angewiesen sind.

Der Versuch, die Vitalität auf Festmedium durch einen Saccharosezusatz zu erhöhen, hatte reproduzierbar nur bei *W. australiana* Erfolg (SH-Medium + 2 % (w/v) Saccharose). Zu bemerken ist hierbei, daß vermehrt amorphe, aufgedunsene Fronds auftraten, die auf der Variante ohne Saccharose nicht oder nur sehr selten zu beobachten waren. CHU-Medium + 2 % (w/v) Saccharose führte bei *W. columbiana* z. T. auch zu vermehrtem Wachstum gegenüber der Kontrolle. Dies kann abschließend jedoch als nicht reproduzierbar angesehen werden. *W. brasiliensis* verbräunte nach einigen Tagen auf SH-Medium, wenn 0,5 %, 1 % oder 2 % (w/v) Saccharose dem Medium zugegeben waren. Ohne Saccharose traten keine amorphen Pflanzen auf. Bei allen anderen *Wolffia*-Spezies liegen keine Daten vor, da das Pflanzenmaterial nicht ausreichend war, um diesbezüglich größere Versuchsansätze durchführen zu können. Es bleibt festzuhalten, daß alle anderen verfügbaren Klone (Tabelle 6) schlecht (*W. arrhiza* 8272 und 7193, *W. cylindracea*) bis gar nicht (*W. angusta*, *W. borealis*, *W. neglecta*, *W. microscopica*) unter den getesteten Bedingungen auf Festmedium kultivierbar waren.

### 3.6 Wachstumsrate von *Wolffia*

Um eine Aussage darüber zu erhalten, welche *Wolffia*-Spezies die größte Wachstumsrate zeigt, wurden Wachstumsversuche zuerst in kleinen (10 ml), später in größeren Volumina (100 ml) durchgeführt. Diese Daten sollten zudem ermöglichen, Vergleiche bezüglich des Verhaltens der Pflanzen in den zu testenden Bioreaktorsystemen anzustellen. Die Erfassung der Wachstumszahlen erfolgte sowohl durch manuelle Auszählung als auch über bildverarbeitende Software (Kapitel 2.13). Weitere Untersuchungen zum Wachstum von *Wolffia* spec. sind mit dem Scannalyzer der Firma LemnaTec unternommen worden (Kapitel 2.13.5).

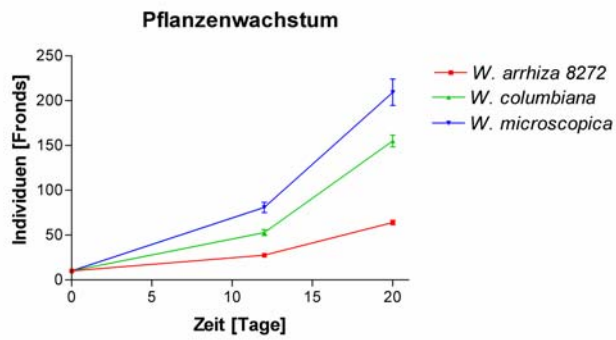
#### 3.6.1 Ermittlung der Wachstumsrate in 6-Well-Platten durch manuelle Auszählung

Zum Zeitpunkt des ersten Versuchs in 6-Well-Platten standen nur *W. arrhiza* 8272, *W. columbiana* und *W. microscopica* zur Verfügung (Kapitel 2.13.1). Der Pflanzenzuwachs, ausgehend von je zehn Pflanzen, ist bei diesen drei Spezies jeweils aus dem Mittelwert aus sechs Parallelansätzen (Abbildung 26a) berechnet worden. Die Versuchsdaten sind in Tabelle 22 zusammengefaßt. Versuch 1 (im Januar durchgeführt) zeigte, daß *W. microscopica* (1/2 SH-Medium) nach drei Wochen den größten Zuwachs mit durchschnittlich 209 Pflanzen

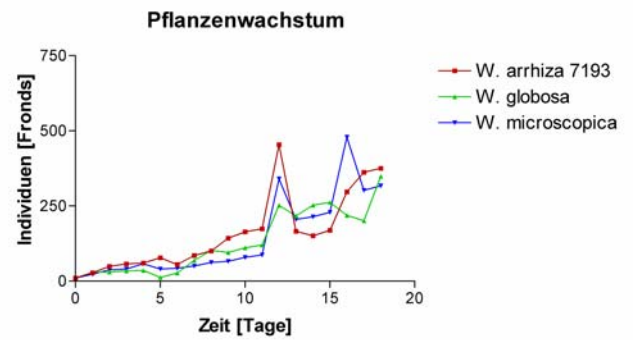
aufwies. Dies entspricht einem durchschnittlichen prozentualen Tageszuwachs von 15,58 %. Die Steigung der *W. columbiana*-Kurve (LM-Medium) ist nur geringfügig flacher (durchschnittlich 155 Pflanzen) und entspricht einem Zuwachs von 13,94 % pro Tag. *W. arrhiza* 8272 (1/10-Hutner-Medium) weist mit 9,24 % pro Tag nur eine geringe Wachstumsrate, errechnet aus durchschnittlich 64 Pflanzen zum Versuchsende, auf (Abbildung 26a). *W. columbiana* war im Gegensatz zu *W. arrhiza* 8272 und *W. microscopica* nach drei Wochen deutlich mit Bakterien kontaminiert. Alle Pflanzen waren am Ende des Versuchs grün und vital.

Versuch 2, durchgeführt im April/Mai mit elf Spezies (Kapitel 2.13.1), zeigte *W. arrhiza* 7193 nach 17 Tagen als Spezies mit dem größten Pflanzenzuwachs (23,76 %/Tag). Auf Position zwei folgte *W. globosa*, für die eine Wachstumsrate von 23,24 % pro Tag errechnet wurde. *W. microscopica* erreichte in diesem Versuch eine Wachstumsrate von 22,55 % pro Tag (Abbildung 27b). Im Vergleich zu Versuch 1 und bezogen auf den prozentualen Tageszuwachs zeigte *W. microscopica* in Versuch 2 ein um den Faktor 1,4 erhöhtes Wachstum, welches auf den jahreszeitlichen Einfluß des Frühjahrs zurückzuführen sein könnte (Kapitel 3.6.3 und Kapitel 4.1.3). Einen Zuwachs von 22,15 % pro Tag erreichte *W. neglecta*, gefolgt von *W. brasiliensis* mit 21,76 % und *W. angusta* mit 21,42 % pro Tag. Im Vergleich zu Versuch 1 erreichte *W. arrhiza* 8272 aus Versuch 2 ein höheres Wachstum um den Faktor 2,2, was einem Zuwachs von 20,64 % pro Tag entspricht. Mit ca. einem Prozentpunkt weniger pro Tag (19,64 %) als *W. arrhiza* 8272 konnte dieser Versuch für *W. elongata* abgeschlossen werden. Für *W. australiana* wurden 18,80 % Tageszuwachs berechnet. Ein vergleichsweise schlechteres Wachstum konnte für *W. cylindracea* (14,57 % pro Tag) und *W. columbiana* (12,49 % pro Tag) beobachtet werden (Abbildung 27b). *W. columbiana* zeigte in Versuch 1 eine höhere Wachstumsrate als in Versuch 2. Für *W. arrhiza* 8272 und *W. microscopica* ergaben sich bessere Resultate in Versuch 2 gegenüber Versuch 1. Zu bemerken ist, daß die Pflanzen aus Versuch 2 bis zum Ende nicht offensichtlich kontaminiert waren. In der graphischen Darstellung von Versuch 2 (Abbildung 26b und c) fallen insgesamt sechs außergewöhnliche Peaks am Tag 12 ins Auge; die Pflanzenanzahl ist danach deutlich reduziert. Dies ist auf einen Unfall zurückzuführen, der zum Verschütten der Versuchspflanzen geführt hatte. Auf Grund der Kontaminationsgefahr wurde davon abgesehen, diese Pflanzen wieder in den Versuch zurückzuführen.

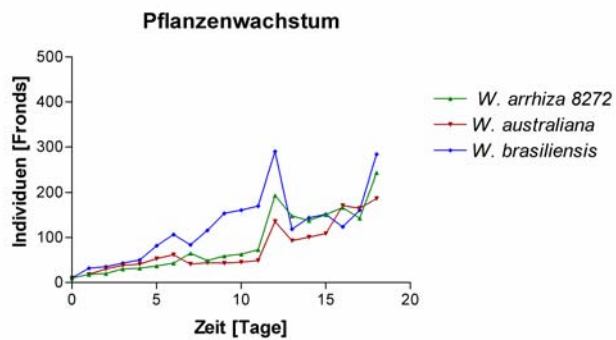
a)



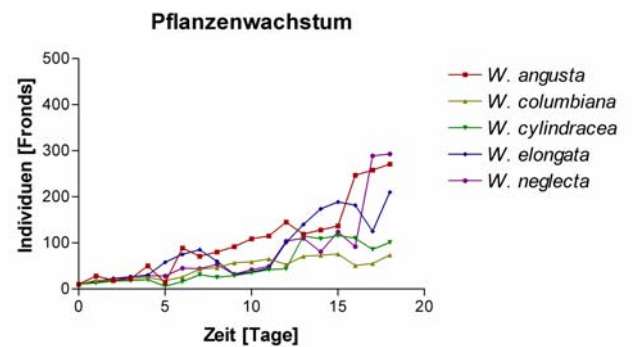
b)



c)



d)



**Abb. 26) Pflanzenzuwachs mittels manueller Auszählung verschiedener *Wolffia*-Spezies**

a) Versuch 1 mit je sechs Parallelansätzen pro Spezies über einen Zeitraum von 21 Tagen in 6-Well-Platten.

b-d) Versuch 2 im einmaligen Ansatz über einen Zeitraum von 17 Tagen in 6-Well-Platten.

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche 1 und 2 sind in der folgenden Tabelle 22 zusammengefaßt.

**Tab. 22) Zuwachs der *Wolffia*-Pflanzen in 6-Well-Platten über einen Zeitraum von 17 (Versuch 2) bzw. 21 Tagen (Versuch 1)**

Die Werte stellen Mittelwerte aus sechs Parallelansätzen dar

\* Einfachbestimmung

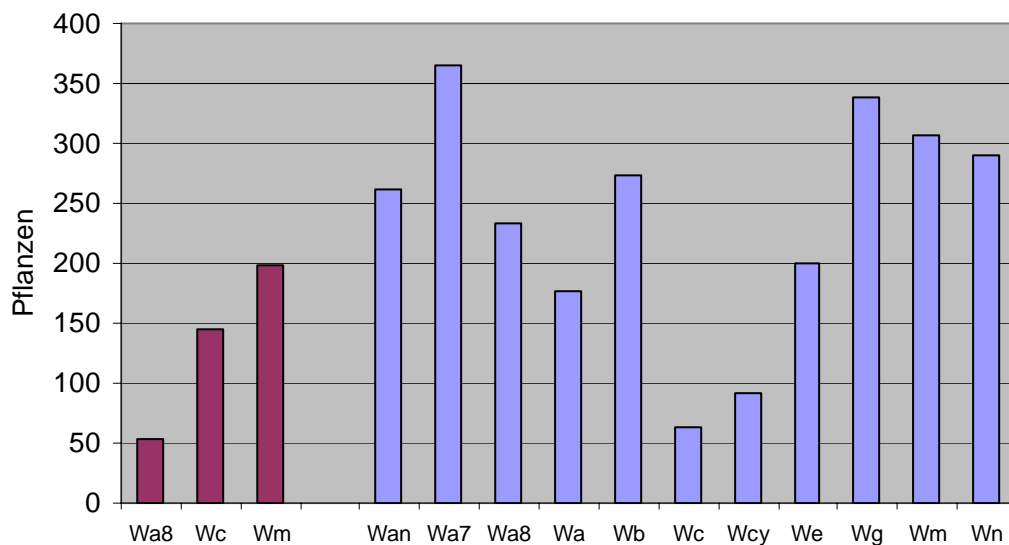
# Die Werte verstehen sich als prozentualer täglicher Zuwachs bezogen auf die Ausgangsmenge von zehn Pflanzen.

Versuch 1 (Abb. 26a)	Individuen am Versuchsende	Netto-Zuwachs [%]	Zuwachs pro Tag [%] <sup>#</sup>
<i>W. arrhiza</i> 8272	64*	540	9,24
<i>W. columbiana</i>	155*	1450	13,94
<i>W. microscopica</i>	209*	1990	15,58
Versuch 2 (Abb. 26b-d)			
<i>W. angusta</i>	271	2610	21,42
<i>W. arrhiza</i> 7193	375	3650	23,76
<i>W. arrhiza</i> 8272	243	2330	20,64
<i>W. australiana</i>	187	1770	18,80
<i>W. brasiliensis</i>	284	2740	21,76
<i>W. columbiana</i>	74	640	12,49
<i>W. cylindracea</i>	101	910	14,57
<i>W. elongata</i>	210	2000	19,61
<i>W. globosa</i>	349	3390	23,24
<i>W. microscopica</i>	317	3070	22,55
<i>W. neglecta</i>	300	2900	22,15

Der Netto-Zuwachs in Fronds sowie der Netto-Zuwachs in Prozent der Versuche 1 und 2 sind in Abbildung 27 dargestellt.

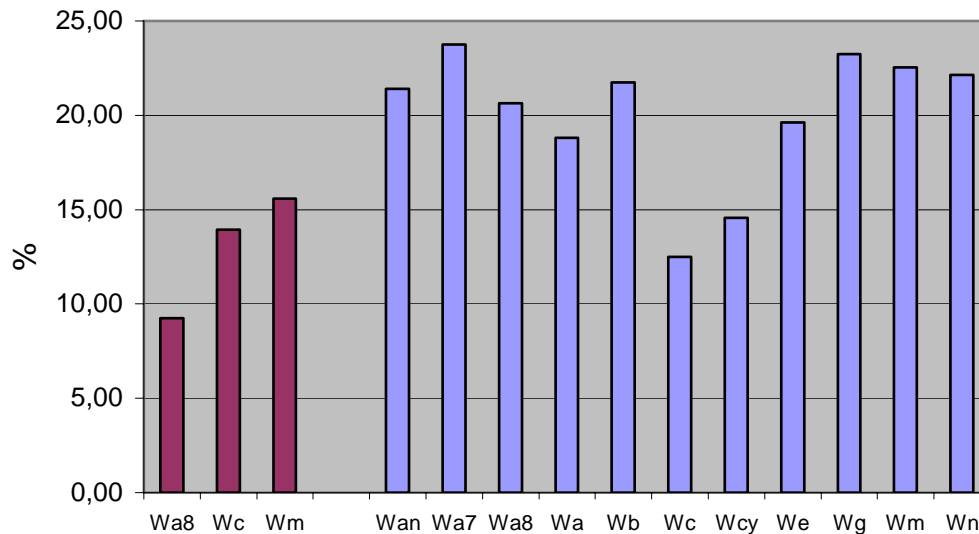
a)

Netto-Zuwachs aus Versuch 1 und 2



b)

## Täglicher Zuwachs [Prozent] der Versuche 1 und 2



**Abb. 27) Netto-Pflanzenzuwachs (a) aus den Versuchen 1 (Säule 1-3) und Versuch 2 (Säule 4-14) und prozentualer Tageszuwachs (b)**

Wa7 = *W. arrhiza* 7193, Wg = *W. globosa*, Wm = *W. microscopica*, Wn = *W. neglecta*,  
 Wb = *W. brasiliensis*, Wan = *W. angusta*, Wa8 = *W. arrhiza* 8272, We = *W. elongata*,  
 Wa = *W. australiana*, Wcy = *W. cylindracea*, Wc = *W. columbiana*

### 3.6.2 Ermittlung der Wachstumsdaten mit Hilfe der SigmaScan-Software

Ziel der Wachstumsversuche in den Glasschalen war, drei *Wolffia*-Spezies zu identifizieren, die unter standardisierten Laborbedingungen die größten Netto-Pflanzenzuwachsrate aufweisen.

Für größere Kultur-Volumina ist das manuelle Auszählen nicht mehr praktikabel und deshalb ungeeignet. Zur Ermittlung von Daten aus großen Pflanzenkulturen konnten einige Tools aus der Software SigmaScan 5.0 benutzt werden (Kapitel 2.13.3). Die am besten geeigneten Gefäße, um das Wachstum von *Wolffia* durch digitale Tools untersuchen zu können, sind autoklavierbare Glasschalen, die den Pflanzen genug Oberfläche für optimales Wachstum bieten. Die Oberflächendeckung durch die Pflanzen kann durch Scannen digital erfaßt werden. Der erste Schritt des Scannens zur digitalen Bildbearbeitung ist mit Erlenmeyerkolben unmöglich, mit Zellkulturflaschen und 6-Well-Platten sehr schwierig. Diese Kulturgefäße sind deshalb keiner digitalen Auswertung unterzogen worden.

Bei der Auswertung der insgesamt vier Schalenversuche S2-S5 über einen Zeitraum von 15 bzw. 21 Tagen ergaben für die verschiedenen *Wolffia*-Spezies z. T. große Unterschiede im Wachstumsverhalten (Abbildung 28). Zu erwähnen ist, daß *W. brasiliensis* in drei von vier

Fällen gegen Ende der Versuchsphase unter einem Pilzbefall litt, was die standardisierte rechnergestützte Auswertung nicht mehr erlaubte. Für *W. columbiana* konnte am Ende der dritten Woche keine Auswertung mehr vorgenommen werden, da nur noch weiße Fronds vorhanden waren.

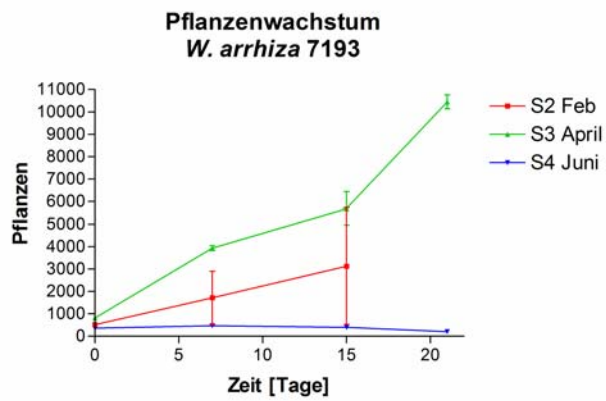
Betrachtet man den durchschnittlichen prozentualen Tageszuwachs aller Schalenversuche unter Berücksichtigung beider Zeiträume, so muß *W. cylindracea* mit 19,00 % am Tag 15 aus dem Versuch S3 (April) Platz 1 zugeordnet werden. *W. australiana* und *W. angusta* folgen auf den Plätzen 2 und 3 (18,74 bzw. 16,99 % Tageszuwachs). Die Daten stammen bei beiden Spezies aus dem Versuch S4 (Juni) und beziehen sich ebenfalls auf die Auswertung am Tag 15. Zu bemerken ist, daß im Vergleich der zugrunde gelegten Zeiträume die tägliche prozentuale Zuwachsrates nach Ende der zweiten Woche eine höhere war, als am Ende der dritten Woche. Eine Ausnahme stellen die Schalenversuche S3 und S4 von *W. arrhiza* 8272 dar, in denen nach 21 Tagen mehr Zuwachs zu beobachten war als nach Tag 15. Prinzipiell scheint mit den beschriebenen Parametern (Kapitel 2.13.2) eine zweiwöchige statt einer dreiwöchigen Kultivierung empfehlenswert zu sein.

Wird das Jahresmittel (Mittelwert der prozentualen Zuwachsrates aller Zeiträume) betrachtet, so kann die Zuordnung von *W. cylindracea* auf Platz 1 (16,16 %) beibehalten werden. *W. angusta* belegt mit 15,66 % Platz 2, sehr dicht gefolgt von *W. australiana* mit 15,59 % täglicher Zuwachsrates (Abbildung 29d). Diese Daten beziehen sich ausschließlich auf die Auswertung am Tag 15. Die Fehlerbalken aus Abbildung 29d, die die Standardabweichung repräsentieren, geben Aufschluß über die Zuverlässigkeit des Wachstums der jeweiligen Spezies über die vier Jahreszeiten. Stabile Zuwachsrates können demnach für *W. cylindracea* (bezogen auf Tag 15 und 21), *W. australiana* (15/21), *W. angusta* (15) und *W. arrhiza* 7193 (15) erwartet werden.

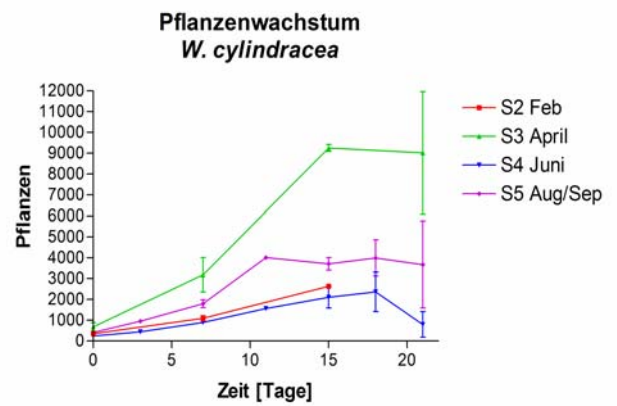
Der Vergleich des Netto-Zuwachses mit den Prozentdaten zeigt, wie wichtig die Ausgangsmenge an Pflanzen ist. Sie ist in hohem Maße ausschlaggebend für die Wachstumsdynamik und damit Biomasseproduktion der Kultur. Wird eine kritische Menge Fronds beim Animpfen überschritten, setzen die Pflanzen ohne Zeitverzögerung ihr vegetatives Wachstum fort. Wie individuell dieses kritische Maß sein kann, wird an dem prozentuale Tageswachstum von *W. australiana* aus dem Versuch S4 (Juni) deutlich: Mit einer Tagesleistung von 16,14 % Zuwachs repräsentiert dieser Versuch die größte Wachstumsrate nach 21 Tagen. Besonders hervorzuheben ist, daß diesem Wachstum nur eine vergleichsweise geringe Animpfmengung von durchschnittlich 180 Fronds zu Grunde liegt.

Die Zahlen zur Berechnung der hier wiedergegebenen Daten sind in Tabelle 23 zusammengefaßt.

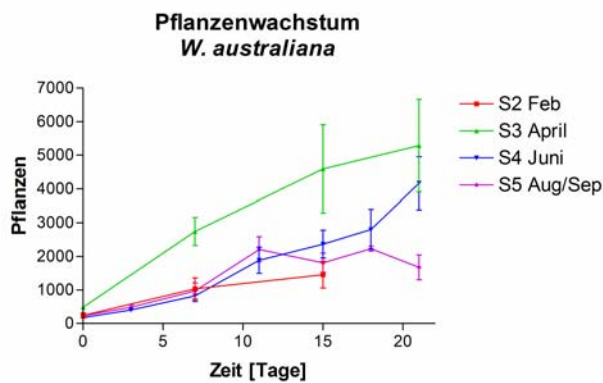
a)



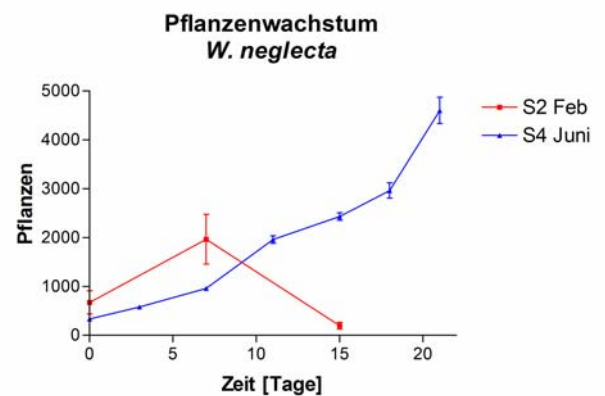
b)



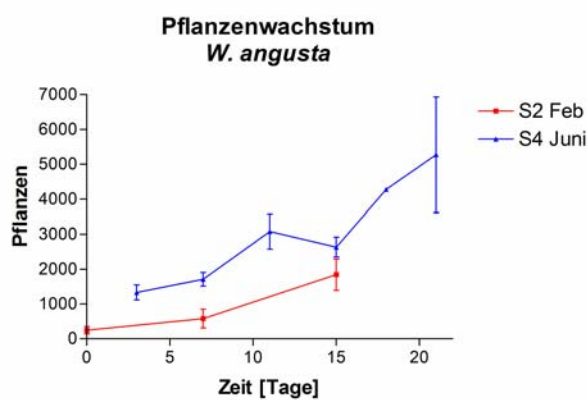
c)



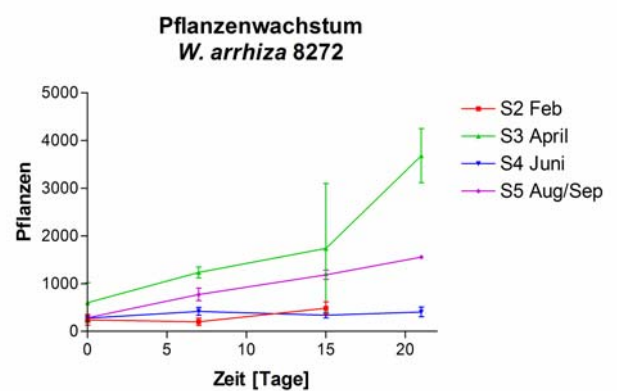
d)



e)

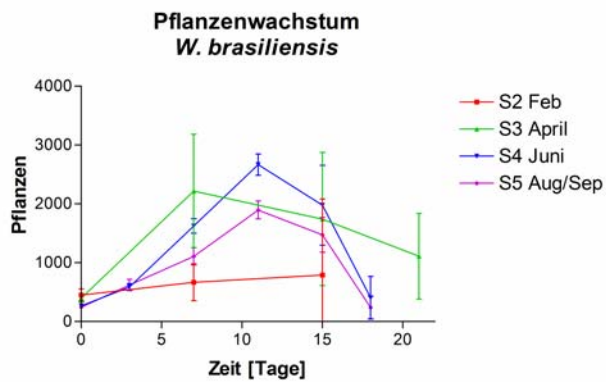


f)

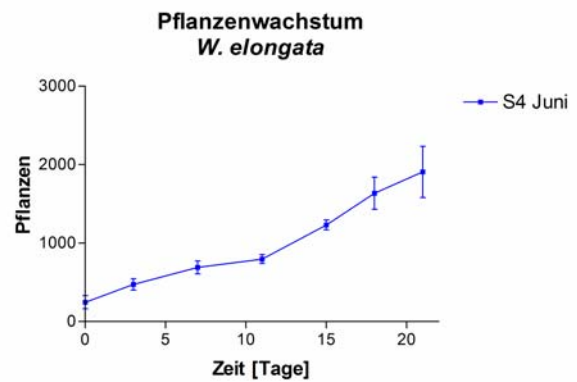




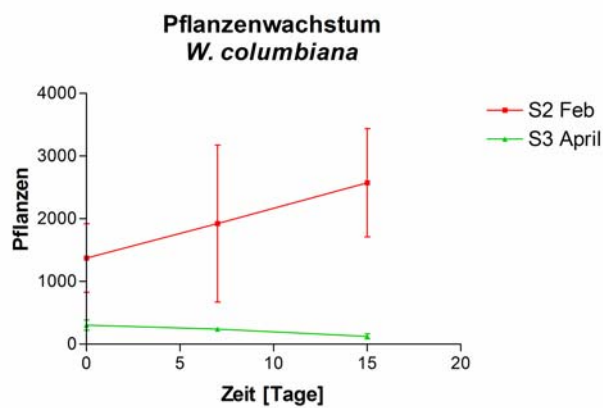
g)



h)



i)



**Abb. 28) Wachstumsverlauf verschiedener *Wolffia*-Arten durch mathematische Berechnung der Pflanzenanzahl in unterschiedlichen Jahreszeiten**

S2 = Schalenversuch 2 (Februar), S3 = Schalenversuch 3 (April), S4 = Schalenversuch 4 (Juni),

S5 = Schalenversuch 5 (August/September)

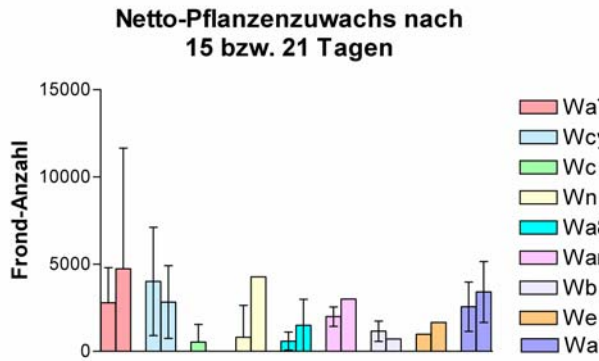
Die Werte verstehen sich als Mittelwert aus je drei Parallelansätzen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Tab. 23) End-pH-Wert und Wachstumsdaten verschiedener *Wolffia*-Spezies aus den Schalenversuchen S2 bis S5

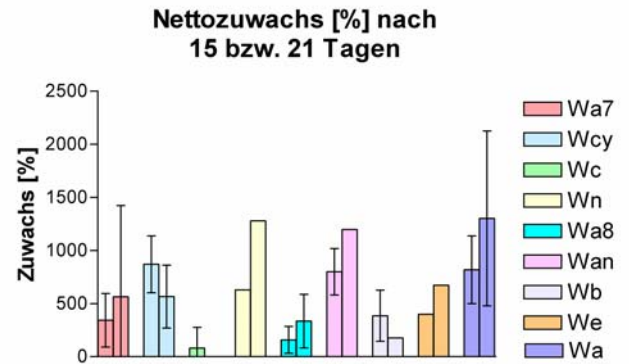
<i>Wolffia</i> -Spezies	Start [Fronds]	Tag 15 [Fronds]	Netto-Zuwachs Tag15 [Fronds]	Netto-Zuwachs Tag 15 [%]	Zuwachs/Tag [%]	Start [Fronds]	Tag 21 [Fronds]	Netto-Zuwachs Tag 21 [Fronds]	Netto-Zuwachs Tag 15 [%]	Zuwachs/Tag [%]	End-pH	
<b><i>W. arrhiza</i> 7193</b>												
S2	521	3133	2612	501,34	12,70							
S3	822	5700	4878	593,43	13,78	822	10445	9623	1170,68	12,87	4,9	
S4	363	1210	847	233,33	8,36	363	209	-154	-42,42	-2,59		
<b><i>W. cylindracea</i></b>												
S2	351	2639	2288	651,85	14,40							
S3	681	9255	8574	1259,03	19,00	681	5329	4648	682,53	10,29	3,5	
S4	242	2105	1863	769,83	15,51	242	797	555	229,34	5,84	3,6	
S5	415	3715	3300	795,18	15,73	415	3673	3258	785,06	10,94	3,5	
<b><i>W. australiana</i></b>												
S2	240	1454	1214	505,83	12,76							
S3	448	4595	4147	925,67	16,79	448	5228	4780	1066,96	12,41	4,5	
S4	180	2366	2186	1214,44	18,74	180	4169	3989	2216,11	16,14	3,9	
S5	232	1674	1581	681,47	14,08	232	1674	1442	621,55	9,87	3,5	
<b><i>W. neglecta</i></b>												
S2	672	196	-476	-29,17	-7,89							
S4	334	2431	2097	627,84	14,15	334	4600	4266	1277,25	13,30	5,6	
<b><i>W. arrhiza</i> 8272</b>												
S2	241	487	246	102,07	4,80							
S3	602	1741	1139	189,20	7,34	602	3681	3079	511,46	9,00	5,1	
S4	278	340	62	22,30	1,35	278	407	129	46,40	1,83	5,9	
S5	284	1185	901	317,25	9,99	284	1555	1271	447,54	8,43	3,4	
<b><i>W. angusta</i></b>												
S2	248	1846	1598	644,35	14,32							
S4	250	2634	2384	953,60	17,00	250	3244	2994	1197,60	12,98	5,6	
<b><i>W. brasiliensis</i></b>												
S2	451	790	339	75,17	3,81							
S3	403	1743	1340	332,51	10,26	403	1110	707	175,43	4,94	3,4	
S4	270	1978	1708	632,59	14,20	270						
S5	245	1473	1228	501,22	12,70	245						
<b><i>W. elongata</i></b>												
S4	247	1231	984	398,38	11,30	247	1908	1661	672,47	10,22	3,7	
<b><i>W. columbiana</i></b>												
S2	572	1824	1252	218,88	8,04							
S3	303	124	-179	-59,08	-5,78							

Die in Tabelle 23 dargestellten Daten aus bis zu vier Wiederholungen (Kapitel 2.13) sind in der folgenden Abbildung 29 in Balkendiagrammen wiedergegeben.

a)

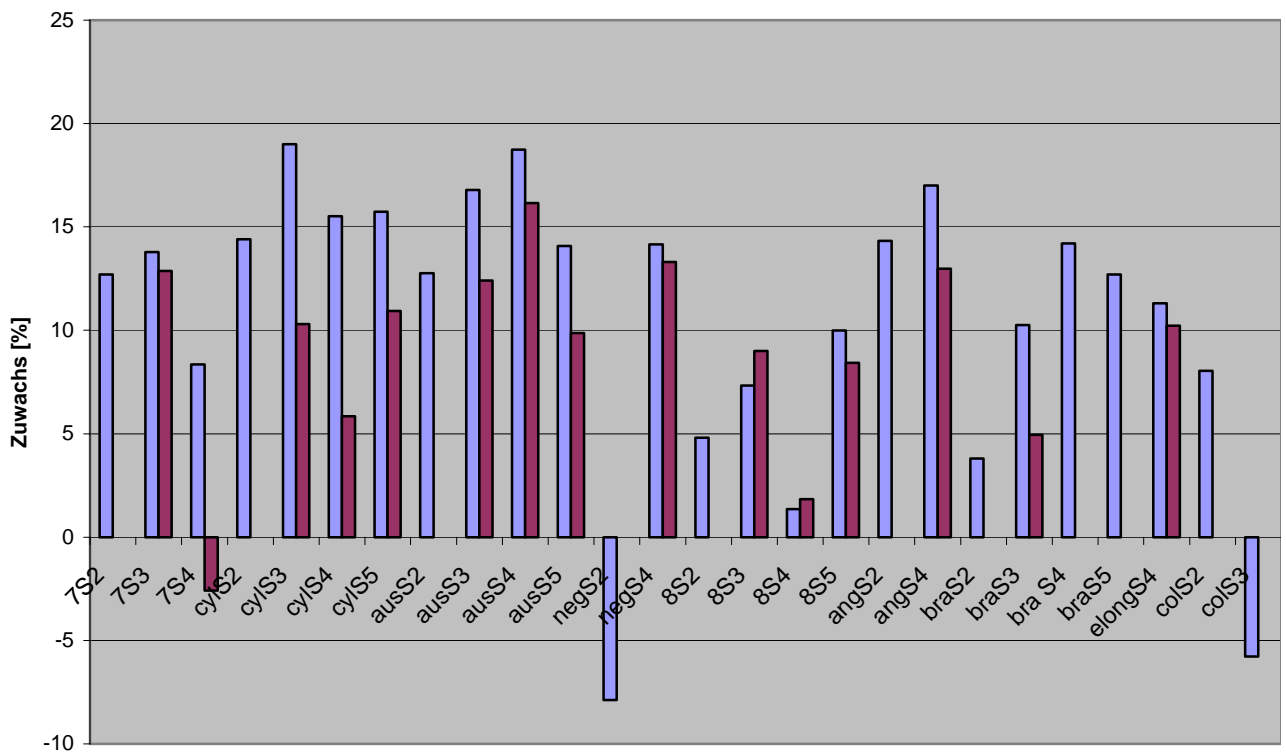


b)

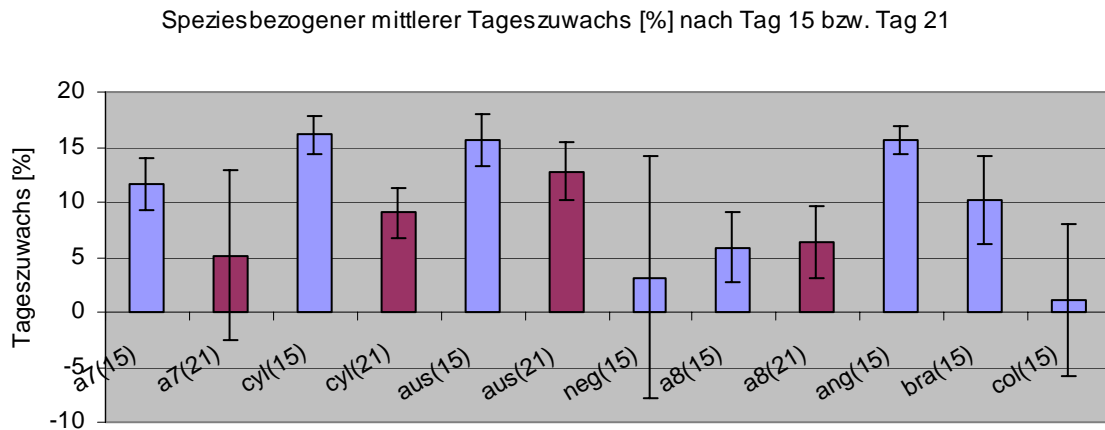


c)

**Tägliche Zuwachsrate bezogen auf Tag 15 bzw. Tag 21**



d)



**Abb. 29)** Darstellung des Netto-Gesamtzuwachses in Fronds (a), des Netto-Pflanzenzuwachses in Prozent (b), des prozentualen Tageswachstums (c) nach 15 (jeweils erster bzw. blauer Balken) bzw. 21 Tagen (jeweils zweiter bzw. roter Balken) sowie des zusammengefaßten Tageswachstums (d) der Schalenversuche S2, S3, S4 und S5

Wa7 = *W. arrhiza* 7193, Wcy = *W. cylindracea*, Wc = *W. columbiana*, Wn = *W. neglecta*, Wa8 = *W. arrhiza* 8272, Wan = *W. angusta*, Wb = *W. brasiliensis*, We = *W. elongata*, Wa = *W. australiana*  
Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

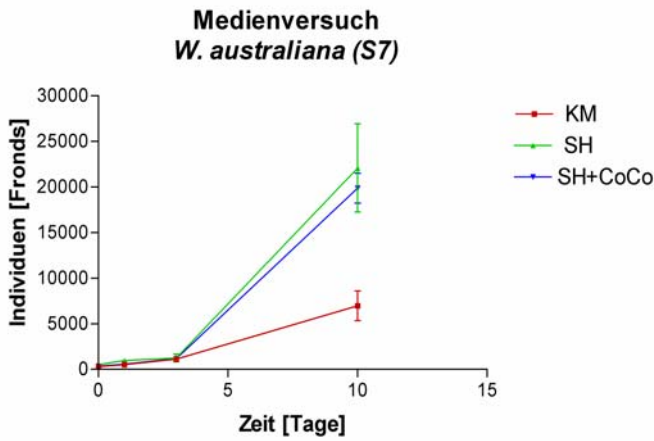
Da z. T. die Frischmasse (FM) am Ende der Versuche bestimmt wurde (Kapitel 2.10), wurde versucht, das ungefähre Frond-Gewicht der einzelnen Spezies zu ermitteln. Hierbei wurde deutlich, daß die Werte auch innerhalb der jeweiligen Spezies großen Schwankungen unterliegen und damit zu sehr ungenauen allgemeinen Aussagen das Gewicht betreffend führen würden. Nach sechsfacher Wiederholung des Wiegens und manueller Auszählung konnte ermittelt werden, daß ca. 4300 Fronds von *W. columbiana* einem Gramm FM entsprechen. Dies entspricht einem Einzelfrondgewicht von ca. 230 µg. Da *W. columbiana* eine im Vergleich mit den anderen Spezies durchschnittliche Größe aufweist, kann allgemein innerhalb der Sektion *Wolffia* von einem Einzelfrondgewicht zwischen 200 und 250 µg ausgegangen werden.

In den Schalenversuchen S7 (Mai) und S8 (Juni) wurden Medien sowie Medienzusätze wie Kinetin und Kokosnußwasser getestet (Kapitel 2.13.2). Nach zehn Tagen erreichte *W. australiana* im Versuch S7 auf SH-Medium eine durchschnittliche tägliche Zuwachsrate von 45,62 %. Durch den Zusatz von 1 % (v/v) Kokosnußwasser konnte die Zuwachsrate mit 49,91 % übertroffen werden. Konditioniertes Medium erreichte durchschnittlich 37,46 % am Ende des Versuches (Abbildung 30c).

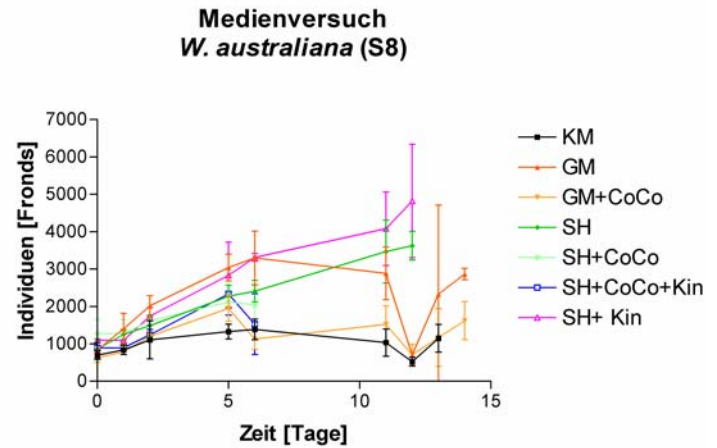
Aus Schalenversuch 8 konnten nicht alle Ansätze in die Auswertung einbezogen werden, da ab dem 11. Versuchstag z. T. Kontaminationen auftraten, die die Messungen beeinträchtigten. Aus dem Vergleich der Zuwachsrate am Tag 11 geht hervor, daß SH-Medium ohne Zusätze die größte tägliche Zuwachsrate von 13,79 % aufwies. Der Zusatz 1 % (v/v) Kinetin zum SH-Medium

induzierte eine tägliche Wachstumsrate von 12,56 %. Des weiteren konnten die Wachstumsraten der Pflanzen auf GM (12,02 %), GM + 1 % (v/v) Kokosnußwasser (8,16 %) und KM (3,31 %) ermittelt werden (Abbildung 30d).

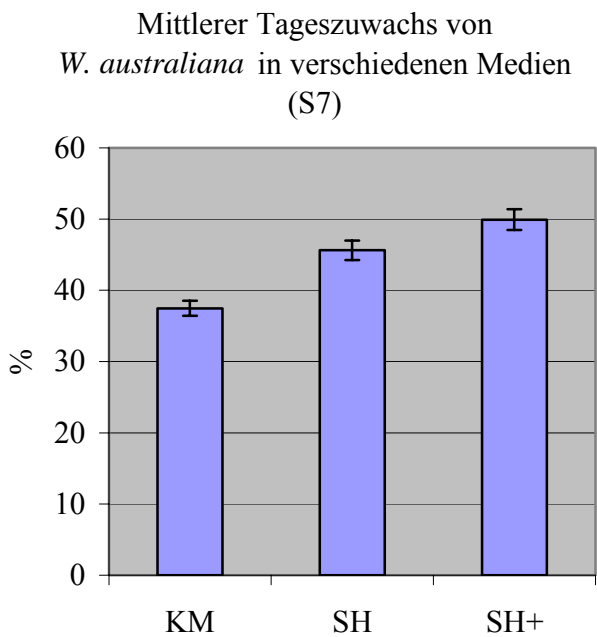
a)



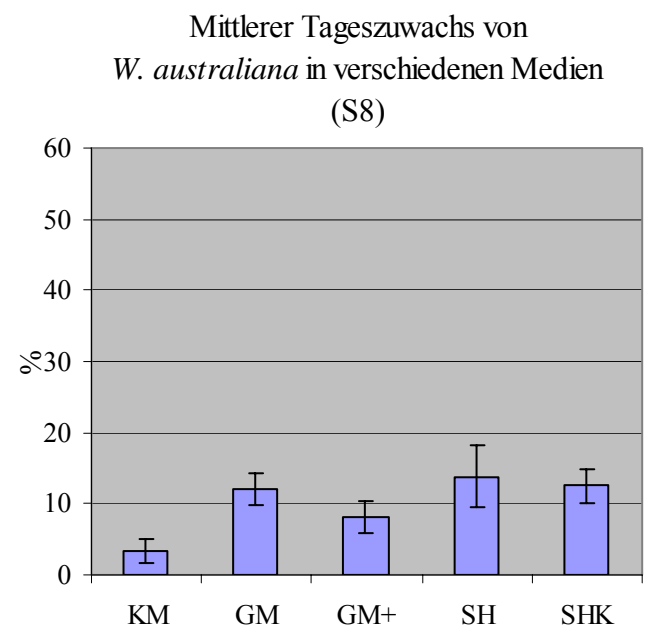
b)



d)



e)



**Abb. 30) Versuche zu Medien und Medienzusätzen für die Netto-Zuwachsrate in Fronds von *W. australiana***

KM = konditioniertes Medium; SH = Schenk- und Hildebrandt-Medium; SH+CoCo = SH + 1 % (v/v) Kokosnußwasser; GM = Growth-Medium; GM+ CoCo = GM + 1 % (v/v) Kokosnußwasser; GM+ CoCo+Kin = GM + 1 % (v/v) Kokosnußwasser + 1 % (v/v) Kinetin; SH+Kin = SH + 1 % (v/v) Kinetin

### 3.6.3 Statistische Auswertung der Schalenversuche

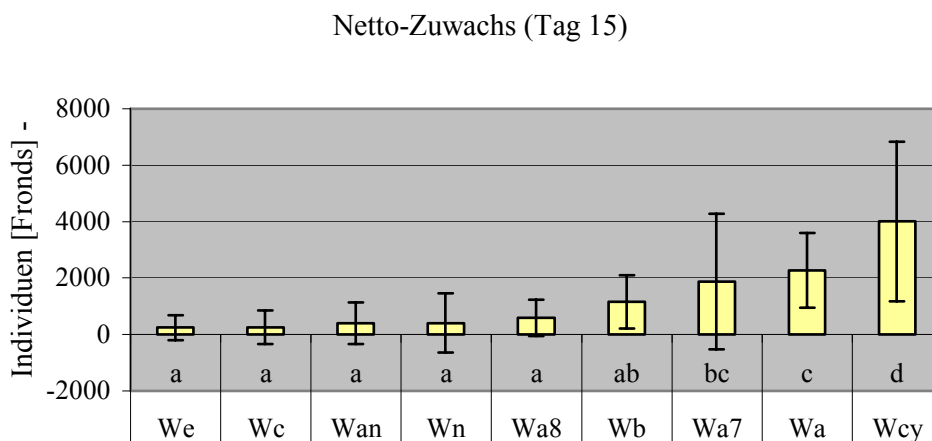
Die statistische Auswertung der Schalenversuche S2 bis S5 (Kapitel 2.13.2) erfolgte mit SPSS 8.0 und bezieht sich zum einen auf den Netto-Zuwachs in Fronds nach 15 Tagen (Februar, April, Juni und August/September) und zum anderen auf den Zuwachs nach 21 Tagen (April, Juni und August/September). Im letztgenannten Zeitraum wurde *W. angusta* für die Auswertung nicht berücksichtigt, da die minimale Anzahl Wiederholungen für eine Varianzanalyse nicht erreicht werden konnte. Der Tabelle 24 sind die Werte aus der Varianzanalyse nach Tag 15 zu entnehmen.

**Tab. 24) Varianztafel bezogen auf die Auswertung der Zuwachsraten nach Tag 15**

df = degrees of freedom (Freiheitsgrade); SQ = Quadratsumme; MQ = mittlere quadratische Abweichung; F = Fischerverteilung; p = Signifikanz;  $\eta^2$  = partielles Eta-Quadrat

Varianzursache	df	SQ	MQ	F	p	$\eta^2$
Spezies	8	155074121,35	19384265,0	47,999	0,0	0,842
Zeitpunkt	3	34146751,556	11382251,0	28,185	0,0	0,540
Spezies x Zeitpunkt	24	145800088,94	6075003,7	15,043	0,0	0,834
Fehler	72	29076956,667	493846,6			
Gesamtvariation	108	531580308,0				

Anhand der errechneten Mittelwerte aus den Netto-Zuwachsdaten konnte *W. cylindracea* als Spezies mit dem größten durchschnittlichen Netto-Zuwachs in Fronds (4006) nach 15 Tagen ermittelt werden. Darüber hinaus wurde diesbezüglich eine sehr hohe Signifikanz ( $p = 0$ ) festgestellt. Die Mehrfachvergleiche zeigten zudem, daß signifikante Unterschiede ( $p = 0,05$ ) in Bezug auf den Netto-Zuwachs der anderen getesteten *Wolffia*-Spezies auftraten (Abbildung 31).



**Abb. 31) Netto-Zuwachsrate von *Wolffia* spec. nach 15 Tagen**

Die Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach Games-Howell-Test ( $p < 0,05$ );  $N = 540$

Wa7 = *W. arrhiza* 7193, Wcy = *W. cylindracea*, Wc = *W. columbiana*; Wn = *W. neglecta*, Wa8 = *W. arrhiza* 8272, Wan = *W. angusta*, Wb = *W. brasiliensis*, We = *W. elongata*, Wa = *W. australiana*

Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Bezogen auf den Zeitpunkt war im April der größte mittlere Netto-Zuwachs mit 2207 Fronds nach 15 Tagen zu beobachten (Abbildung 33), was ca. dem doppelten der Rate im Februar, Juni und August/September entsprach. Tendenziell ist dem Faktor Zeitpunkt ein sehr großer Einfluß auf die Netto-Zuwachsrates zuzuordnen.

Von den getesteten Spezies (Kapitel 2.13) erreichten unter Berücksichtigung aller Zeitpunkte *W. cylindracea*, *W. australiana* und *W. arrhiza* 8272 das Maximum der Zuwachsrates in Fronds im April, *W. brasiliensis* dagegen im Juni.

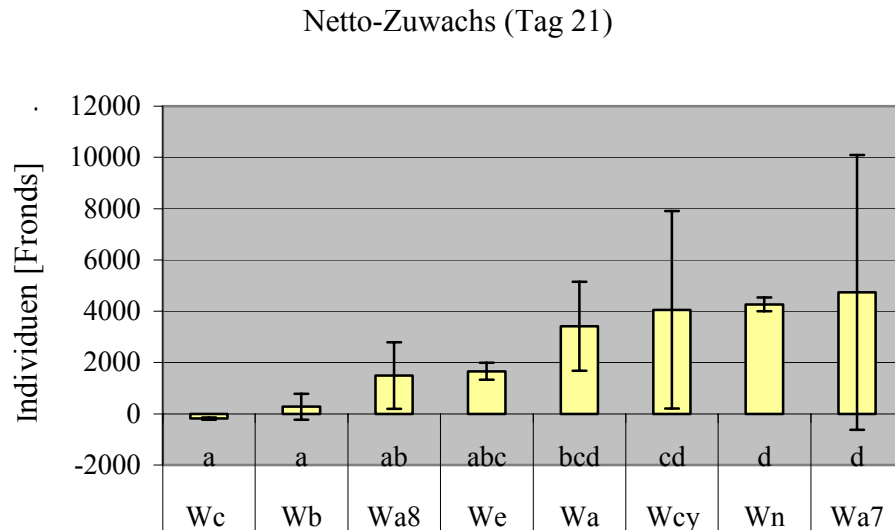
Anhand der errechneten Mittelwerte konnte nach 21 Tagen *W. arrhiza* 7193 mit dem größten Netto-Zuwachs in Fronds (4735) ermittelt werden. Die Daten der Varianzanalyse nach Tag 21 sind in Tabelle 25 dargestellt.

**Tab. 25) Varianztafel bezogen auf die Auswertung der Zuwachsrates nach Tag 21**

df = degrees of freedom (Freiheitsgrade); SQ = Quadratsumme; MQ = mittlere quadratische Abweichung; F = Fischerverteilung; p = Signifikanz;  $\eta^2$  = partielles Eta-Quadrat

Varianzursache	df	SQ	MQ	F	p	$\eta^2$
Spezies	7	204193320,94	29170474	30,954	0,0	0,864
Zeitpunkt	2	156046626,36	78023313	82,794	0,0	0,830
Spezies x Zeitpunkt	7	113902832,98	16271833	17,267	0,0	0,780
Fehler	34	32040819,33	942377			
Gesamtvariation	51	772803112,0				

Die Mehrfachvergleiche zeigten auch nach 21 Tagen signifikante Unterschiede ( $p = 0,05$ ) in Bezug auf den Netto-Zuwachs der *Wolffia*-Spezies (Abbildung 32).



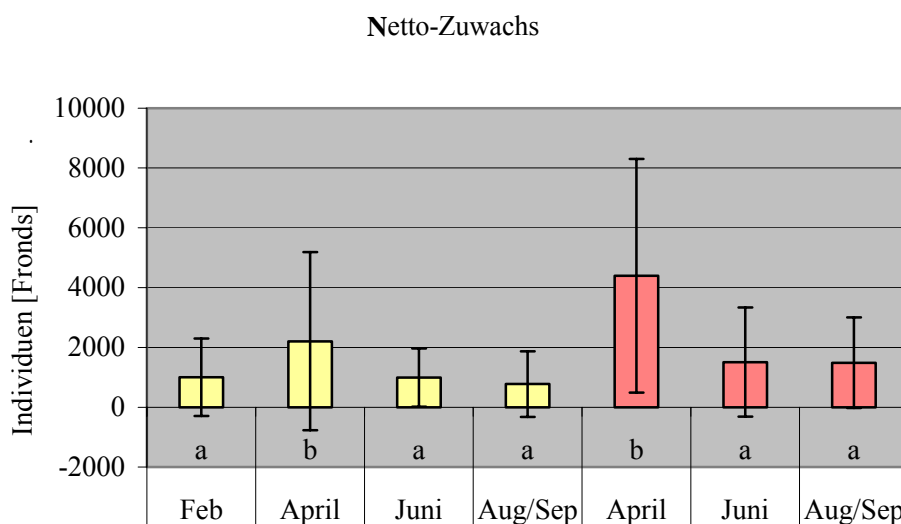
**Abb. 32) Netto-Zuwachsrate von *Wolffia spec.* nach 21 Tagen**

Die Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach Games-Howell-Test ( $p < 0,05$ );  $N = 504$

Wa7 = *W. arrhiza* 7193, Wcy = *W. cylindracea*, Wc = *W. columbiana*,  
Wn = *W. neglecta*, Wa8 = *W. arrhiza* 8272, Wan = *W. angusta*,  
Wb = *W. brasiliensis*, We = *W. elongata*, Wa = *W. australiana*

Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Der höchste mittlere Zuwachs von 4397 Fronds wurde nach 21 Tagen für den Zeitpunkt April ermittelt, der sich auch in den Mehrfachvergleichen als signifikant verschieden von den Zeitpunkten Juni und August/September herausstellte (Abbildung 33).



**Abb. 33) Netto-Zuwachsrate von *Wolffia spec.* nach 15 bzw. 21 Tagen innerhalb der getesteten Zeitpunkte**

Die Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach Games-Howell-Test ( $p < 0,05$ );  $N(15) = 540$ ;  $N(21) = 504$

gelb = Zuwachs nach 15 Tagen; rot = Zuwachs nach 21 Tagen

Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.



In der statistischen Auswertung der Netto-Zuwachsraten in Fronds von *W. australiana* (S7 und S8) konnte eine sehr hohe Signifikanz ( $p = 0,002$ ) für den Faktor des Mediums bzw. der Medienzusätze festgestellt werden (Abbildung 34). SH-Medium induzierte in den Versuchen eine Wachstumsrate von 22073 Fronds (S7), im Schalenversuch S8 3468 Fronds. Aus dem Versuch S8 ging SH-Medium mit einem Zusatz von 1 % (v/v) Kinetin als die Kombination hervor, bei der das größte Wachstum (4078 Fronds) beobachtet wurde.

Netto-Zuwachs in Fronds aus den Versuchen S7 und S8

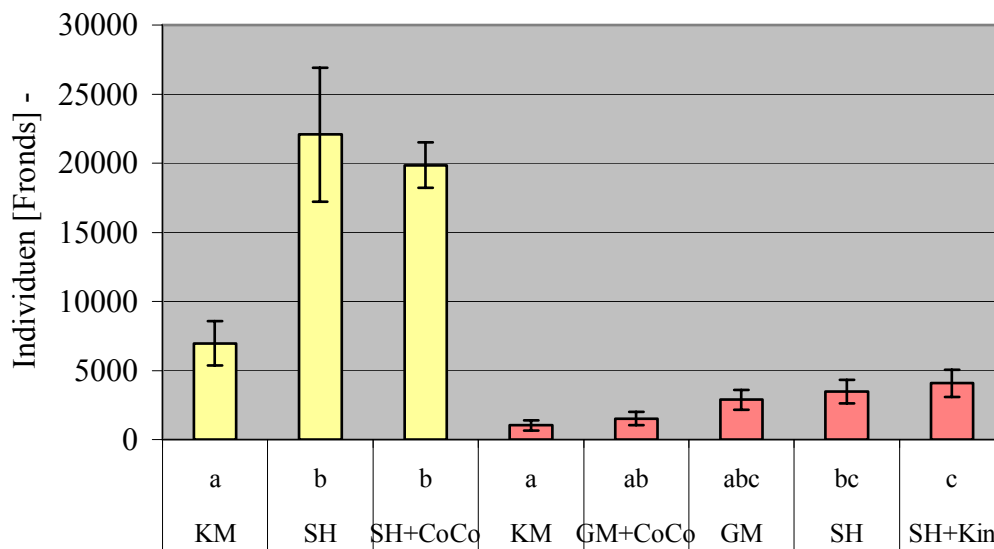


Abb. 34) Netto-Zuwachsrate von *Wolffia spec.* nach 10 (S7) bzw. 11 Tagen (S8) unter dem Einfluß verschiedener Medien und Zusätze

Die Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede nach Scheffé-Test ( $p < 0,05$ ); N (S7) = 30; N (S8) = 60

KM = konditioniertes Medium; SH = Schenk- und Hildebrandt-Medium; SH+CoCo = SH + 1 % (v/v) Kokosnußwasser; GM = Growth-Medium; GM+CoCo = GM + 1 % (v/v) Kokosnußwasser; SH+Kin = SH + 1 % (v/v) Kinetin

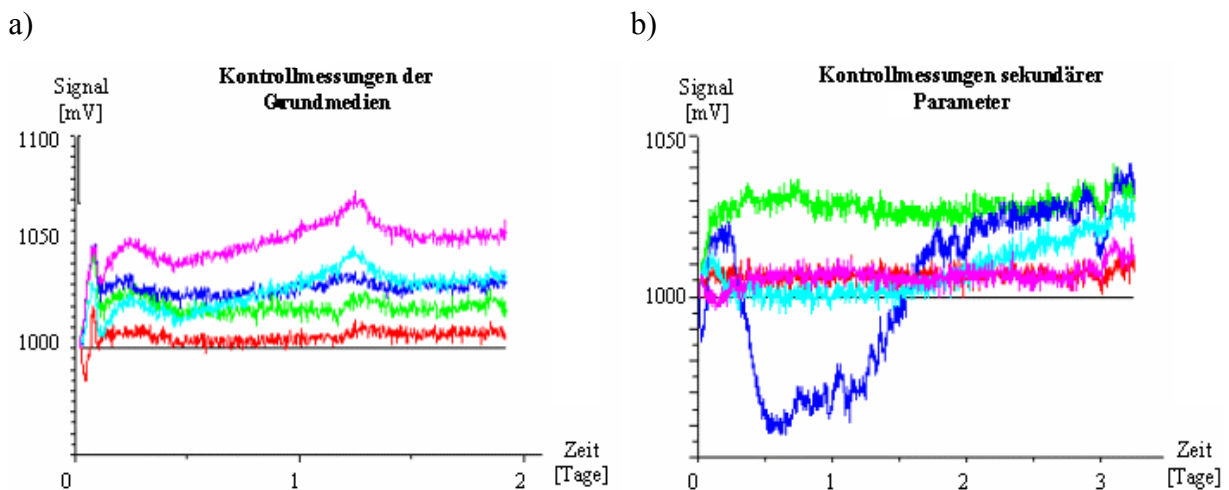
gelb = Zuwachs nach 10 Tagen; rot = Zuwachs nach 12 Tagen

Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.7 Biomasse-Korrelation mit dem CellScan-System

Ziel der CellScan-Versuche war es, die Sauerstoffproduktion von *Wolffia*-Kulturen zu erfassen, um mit diesen Werten die Zunahme von Biomasse korrelieren zu können. Hier lag die Überlegung zu Grunde, daß eine große Biomasse von *Wolffia*-Pflanzen auch eine hohe Sauerstoffproduktion aufweist. Des weiteren sollte es möglich sein, das Meßsystem in den später zu benutzenden Bioreaktor zu integrieren, um über eine serielle Schnittstelle eine kontinuierliche Überwachung der Fermenterkultur gewährleisten zu können. Geprüft wurden Sekundärparameter wie Medium, CO<sub>2</sub>-Gehalt und Antibiotika bezüglich ihres möglichen Einflusses auf den Meßsensor, um ggf. diesen

Einfluß in den Meßwerten herausrechnen zu können: Wasser, SH-Medium, die Zugabe einer CO<sub>2</sub>-Tablette (Abbildung 35a), sowie die Antibiotika Rifampicin und Penicillin (Abbildung 35b) haben auf den Meßfühler und damit auf die Messung keinen Einfluß. Die Abweichungen der Kurven lagen innerhalb des Toleranzbereiches von bis zu 60 Einheiten. Dieses kleine Intervall bedeutet keine Änderung des Sauerstoffgehaltes (Brinkmann, persönliche Mitteilung). Einen ungewöhnlichen Kurvenverlauf zeigte die Variante SH-Medium + CO<sub>2</sub>-Tablette + 200 µg/ml Rifampicin (Abbildung 35b). Hier verlief die Kurve nach einem Anstieg für einige Zeit deutlich unter den anderen und pendelte sich erst nach ca. 48 Stunden wieder auf Normalniveau ein. Die hier dargestellten Kurven entsprechen nicht den Rohdaten, sondern vielmehr dem Kurvenverlauf, der sich ergibt, wenn eine der Kurven als Baseline definiert wird. Von allen Daten aus dem entsprechenden Ansatz sind nachfolgend die Baseline-Werte subtrahiert worden.



**Abb. 35) Kontrollmessungen von Grundmedien (a), sekundärer Parameter und antibiotischer Wirksubstanzen (b) im unversiegelten Versuchsaufbau**

a) schwarz (Baseline) = 8 ml Wasser; rot = 8 ml Wasser; grün und blau = 8 ml SH-Medium; hellblau und pink = 8 ml SH-Medium + CO<sub>2</sub>-Tablette

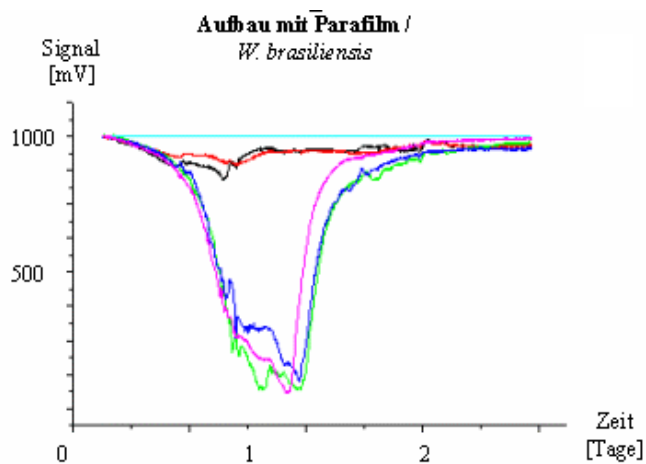
b) schwarz (Baseline) = 8 ml Wasser, rot = 8 ml Wasser; grün und blau = 8 ml SH-Medium + CO<sub>2</sub>-Tab + 200 µg/ml Rifampicin; hellblau und pink = 8 ml SH-Medium + 200 µg/ml Rifampicin

Mit freundlicher Genehmigung von U. Brinkmann (ICB, Münster)

Zur Ermittlung der Sauerstoffdifferenz war es notwendig, die Versuchsplatte luftdicht zu verschließen. Hierfür wurden verschiedene Abdichtungsmöglichkeiten wie Parafilm, Frischhaltefolie, Schraubzwingen und eine mit Spiegelkleber aufgeklebte Glasplatte evaluiert. Gemessen wurden mehrere Versuchsansätze mit *W. australiana*, *W. brasiliensis*, *W. columbiana* und *W. cylindracea*. Zur Unterscheidung einer vitalen und einer absterbenden Kultur wurde einige Pflanzenchargen mit 70 % (v/v) Ethanol, Rifampicin bzw. Nystatin vergiftet.

Der mit Parafilm verschlossene Versuch mit *W. brasiliensis* zeigte zwischen vergifteten (mit 70 % (v/v) Ethanol) und unvergifteten Pflanzen (SH-Medium) deutliche Unterschiede im Kurvenverlauf (Abbildung 36). Während sich die Kurven aus der Messung der unvergifteten

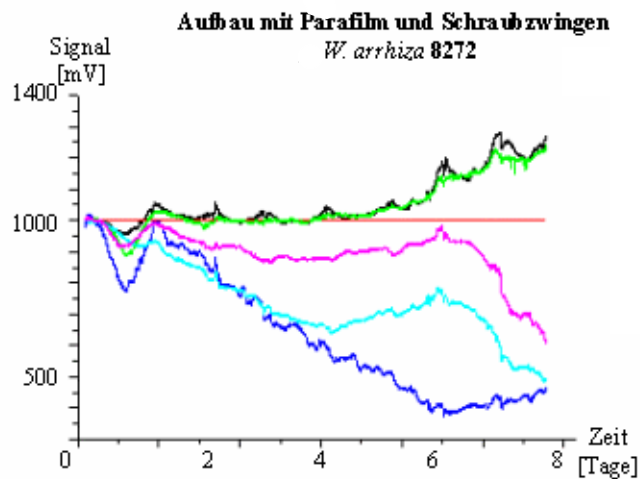
Pflanzen (rote und schwarze Kurve) nahezu parallel zur Kontrollkurve (orange = ohne Pflanzen) bewegten, war bei den drei vergifteten Varianten (blaue, gelbe und grüne Kurve) nach ca. 16 Stunden ein Abfall der Kurven zu beobachten. Nach zwei Tagen glichen sich diese wieder an das Kontrollniveau an (Abbildung 36). Trotz sichtbarem Pflanzenwachstum in den unvergifteten Wells konnte weder die erwartete Zunahme von Sauerstoff, noch eine Stagnation oder Abnahme in den vergifteten Varianten gemessen werden. Die Tatsache, daß sich auch die Werte der optisch toten Pflanzen wieder auf das Kontrollniveau einpendelten, läßt darauf schließen, daß die Versuchsanlage ein regelmäßiges Nachliefern von Sauerstoff zuließ. Aus diesem Grund wird Parafilm als nicht ausreichend angesehen, um die gewünschten Effekte messen zu können.



**Abb. 36) CellScan-Messungen mit vergifteten (70 % (v/v) EtOH) und unvergifteten (SH-Medium) *W. brasiliensis*-Pflanzen über drei Tage in einem Versuchsaufbau mit Parafilm**

Schwarz und rot = SH-Medium, grün und blau = SH-Medium (70 % (v/v) EtOH); hellblau = SH-Medium ohne Pflanzen (Kontrolle = Baseline), pink = SH-Medium (70 % (v/v) EtOH)  
Mit freundlicher Genehmigung von U. Brinkmann (ICB, Münster)

Die mit mehreren Lagen Parafilm und zusätzlichen Schraubzwingen verschlossene 6-Well-Platte mit vergifteter (200 µg/ml Nystatin) und unbehandelter (1/10 Hutner-Medium) *W. arrhiza* 8272 zeigte Meßwerte, die in ihrem Verlauf den Erwartungen entsprachen (Abbildung 37). Nach ca. fünf Tagen parallelem Verlauf zur Kontrolle stieg der Sauerstoffgehalt in den Wells der unbehandelten Pflanzen (schwarze und grüne Kurve) bis zum Ende der Messung nach acht Tagen kontinuierlich an. Diese Messung war konform mit einem deutlichen sichtbarem Pflanzenwachstum. Die Werte der nystatin-vergifteten Pflanzen (blaue, rote und gelbe Kurve) blieben unter den Werten der Kontrolle, wobei am Ende des Versuchs nach einer Woche nur noch ca. 50 % des Sauerstoffpartialdruckes des Ausgangsniveaus gemessen werden konnten (Abbildung 37). In der optischen Beurteilung waren die Pflanzen verbräunt und z. T. auf den Boden abgesunken. Dieser Versuchsaufbau kann somit als luftdichter angesehen werden als die Variante ohne zusätzliche Schraubzwingen.

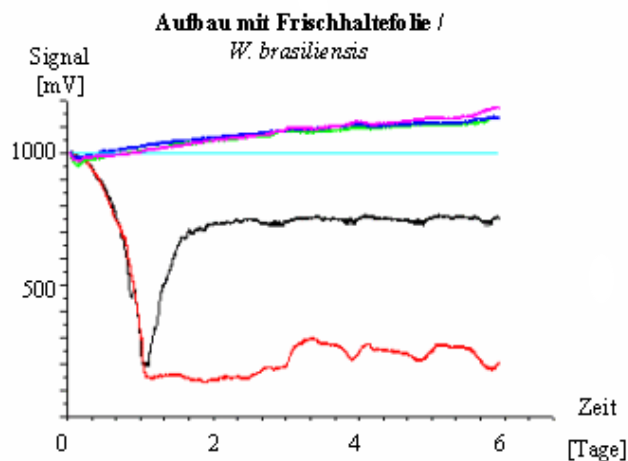


**Abb. 37)** CellScan-Messungen mit vergifteter (200 µg/ml Nystatin) und unvergifteter (1/10 Hutner-Medium) *W. arrhiza* 8272 über acht Tage in einem Versuchsaufbau mit Parafilm und zusätzlichen Schraubzwingen

Schwarz und grün = 1/10 Hutner-Medium; rot = 1/10 Hutner-Medium ohne Pflanzen (Kontrolle = Baseline); blau, hellblau und pink = 1/10 Hutner-Medium + 200 µg/ml Nystatin

Mit freundlicher Genehmigung von U. Brinkmann (ICB, Münster)

Die Messungen der mehrfach in Frischhaltefolie (luftundurchlässiger als Parafilm) eingewickelten 6-Well-Platte mit *W. brasiliensis* zeigten, daß die Meßkurven der unbehandelten Pflanzen (schwarz und rot) nach 16 Stunden um 80 % gefallen sind, während Meßwerte vergifteter Pflanzen (blau, grün und gelb) eine Sauerstoffzunahme anzeigten (Abbildung 38).



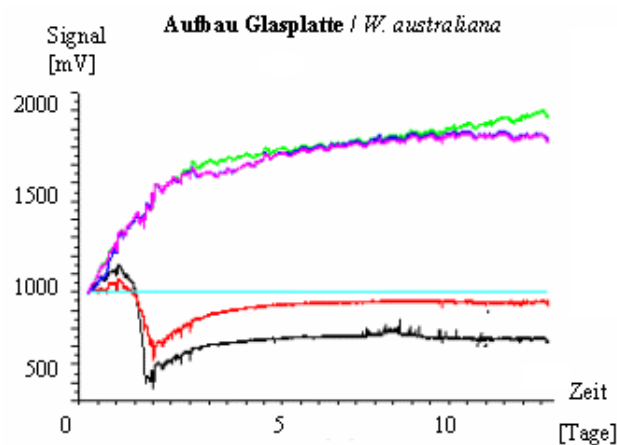
**Abb. 38)** CellScan-Messungen mit vergifteten (70 % (v/v) EtOH) und unvergifteten (SH-Medium) *W. brasiliensis*-Pflanzen über sechs Tage in einem Versuchsaufbau mit Frischhaltefolie

Schwarz und rot = SH-Medium; grün, blau und pink = SH-Medium (70 % (v/v) EtOH); hellblau = SH-Medium ohne Pflanzen (Kontrolle = Baseline)

Mit freundlicher Genehmigung von U. Brinkmann (ICB, Münster)

Da die Abdichtungen der 6-Well-Platte mit Parafilm bzw. Frischhaltefolie nicht den gewünschten Erfolg hatten, wurde Glas als luftundurchlässiges Material zur Abdeckung gewählt.

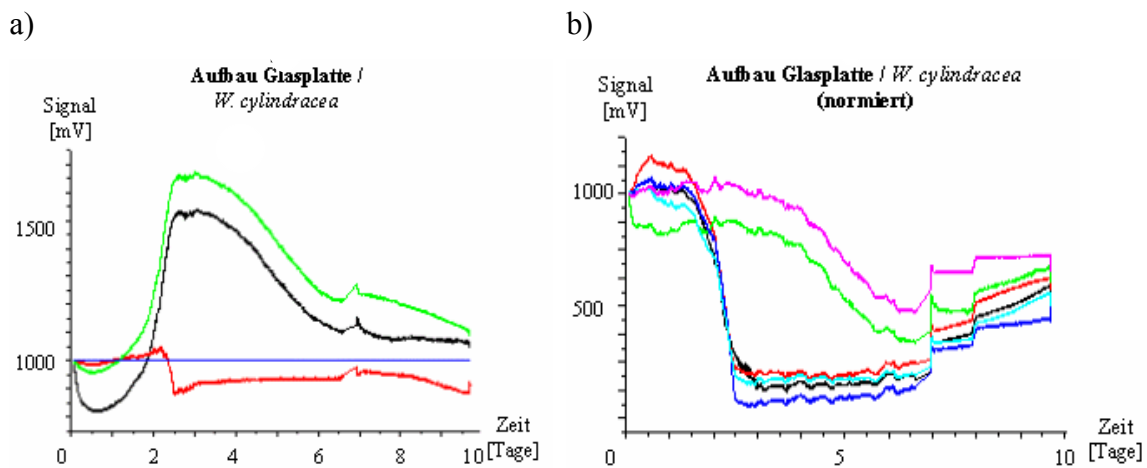
Die nachfolgenden Versuche (Abbildung 39 und 40a und b) wurden mit einer Glasplatte und Spiegelkleber versiegelt, wobei davon auszugehen ist, daß nach Austrocknung des Klebers ein größtmöglicher Luftabschluß realisiert war. In den Wells der vergifteten Pflanzen zeigten die Messungen generell einen Sauerstoffanstieg (grüne, blaue und pinke Kurve), wohingegen bei den unbehandelten Pflanzen (schwarze und rote Kurve) generell ein Sauerstoffverbrauch zu sehen war, bevor die Kurven wieder anstiegen und sich der Kontrolle (hellblaue Kurve) z. T. wieder annäherten. Eine mögliche Erklärung zeigt sich in Abbildung 40b, wobei die Kurven nicht wie sonst auf die Kontrolle normiert sind, sondern die Daten auf einen gemeinsamen Startpunkt bezogen wurden. Das gemeinsame Absinken der Werte um 70 % läßt sich bei der Kontrolle ohne Pflanzen, den unbehandelten Pflanzen und der Penicillin-Applikation beobachten. Da es sich aller Erfahrung und vorhandener Meßdaten nach um vitale Pflanzen handelte, stellt der charakteristische Verlauf dieser Kurven sehr wahrscheinlich Stress-Atmung dar. In den Wells mit letal geschädigten Pflanzen (Ethanol und Rifampicin, Abbildung 40a) zeigt sich ebenfalls ein Sauerstoffverbrauch, der u. U. auf katabole Vorgänge zurückzuführen ist.



**Abb. 39) CellScan-Messungen mit vergifteter (70 % (v/v) EtOH) und unvergifteter (SH-Medium) *W. australiana* über 12 Tage in einem Versuchsaufbau mit Glasplatte und Spiegelkleber**

Schwarz und rot = SH-Medium; grün, blau und pink = SH-Medium (70 % (v/v) ETOH); hellblau = SH-Medium ohne Pflanzen (Kontrolle als Baseline)

Mit freundlicher Genehmigung von U. Brinkmann (ICB, Münster)



**Abb. 40)** CellScan-Messungen mit vergifteter (70 % EtOH, 200 µg/ml Rifampicin) und unvergifteter (CHU-Medium, 200 µg/ml Penicillin) *W. cylindracea* über neun Tage (a), wobei die Messungen nicht auf die Kontrolle normiert sondern auf einen Startpunkt gesetzt worden sind (b)

40a) schwarz = CHU-Medium (70 % (v/v) EtOH; rot = CHU-Medium + 200 µg/ml Rifampicin; grün = CHU-Medium + 200 µg/ml Penicillin, blau = Mittelwert aus den Wells mit Pflanzen auf CHU-Medium

40b) schwarz und rot = CHU-Medium; grün = CHU-Medium (70 % (v/v) ETOH); blau = CHU-Medium + 200 µg/ml Penicillin; hellblau = CHU-Medium mit Pflanzen; pink = CHU-Medium + 200 µg/ml Rifampicin

Mit freundlicher Genehmigung von U. Brinkmann (ICB, Münster)

Abschließend muß festgehalten werden, daß das CellScan-System noch weiterer Optimierungsarbeiten bedarf, um aussagekräftige Messungen an *Wolffia*-Kulturen liefern zu können, deren Werte sich mit der Biomasse korrelieren lassen (Kapitel 4.4).

### 3.8 Fermenterdaten

Verschiedene Biofermenter wurden auf ihre Eignung getestet, *Wolffia*-Pflanzen optimale Bedingungen im Hinblick auf Vermehrung und damit Biomassezuwachs zu gewährleisten. Es wurde zudem der Anspruch erhoben, verschiedenen Parametern wie kontinuierliche Messung eines Vitalitätsparameters, Upscaling und unkompliziertes Handling Rechnung zu tragen.

Die nachfolgenden Ergebnisdaten beziehen sich auf die Systeme Waver, Biobeutel, MiniPerm und Osmotek. Zudem wurde ein eigener *Wolffia*-Fermenter (JACES) evaluiert. Zu den getesteten *Wolffia*-Spezies gehörten *W. australiana*, *W. brasiliensis*, *W. columbiana* und *W. arrhiza* 7193.

#### 3.8.1 Waver

Das Waver-System besteht aus einem Tableau, auf dem ein Polyethylen-Beutel mit den Pflanzen sanft, gewiegt wird. Somit wird eine kontinuierliche Wellenbewegung des Mediums erzeugt (Kapitel 2.14.1).

Der pH-Wert wurde im ersten Ansatz am Tag 7 mit 5,8, am Tag 16 mit 5,5 gemessen. Der pH-Wert des zweiten Versuchs lag nach 2 Wochen mit ebenfalls weißen Pflanzen bei 4,0. Die

*W. australiana*-Pflanzen wurden in den Ansätzen nach kurzer Fermentationszeit weiß. Das Waver-System ist folglich nicht für *W. australiana* geeignet.

### 3.8.2 Biobeutel

Die Beutel aus Biofolie der Firma VivaScience sind atmungsaktiv und sollen den notwendigen Gasaustausch mit der Umgebungsluft gewährleisten. Es handelt sich um ein statisches System, bei dem die Pflanzen keiner Bewegung ausgesetzt sind (Kapitel 2.14.2). Alle Versuche wurden mit *W. australiana* durchgeführt.

Die Photo-Dokumentation (Abbildung 41) zeigte im Juli/August ein deutliches Pflanzenwachstum in einem von zwei kleinen Biobeutel mit ca. 30 ml Volumen. Schon am neunten Tag nach Versuchsbeginn hatten die Pflanzen den Beutel nahezu vollständig gefüllt. Bis zum Versuchsende nach 35 Tagen konnte deshalb nur noch ein vergleichsweise geringer Zuwachs beobachtet werden. Die Pflanzen-Kultur im zweiten Biobeutel, mit geringerer Biomasse inokuliert, zeigte bis zum Tag 35 nur einen sehr geringen Zuwachs.

a) Tag 0



b) Tag 9



c) Tag 35



**Abb 41) Photodokumentarische Reihe des Pflanzenwachstums von *W. australiana* im kleinen Biobeutel mit 30 ml SH-Medium am Tag 0, Tag 9 und Tag 35**

Insgesamt wurden drei Parallelversuche mit dem großen Biobeutel-System (bis 300 ml Volumen) durchgeführt und ausgewertet (Tabelle 26). Die Versuche 1 und 2 wurden im April/Mai über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Versuch 3 und 4 wurden im Mai gestartet und dauerten 300 Tage an. Versuch 5 und 6 begannen im Juni und wurden nach 84 Tagen ausgewertet. Ausgehend von einer Ausgangs-Pflanzenmenge von ca. 0,6 g FM (Nr. 4: 0,5 g) konnte in vier Versuchen ein Netto-Zuwachs von 1,5-1,7 g FM festgestellt werden. Eine deutliche Abweichung stellte diesbezüglich der Versuch Nr. 2, in dem 3,8 g FM Pflanzen-Zuwachs beobachtet wurden, dar. In Versuch Nr. 6 zeigte sich ein Zuwachs von nur 0,7 g FM. Bei der Betrachtung des pH-Wertes aller Versuche außer Nr. 1 konnte ein leichter Abfall ins saure Milieu beobachtet werden. Bei Versuch 1 stagnierte der pH-Wert bei 6,0, was u. U. auf den Einfluß der Pilzkontamination zurückzuführen sein könnte.



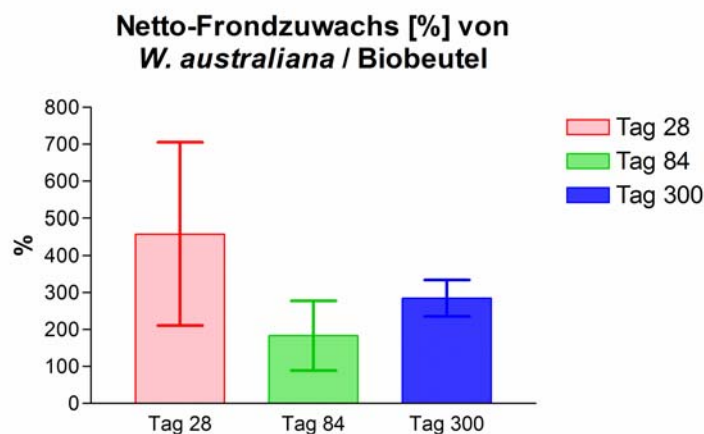
Die Pflanzen in den Biobeuteln sind nach Abschluß der Versuche einer Bonitur (Kapitel 2.8) unterzogen worden. Die Pflanzen aus den Versuchen 1 und 2 konnten hierbei mit „+++“ bewertet werden. Bemerkenswert ist zudem, daß auch die nach 84 bzw. 300 Tagen evaluierten Fronds noch mit „++“ in der Bonitur abschnitten. Festzuhalten ist, daß im Biobeutel-System selbst über einen langen Zeitraum von 300 Tagen durchaus Biomasse produziert wird (im Minimum hier 116 % Nettozuwachs) und zudem zuverlässig erhalten werden kann. Diese Erkenntnis ist wertvoll für die spätere Kultivierung proteinsekretierender Pflanzen, da sich mit zunehmender Kultivierungsdauer die Kosten des Systems reduzieren, wenn die Kultur in einem Steady-State Zustand gehalten werden kann.

**Tab. 26) End-Daten der Fermentationsversuche von *W. australiana* im Biobeutel-System**

0 = keine Kontamination detektierbar

<i>Wolffia</i> -Spezies	Versuch Nr.	Kontamination	Zuwachs netto FM [g]	Zuwachs netto [%]	End-pH	Kultivierungszeit [Tage]
<i>W. australiana</i>	1	Pilz	1,7	283,33	6,0	28
<i>W. australiana</i>	2	0	3,8	633,33	5,3	28
<i>W. australiana</i>	3	0	1,5	250,0	5,2	300
<i>W. australiana</i>	4	0	1,6	320,0	5,0	300
<i>W. australiana</i>	5	0	1,5	250,0	5,2	84
<i>W. australiana</i>	6	0	0,7	116,67	5,2	84

In der folgenden Abbildung 42 ist der Netto-Frondzuwachs in Prozent von *W. australiana* in den verschiedenen Zeiträumen im Biobeutel-System graphisch dargestellt.



**Abb. 42) Netto-Frondzuwachs von *W. australiana* in Prozent nach 28, 84 und 300 Tagen im Biobeutel-System**

Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung



### 3.8.3 MiniPerm

Das MiniPerm-System besteht aus zwei Modulen, welche durch eine semipermeable Membran getrennt sind: dem Versorgungsmodul (VM) für eine längerfristige Versorgung der Organismen mit Mediumkomponenten und dem Produktionsmodul (PM), in welchem die Pflanzen das potentiell sekretierte Produkt anreichern. Dieses System war auf einer Dreh-Vorrichtung (Turner) mit einer angetriebenen Rolle plaziert. Somit wurde der MiniPerm kontinuierlich um seine eigene Achse gedreht (Kapitel 2.14.3).

Wie Vorversuche zeigten, ist das System sehr kontaminationsanfällig (Abbildung 43a) und bedarf höchster Aufmerksamkeit und permanenter Kontrolle. Ein Test-Fermenter lief dennoch 184 Tage ohne erkennbare Kontamination. Hierbei ist zu bemerken, daß zwar kein Pflanzenwachstum mehr zu beobachten war, die Fronds aber über die gesamte Zeit grün erhalten werden konnten („+++“).

Die im April parallel durchgeführten Versuche 1 und 2 erreichten ausgehend von ca. 0,4 g FM in vier Wochen mehr Pflanzenzuwachs (1,8 bzw. 1,7 g) als die Versuche 3 und 4 im Juli (1,5 bzw. 1,6 g), welche drei Monate andauerten. In allen Fällen konnte eine leichte Verschiebung des pH-Wertes ins saure Milieu festgestellt werden. Die Fronds waren auch nach dreimonatiger Kultivierung noch grün und vital. Der Netto-Zuwachs reduzierte sich von ca. 438 % nach 28 Tagen auf ca. 387 % nach 92 Tagen. Letztlich entsprechen diese Daten einem linearen Wachstum der *Wolffia*-Kultur (Kapitel 4.1.3). Es konnte zudem beobachtet werden, daß sich die Pflanzen gern um entstandene Luftbläschen anordneten (Abbildung 43b) und trotz einer gewissen kohäsiven Anziehung zur Produktionsmodul-Wand bevorzugt an der schmalen Oberfläche schwammen, die nach einiger Zeit durch Verdunstung des Mediums entstanden war.

**Tab. 27) End-Daten zu den Fermentationsversuchen von *W. australiana* im MiniPerm-System**

0 = keine Kontamination detektierbar

<i>Wolffia</i> -Spezies	Versuch Nr.	Kontamination	Zuwachs netto FM [g]	Zuwachs netto [%]	End-pH	Kultivierungszeit [Tage]
<i>W. australiana</i>	1	0	1,8	450	5,7	28
<i>W. australiana</i>	2	0	1,7	425	5,7	28
<i>W. australiana</i>	3	0	1,5	375	5,5	92
<i>W. australiana</i>	4	0	1,6	400	5,4	92

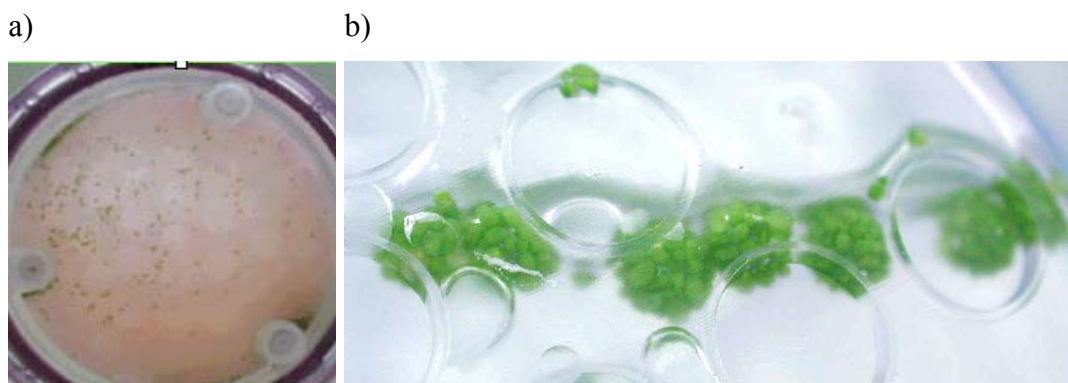


Abb. 43) Hefe-kontaminierter Fermenter (a) und Anordnung der Pflanzen um Luftblasen (b)

### 3.8.4 Osmotek-Fermenter

Der Fermenter der Firma Osmotek ist optimiert für pflanzliche Embryonenkulturen, wobei die kontinuierliche Begasung des Beutels eine Besonderheit darstellt (Kapitel 2.14.4). Getestet wurde *W. australiana* (Ausgangs-Pflanzenmaterial 2,6 g FM) über einen Zeitraum von 35 Tagen und *W. brasiliensis* (Ausgangs-Pflanzenmaterial 3,0 g FM) über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Nach Beendigung des Versuchs nach fünf Wochen konnte für *W. australiana* ein Netto-Pflanzenzuwachs von 1,2 g gemessen werden, der pH-Wert lag bei 4,9. Am Ende der ersten Woche konnte beginnendes Pilzwachstum beobachtet werden, das sich jedoch nicht ausbreitete. Die Pflanzen waren im Habitus kleiner als normal und wurden mit („++“) bewertet. Der Zuwachs bei *W. brasiliensis* betrug 3,0 g, ohne daß zunächst sichtbare Kontaminationen zu beobachten gewesen wären. Der pH-Wert sank in 14 Tagen auf den Wert 4,4. Die Pflanzen waren grün und vital und wurden mit („+++“) bonitiert.

Da letztlich beide Versuchsansätze kontaminierten, ist der Zuwachs unter Berücksichtigung der Konkurrenzsituation um Nährstoffe nicht final aussagekräftig. Ebenso kann durch die Kontamination keine Aussage über den möglichen Einfluß der Jahreszeit gemacht werden, die mit Juli (*W. australiana*) bzw. August (*W. brasiliensis*) eine ungünstigere Wachstumszeit für *Wolffia spec.* darstellt.

Tab. 28) End-Daten zu den Fermentationsversuchen von *W. australiana* und *W. brasiliensis* im Osmotek-System

<i>Wolffia</i> -Spezies	Kontamination	Zuwachs netto FM [g]	Zuwachs netto [%]	End-pH	Kultivierungszeit [Tage]
<i>W. australiana</i>	Pilz	1,2	46,15	4,9	35
<i>W. brasiliensis</i>	Bakterien	3,0	100,00	4,4	14

### 3.8.5 JACES – der Prototyp eines *Wolffia*-Fermenters

Bestehende Fermentationssysteme orientieren sich überwiegend an den Bedürfnissen pro- oder eukaryotischer Zellkulturen. Ein Fermenter für Höhere Pflanzen *in vivo* ist bis dato nicht auf dem Markt verfügbar. Dies führte zu der Planung eines eigenen *Wolffia*-Fermenters, in dem alle nötigen spezifischen Parameter Berücksichtigung finden konnten (Kapitel 1.8 und 2.14.5). JACES ist der erste Prototyp, in dem Daten über die Fermentationstauglichkeit von *Wolffia spec.* erhoben wurden. JACES steht als Akronym für die Namen der Wissenschaftler, die an dessen Planung und Herstellung maßgeblichen Anteil hatten.

a)



b)



c)



d)



Abb. 44) JACES-Fermenter

- a) Schlauch für die Medienzufuhr und Anströmkupplung (je drei Öffnungen auf jeder Seite),  
b) Siebplatte, c) Das JACES-System mit Pumpe, d) in das Deckelement integrierte Anströmkupplung

Vier Spezies (*W. arrhiza* 7193, *W. columbiana*, *W. australiana*, *W. brasiliensis*) wurden z. T. in Parallelansätzen mit unterschiedlichen Pumpen in JACES-Fermentern (JACES 1 und JACES 2) getestet. Der Versuchszeitraum lag bei allen Fermentationen der getesteten Pflanzen zwischen Juli und Oktober (Kapitel 2.14.5). Die Ergebnisse der Fermentations-Versuche sind in Tabelle 29 zusammengefaßt.

*W. brasiliensis* (Nr. 6/Nr. 7) reagierte schon bei geringer mechanischer Beanspruchung von 80 rpm sehr empfindlich auf die Fermentation im JACES-Fermenter. Nach 14-tägiger Kultivierung im August/September bzw. im Oktober war die Kultur kaum (0,5 g FM) bis gar nicht (0,0 g FM) gewachsen; zudem sanken nach dem Abstellen der Pumpe alle Pflanzen zu Boden. Dies ist als Anzeichen einer labilen Kultur zu bewerten, was sich in der Bonitur bestätigte („+“). Der pH-Wert sank in beiden Fällen minimal von 8,2 auf 7,9 bzw. von 6,0 auf 5,9.

Für *W. columbiana* (Nr. 2/Nr. 3) konnte in den parallelen Fermentationsversuchen über einen Zeitraum von 21 Tagen trotz einer hohen Inokulumsmenge von je 6,0 g FM nur ein prozentualer Netto-Zuwachs von 58,33 bzw. 65 % festgestellt werden. Der Frischmassezuwachs betrug 3,5 g (JACES 1) bzw. 3,9 g (JACES 2). Der pH-Wert in JACES 2 lag nach Abschluß des Versuchs trotz identischer Kultivierungsparameter deutlich unter dem pH-Wert von JACES 1 (7,8 zu 9,3). Die Pflanzen konnten am Ende der Versuche mit „++“ bonitiert werden und waren zudem mit Bakterien kontaminiert.

Der Fermentationsversuch von *W. arrhiza* 7193 im JACES-Fermenter wurde von einem Parallelversuch in einem Aquarium begleitet (Nr. 1/Nr. 1a). Hier sollte der Einfluß der Strömung (100 rpm, Watson-Marlow) auf das Wachstum der Pflanzen evaluiert werden (Kapitel 2.14.5). Es stellte sich heraus, daß im strömungslosen Aquarium das Wachstum von *W. arrhiza* 7193 nach einer Woche deutlich besser war (3,1 g FM-Zuwachs) als der Parallelversuch im JACES-Fermenter (2,0 g FM-Zuwachs). Zudem wurde die Fermenter-Kultur von *W. arrhiza* 7193 final mit „++“ bonitiert, wohingegen die Pflanzen aus dem Aquarium eine bessere Fitness aufwiesen („+++“). Dies legt den Schluß nahe, daß die gewählte Anströmung von 100 rpm einen Stress auf die Pflanzen ausübt, der sich in reduziertem Wachstum und verminderter Vitalität niederschlägt. Beide Versuche waren am Ende mit Bakterien kontaminiert.

Für *W. australiana* konnte im JACES 1-Fermenter (Nr. 4) ein Zuwachs von 5,1 g FM verzeichnet werden, wohingegen im Parallelversuch (JACES 2, Nr. 5) nur 2,0 g FM-Zuwachs zu verzeichnen waren. Alle *W. australiana*-Pflanzen waren zum Abschluß des Versuchs grün und vital und konnten mit „+++“ bonitiert werden, wobei beide Versuche frei von Kontaminanten waren. Der pH-Wert war mit 6,1 bzw. 6,2 stabil.

Abschließend kann *W. australiana* mit durchschnittlich Netto-Zuwachs von ca. 209 % über einen Zeitraum von 21 Tagen als stabilste *Wolffia*-Kultur bewertet werden. Sie ist daher für eine Fermentation im JACES-Fermenter bei 60 rpm generell geeignet.

**Tab. 29) End-Daten zu den Fermentationsversuchen von *W. arrhiza* 7193, *W. columbiana*, *W. australiana* und *W. brasiliensis* im JACES-Fermenter**

B = Bakterien; 0 = keine sichtbare Kontamination

<i>Wolffia</i> -Spezies	Versuch Nr.	Kontamination	Zuwachs netto FM [g]	Zuwachs netto [%]	End-pH	Kultivierungszeit [Tage]
<i>W. arrhiza</i> 7193 (JACES 1)	1	B	2,0	80,0	-	7
<i>W. arrhiza</i> 7193 (Aquarium)	1a	B	3,1	124,0	-	7
<i>W. columbiana</i> (JACES 1)	2	B	3,5	58,33	9,3	21
<i>W. columbiana</i> (JACES 2)	3	B	3,9	65,0	7,8	21
<i>W. australiana</i> (JACES 1)	4	0	5,1	300,0	6,1	21
<i>W. australiana</i> (JACES 2)	5	0	2,0	117,65	6,2	21
<i>W. brasiliensis</i> (JACES 1)	6	B	0,5	10,42	7,9	14
<i>W. brasiliensis</i> (JACES 1)	7	B	0	0,0	5,9	14

### 3.8.6 Airlift-Fermenter

Mit den Ergebnissen aus den Versuchen im JACES-Fermenter konnte mit der FH Jülich (Prof. Dr. M. Biselli und Dipl.-Ing. H. Rechmann) ein Kooperationsprojekt begonnen werden. Dieses hatte zum Ziel, das *Wolffia*-Fermentersystem auf Grund der bereits vorliegenden Daten weiter zu optimieren (Rechmann 2004).



**Abb. 45) Optimierter Airlift-Fermenter mit *W. australiana***

Mit freundlicher Genehmigung von M. Biselli und H. Rechmann

### 3.9 Zusammenfassung der Zuwachsdaten

Im Vergleich der Wachstumsraten aus den unbewegten Versuchen in 6-Well-Platten (Kapitel 3.6.1) und den Schalenversuchen (Kapitel 3.6.2) mit den bewegten Fermentationssystemen Waver, MiniPerm, Osmotek und JACES kann festgehalten werden, daß der Zuwachs bezogen auf die Ausgangsmenge in den unbewegten Varianten durchschnittlich ein besserer war, als in jedem der getesteten bewegten Fermentations-Systeme. Dies läßt den Schluß zu, daß selbst geringe Scherkräfte der bewegten Systeme dem kontinuierlichen Zuwachs abträglich sind. Aus den Versuchen in 6-Well-Platten (Kapitel 3.6.1) ging *W. arrhiza* 7193 als Spezies mit dem größten Netto-Zuwachs von 3650 % FM innerhalb von 21 Tagen hervor. Dieser Wert stammt aus dem Versuch 2, der im Vergleich mit dem Januar-Versuch den Eindruck unterstützt, daß die Jahreszeit Frühjahr (hier April/Mai) einen förderlichen Einfluß auf die Wachstumsrate von *Wolffia* spec. hat (Kapitel 3.6.3). Generell scheinen kleinere Volumina (ca. 10 ml, 6-Well-Platten) im Vergleich mit größeren Volumina (ca. 100 ml, Glasschalen) eine bessere Wachstumsrate zu begünstigen (Kapitel 4.1.3 und 4.1.5). Die im folgenden genannten Daten sind die maximalen Zuwächse aus den jeweiligen Versuchen.

In den Glasschalen-Versuchen produzierte *W. cylindracea* einen Zuwachs von 1259 % FM in 15 Tagen. (*W. australiana*, die sich als sehr geeignete Laborpflanze im Vergleich mit den anderen Spezies herausgestellt hat, folgt in geringem Abstand mit 1214 % FM-Zuwachs.) Der ebenfalls unbewegte Biobeutel leistete einen Zuwachs von 633 % *W. australiana*-Pflanzen in 28 Tagen, was

einer FM von 3,8 g entsprach. Das MiniPerm-System erreichte mit *W. australiana* maximal 450 % FM-Zuwachs (1,8 g) bezogen auf einen Zeitraum von ebenfalls 28 Tagen. Der entwickelte *Wolffia*-Fermenter JACES realisiert mit *W. australiana* dagegen nur einen Zuwachs von 300 % in 21 Tagen, was in diesem Versuch einem Netto-Zuwachs von 5,1 g FM von bedeutete. Der begaste Osmotek-Fermenter kann als Kultivierungssystem für *Wolffia* ausgeschlossen werden, da zu große Scherkräfte und mangelnde Sterilität des Systems den Ansprüchen nicht genügen. Das Waver-System scheidet aufgrund der offensichtlichen Unverträglichkeit des Kunststoffes aus. Zudem kommen in den beiden letztgenannten Systemen durch aufwendige (und für die angestrebte Fermentation z. T. nicht notwendige) Zusatz-Tools wie mehrere Anschlüsse, Sterilfilter und Einwegmaterial höhere Betriebskosten zum Tragen.

Wachstumsdaten von *W. australiana* im Airlift-Fermenter sind Gegenstand der weiteren Forschungsarbeit.

### 3.10 Transformation durch Agrobakterien

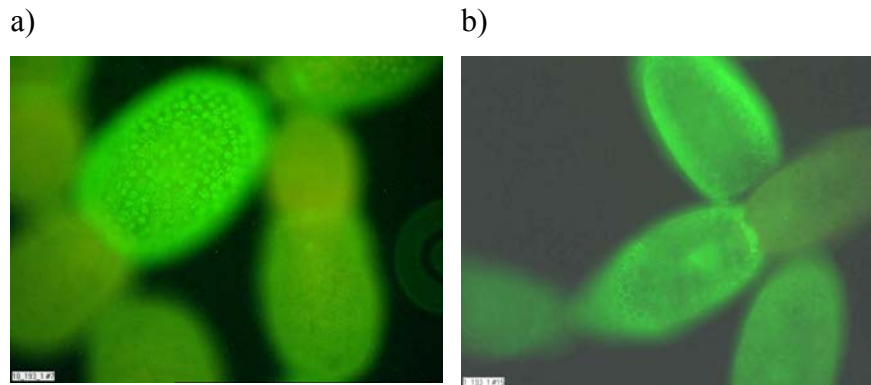
Mit Hilfe der Agrobakterien sollten im Idealfall die meristematischen Zonen der Pflanzen infiziert und so transformiert werden. Der Vorteil bei erfolgreicher Transformation der Meristeme liegt in der dann sehr wahrscheinlichen stabilen Vererbung des eingebrachten Gens, da alle nachfolgenden Tochterfronds mit dem Erbmaterial dieses Meristems ausgestattet sind.

Im Hinblick auf die Vitalität der Fronds konnte in allen durchgeführten Experimenten kein bonitierbarer Unterscheid zwischen Pflanzen festgestellt werden, die mit dem Agrobakterien-Wildtyp oder mit dem Agrobakterien mit binärem Plasmid behandelt wurden. Der Einsatz von 0,002 % Silwet als Detergenz hatte sowohl keinen erkennbaren Einfluß auf die Vitalität als auch auf die Transformationseffizienz von *Wolffia*-Pflanzen. Es wurden keine statistischen Auswertungen der Transformationsversuche unternommen, da in diesen Experimenten ausschließlich die generelle Tauglichkeit verschiedener Transformations-Varianten, vor allem im Hinblick auf die Vitalität der Pflanzen, untersucht werden sollte. Korundverletzte Pflanzen sind, da durchgehend letal geschädigt, keiner weiteren Auswertung unterzogen worden.

#### 3.10.1 Transformation durch Co-Kultivierung mit Agrobakterien

Eine Co-Kultivierung mit Agrobakterien führte weder bei sanftem Schütteln noch ohne Bewegung zu unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbaren, GFP-transformierten *Wolffia*-Pflanzen. Die aus der gleichen Behandlung stammenden Tabakblätter konnten ebenfalls nicht als transgen bestätigt werden. Für *W. arrhiza* 7193, *W. arrhiza* 8272, *W. australiana*, *W. brasiliensis*, *W. columbiana*, *W. cylindracea*, *W. elongata*, *W. globosa*, *W. microscopica* und *W. neglecta* konnte nach der Co-Kultivierung mit den GFP-transgenen Agrobakterienstämmen GV3101 pMP90 und LBA4404 (nur

*W. arrhiza* 7193 und *W. arrhiza* 8272) mit den beschriebenen Parametern kein erkennbarer Unterschied zwischen potentiellen GFP- und Kontrollpflanzen festgestellt werden (Abbildung 46).



**Abb. 46) Potentiell GFP-transformierte *W. australiana* (a) und unbehandelte Kontrollpflanzen (b)**

Alle behandelten Pflanzen wurden sechs bis acht Wochen nach der Co-Kultivierung mit „+++“ gegenüber der unbehandelten Kontrolle bonitiert. Eine Co-Kultivierung mit den verwendeten Agrobakterienstämmen und ein nachfolgendes Cefotaxim-Regime hatten folglich keinen negativen Effekt auf die Vitalität von unverletzten *Wolffia*-Pflanzen.

Die analogen Transformationsversuche mit dem GUS-Reportersystem resultierten in den gleichen Ergebnissen. Es konnte zu keiner Zeit eine spezifische Blaufärbung beobachtet werden.

Keine der mit Korund verletzten *Wolffia*-Pflanzen überlebte die nachfolgende Kultivierung. Schon nach wenigen Tagen konnten auch bei den Kontrollpflanzen, die keinen Agrobakterien ausgesetzt waren, nur noch tote und verbräunte Fronds bonitiert werden, wobei *W. arrhiza* 8272 von allen Spezies am längsten überlebte (acht Tage). Die durch Beschuß mit der Particle Gun verletzten Fronds von *W. arrhiza* 8272, *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. cylindracea* waren bis zu vier Wochen vital und konnten mit „+++“ bonitiert werden. Alle anderen verwendeten *Wolffia*-Spezies überlebten eine nachhaltige Kultivierung nicht länger als zwei bis drei Wochen. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte aufgrund einer sehr hohen nativen Hintergrundfluoreszenz der *Wolffia*-Pflanzen keine Aussage über mögliche Transgenität gemacht werden (Abbildung 45a und b). Nach der X-Gluc-Färbung von Pflanzen, die mit *gus*-transgenen Agrobakterien behandelt waren, konnten Fronds von *W. arrhiza* 8272, *W. australiana* und *W. brasiliensis* beobachtet werden, die punktuell eine Blaufärbung aufwiesen.

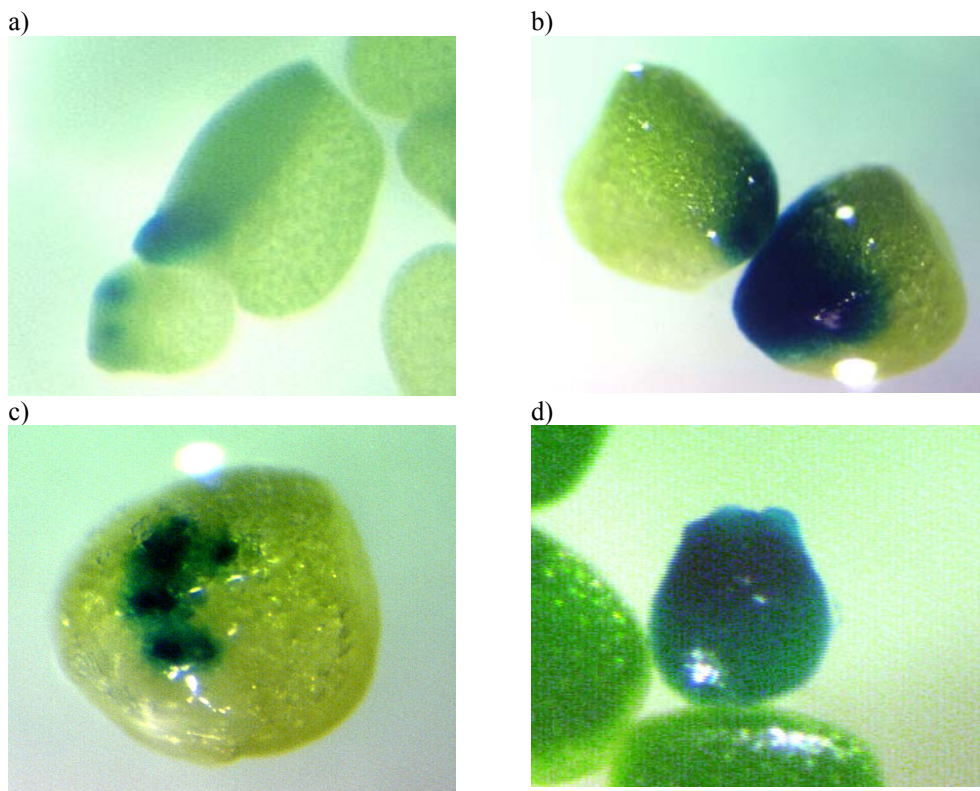
### 3.10.2 Transformation durch Agrobakterien-Infiltration

Unverletzte *Wolffia*-Pflanzen überlebten nachhaltig eine sechswöchige Kultivierung nach Agrobakterien-Infiltration, wobei außer *W. microscopica* („+“) alle anderen untersuchten Spezies mit „+++“ bonitiert werden konnten. Bei durch Particle Bombardment verletzten Pflanzen, die



zudem infiltriert wurden, konnte ein größerer negativer Effekt auf die Vitalität gegenüber der alleinigen Infiltration festgestellt werden. *W. microscopica*, *W. arrhiza* 7193 und *W. globosa* reagierten am sensitivsten und wurden nach einer bzw. zwei Wochen nur noch mit „+“ bonitiert. *W. australiana*, *W. brasiliensis*, *W. columbiana* und *W. cylindracea* hingegen blieben über die gesamte Nachkultivierungszeit grün und vital („+++“). *W. arrhiza* 8272, *W. elongata* und *W. neglecta* variierten in ihren jeweiligen Wiederholungen zwischen den Boniturnoten „-“ und „++“, so daß keine eindeutigen Aussagen über die Vitalität gemacht werden können. Die GFP-Fluoreszenz behandelter Fronds konnte erneut nicht von der Hintergrund-Fluoreszenz der Kontrollcharge unterschieden werden. Gleichzeitig konnte beim gleichbehandelten Tabak ein GFP-Signal nach Infiltration festgestellt werden. Pflanzen aus der Infiltration mit *gus*-transgenen Agrobakterien waren nach X-Gluc-Färbung punktuell blau gefärbt, wobei auch komplett blaue Tochterfronds (*W. australiana*) beobachtet werden konnten (Abbildung 47d).

Korundverletzte Pflanzen mit anschließender Infiltration waren nach wenigen Tagen letal geschädigt und wurden mit der Boniturnote „-“ beurteilt.



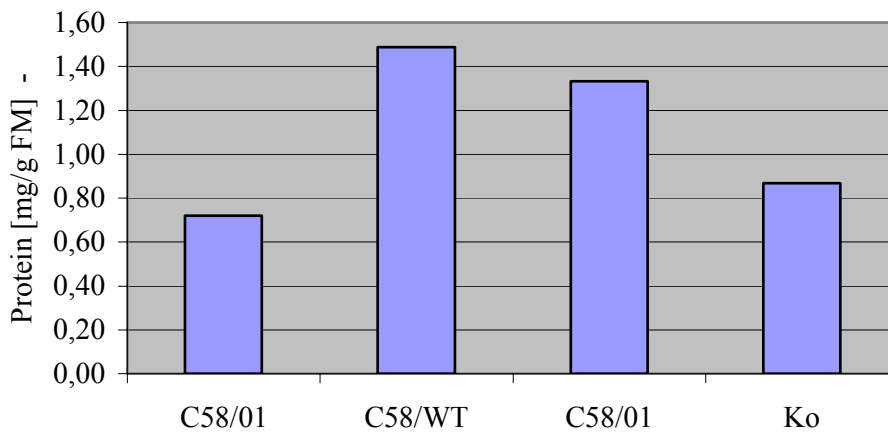
**Abb. 47) Wolffia-Pflanzen nach Transformation durch Agrobakterien**

- a) Lokal gefärbte *W. australiana* nach Infiltration mit Agrobakterien (GV3101 pMP90/pCAMBIA 1301)
- b) Teilweise gefärbte *W. australiana* nach Infiltration mit Agrobakterien (GV3101 pMP90/pCAMBIA 1301)
- c) Lokal gefärbte *W. columbiana* nach Agroinjektion mit *gus*-transgenen Agrobakterien (GV3101 pMP90/pCAMBIA 1301)
- d) Komplette gefärbter Tochterfrond von *W. australiana* nach X-Gluc-Färbung nach Infiltration mit *gus*-transgenen Agrobakterien (GV3101 pMP90/pCAMBIA 1301)

In den später durchgeführten Versuchen mit einer optimierter Infiltrationsmethode sind Bradford- sowie MUG-Daten erhoben worden (Abbildung 48a und b). Des weiteren konnte ein positives PCR-Signal nach reverser Transkription mit isolierter RNA detektiert werden (Abbildung 48c). Sowohl das Signal als auch die Proteindaten stammen aus Pflanzen einer Infiltration mit *A. tumefaciens* C58/pCAMBIA 1301 nach elf Tagen Co-Kultivierung. Mit der Annahme, daß das Zielprotein 3 % des Gesamtproteingehaltes ausmacht, konnten 21 mg/kg FM berechnet werden. Die MUG-Expression war gegenüber der Kontrolle um den Faktor 1700 % erhöht.

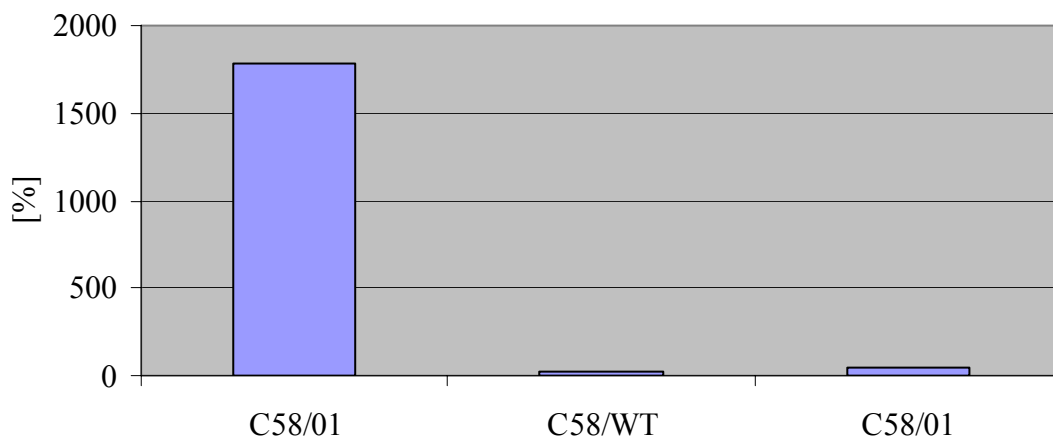
a)

Proteinbestimmung von *W. australiana* -Pflanzen  
nach Bradford  
(Darstellung der jeweiligen Mittelwerte)



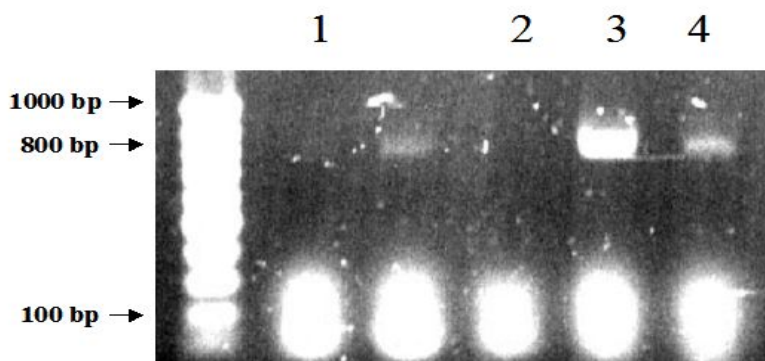
b)

GUS-Expression transgener *W. australiana* -Pflanzen  
(Darstellung der jeweiligen Mittelwerte)



c)

PCR nach Infiltration mit *A. tumefaciens* C58 / pCAMBIA 1301  
(nach 11 Tagen Co-Kultivierung)



1 = PCR Negativ-Kontrolle; 2 = Template RNA-Isolation;  
3 = PCR Positiv-Kontrolle; 4 = Template cDNA

**Abb. 48) Bradford- und MUG-Daten von *W. australiana*-Pflanzen nach Infiltration mit *A. tumefaciens* C58/pCAMBIA 1301 sowie Gelphoto der PCR nach Reverser Transkription**

C58/01 = *A. tumefaciens* C58/pCAMBIA 1301, C58/WT = *A. tumefaciens* C58 Wildtyp,  
Ko = Kontrolle (mit Medium infiltriert)

### 3.10.3 Transformation durch Agrobakterien-Injektion

Für die Agrobakterien-Injektion (Agroinjektion) wurde *A. tumefaciens* GV3101 pMP90/pCAMBIA 1301 verwendet (Kapitel 2.16.5). Das teilweise verwendete Mazerozym sollte zum leichten Andauen der Zellwand dienen, um den Agrobakterien den Zugang in die Pflanzen zu erleichtern.

Unter nicht selektierenden Bedingungen waren von 1423 mit *gus*-transgenen Agrobakterien injizierten Pflanzen nach X-Gluc-Färbung vier *W. australiana*-Fronds vollständig bzw. 36 Pflanzen teilweise blau gefärbt. Keine dieser Pflanzen war einer Mazerozymbehandlung unterzogen worden. Drei von 861 behandelten *W. brasiliensis* färbten sich ohne Mazerozym vollständig blau, wohingegen nur zwei Fronds mit einer teilweisen Färbung beobachtet werden konnten. Dagegen war die Summe der teilweise gefärbten *W. brasiliensis* Fronds mit 21 Pflanzen unter Einsatz von Mazerozym deutlich höher. Sowohl bei *W. columbiana* (1178 injizierte Pflanzen) als auch bei *W. cylindracea* (844 injizierte Pflanzen) konnten unabhängig von der Enzymbeteiligung keine vollständig blauen Pflanzen nach X-Gluc-Färbung detektiert werden. Zwölf *W. columbiana* Fronds reagierten mit punktuellen Farbumschlag, wovon neun keiner Mazerozym-Behandlung ausgesetzt waren (Abbildung 47c). Bei *W. cylindracea* war nur ein einziger Frond aus der Charge ohne vorangegangene Selektion (und ohne Mazerozymeinsatz) punktuell bläulich gefärbt (Tabelle 30).

**Tab. 30) Anteile vollständig oder teilweise gefärbter nicht selektierter Fronds nach X-Gluc-Färbung unter der Berücksichtigung der Behandlung mit bzw. ohne Mazerozym (Maz)**

Spezies	vollständig blaue Pflanzen (ohne Selektion)		teilweise blaue Pflanzen (ohne Selektion)	
	mit Maz	ohne Maz	mit Maz	ohne Maz
<i>W. australiana</i>	4		36	
	0	4	0	36
<i>W. brasiliensis</i>	3		23	
	0	3	21	2
<i>W. columbiana</i>	0		12	
	0	0	3	9
<i>W. cylindracea</i>	0		1	
	0	0	0	1

Nach selektierenden Bedingungen konnte bei keinem *W. columbiana*-Fronde ein Farbumschlag beobachtet werden. Die potentiell transgenen grünen Pflanzen überlebten die Selektion zudem nur stark geschwächt und bedurften einer mehrwöchigen Revitalisierungsphase, bevor erneut mit „+++“ bonitierte Pflanzen vorlagen. *W. cylindracea* litt ebenso sehr stark („+“) unter den selektierenden Bedingungen. Keiner dieser Fronds zeigte einen vollständigen Farbumschlag, wobei sich 71 aus der Selektion stammende Fronds teilweise blau verfärbten. Mazerozym war hierbei weder bei den 71 *W. cylindracea*-Fronds noch bei den 355 (von insgesamt 861 ursprünglich injizierten Pflanzen) *W. brasiliensis*-Fronds im Versuch verwendet worden. Von 577 mit Mazerozym behandelten *W. brasiliensis*-Pflanzen waren zehn Fronds vollständig blau gefärbt. Für *W. australiana* konnten von 1735 injizierten Pflanzen 45 teilweise gefärbte und fünf vollständig blaue Fronds festgestellt werden, die jeweils ohne Mazerozym behandelt worden waren. Mit Enzymeinsatz belief sich die Zahl der punktuell gefärbten Fronds nach Selektion auf zehn (Tabelle 31). *W. australiana* sowie *W. brasiliensis* überstanden den Selektionsdruck gut bis sehr gut („+++“ bis „++++“). Die Boniturnwerte beziehen sich auf die Fronds, die unter Selektionsdruck grün verblieben waren. Um potentiell transgene grüne Pflanzen vor einer negativen Rückkopplung einer sterbenden Kultur zu schützen, erforderte die Selektion ein vergrößertes Volumen gegenüber der Originalkultur. Hierzu wurde das Volumen von 100 ml aus einem 250 ml-Erlenmeyerkolben in drei Kolben zu je 50 ml aufgeteilt.

**Tab. 31) Anteile vollständig oder teilweise gefärbter selektierter Fronds nach X-Gluc-Färbung unter der Berücksichtigung der Behandlung mit und ohne Mazerozym (Maz)**

Spezies	vollständig blaue Pflanzen (nach Selektion)		teilweise blaue Pflanzen (nach Selektion)	
	mit Maz	ohne Maz	mit Maz	ohne Maz
<i>W. australiana</i>	5		55	
	0	5	10	45
<i>W. brasiliensis</i>	10		355	
	10	0	0	355

<i>W. columbiana</i>	0		0	
	0	0	0	0
<i>W. cylindracea</i>	0		71	
	0	0	0	71

Ausgehend von der Gesamtzahl ursprünglich injizierten Pflanzen und unter Berücksichtigung sowohl der selektierten als auch der nicht selektierten Charge konnten 0,9 % vollständig blaue *W. brasiliensis* sowie 0,52 % *W. australiana* detektiert werden (*W. columbiana* und *W. cylindracea* 0 %). In der Betrachtung der punktuell blau gefärbten Fronds waren insgesamt 26,3 % aller *W. brasiliensis*-Pflanzen teilweise transgen. Eine deutlich geringere Transformationsrate lag bei *W. cylindracea* (8,5 %) und *W. australiana* (5,3 %) vor. Für *W. columbiana* konnten abschließend nur 1 % punktuell gefärbte Fronds beobachtet werden. Bei einer differenzierten Betrachtung der Transformationsrate zwischen Pflanzen mit und ohne Selektion ergab sich, daß 77,78 % der vollständig gefärbten *W. brasiliensis*-Fronds aus der Selektionscharge stammten. Mehr als die Hälfte der komplett gefärbten *W. australiana*-Pflanzen (55,77 %) waren zuvor ebenfalls einem Selektionsdruck unterworfen. Diese Ergebnisse sind ausschließlich auf Pflanzen zurückzuführen, bei denen die Injektion der Agrobakterien ohne Zusatz von Mazerozym erfolgte. Teilweise gefärbte *W. brasiliensis* entstammten zu 93,92 % aus der Selektion, deren Pflanzen ebenfalls ohne Mazerozym behandelt worden waren. Analog ergab sich für *W. australiana* ein Prozentsatz von 49,45 %. Von den chimären *W. australiana*-Pflanzen sind insgesamt nur 10,99 % auf eine Enzymbeteiligung nach Selektion nach Injektion ohne Mazerozym zurückzuführen. Ein Prozentsatz von 39,56 % ergab sich aus einer X-Gluc-Färbung ohne Selektion und ohne Mazerozymbeteiligung. Für *W. columbiana* sind keine lokal gefärbten Pflanzen nach einer Selektion beobachtet worden, ohne Selektion jedoch stammten 75 % der chimären Fronds aus dem enzymfreien Ansatz. Für *W. cylindracea* belief sich der Anteil der teilweise blauen Fronds ohne Selektion auf 98,61 % nach Agroinjektion ohne zusätzliches Mazerozym.

Die Betrachtung dieser Ergebnisse macht deutlich, daß der Einsatz von 0,5 % (v/v) Mazerozym während der Agrobakterien-Injektion, ausgehend von insgesamt 5195 injizierten Fronds, zu insgesamt deutlich weniger vollständig oder teilweise transgenen und vitalen *Wolffia*-Pflanzen führt (0,85 %) als ohne Enzymeinfluß (10,22 %). Da jedoch auch solche Pflanzen die Selektion überlebten, die nach X-Gluc-Färbung nur teilweise einen Farbumschlag zeigten, ist davon auszugehen, daß die *Wolffia*-Fronds nicht zwingend vollständig transgen sein müssen, um den Selektionsdruck zu überstehen.

In der alleinigen Betrachtung der erwünschten vollständig transgenen Pflanzen führte der Enzymeinsatz zu einer niedrigeren Transformationsrate (0,19 %) als ohne zusätzliches Enzym (0,23 %). Zudem kann festgehalten werden, daß durch eine Selektion der Anteil teilweise oder vollständig transgener Fronds mit 9,55 % gegenüber der nicht selektierten Charge (1,52 %) deutlich

erhöht war. Werden auch hier nur die erwünschten vollständig transgenen Pflanzen betrachtet, so beläuft sich die Transformationsrate ohne Selektion auf 0,13 % gegenüber 0,28 % nach durchgeführter Selektion.

Bei Weiterführung der Methode der Agroinjektion sollte demnach zukünftig kein Mazerozym verwendet werden. Zudem konnte festgestellt werden, daß eine Selektion die Transformationsrate der getesteten *Wolffia*-Spezies erhöht.

### 3.11 Kallusinduktion von *Wolffia*

Kalluskulturen bieten eine große Chance im Hinblick auf die Transformation da Chimärenentstehung verhindert werden kann. Durch die Proliferation dedifferenzierter Zellen entsteht Kallus, der nach Anwendung einer geeigneten Transformationsmethode (z. B. Particle Bombardment) die Möglichkeit beinhaltet, erneut ganze, 100 % transgene Pflanzen zu regenerieren. Für die Kallusinduktion wurden verschiedene Phytohormon-Regime evaluiert.

Die Kultivierung von unverletzten *W. brasiliensis* im 12-Stunden-Licht-/Dunkelrhythmus auf einem Medium mit 2 % (w/v) Saccharose resultierte unabhängig vom Phytohormon-Regime in weißen Pflanzen (Abbildung 49e bis h). Kontrollpflanzen auf saccharosehaltigem SH-Medium ohne Phytohormone konnten ebenfalls nur noch tot vorgefunden werden. Die Medien-Variante mit 10  $\mu\text{M}$  NAA + 1  $\mu\text{M}$  BAP + 2 % (w/v) Saccharose hatte nach neun Wochen nur abgestorbene Fronds zur Folge (Abbildung 49d). Mit der Medien-Variante 10  $\mu\text{M}$  2,4-D + 1  $\mu\text{M}$  BAP (ohne Saccharosezusatz) konnten Fronds beobachtet werden, die auf den weißen, toten Pflanzen wuchsen und keinen Kontakt mehr zum Medium hatten. Diese Fronds waren stark aufgehellert, jedoch nicht vitrifiziert. Die Kombinationen 10  $\mu\text{M}$  2,4-D und 10  $\mu\text{M}$  NAA jeweils plus 1  $\mu\text{M}$  Kinetin und ohne Saccharosezusatz resultierten nach neunwöchiger Kultivierungszeit in grünen und vitalen Fronds (Abbildung 49a und b). Zusammenfassend scheint das Phytohormon BAP in der gewählten Konzentration einen negativen Einfluß auf die Vitalität von *W. brasiliensis* zu haben. Zudem reagierten die Pflanzen letal auf die Zugabe von 2 % (w/v) Saccharose. Sowohl unter den toten als auch unter den vitalen Pflanzen konnten zu keiner Zeit kallöse Strukturen beobachtet werden.

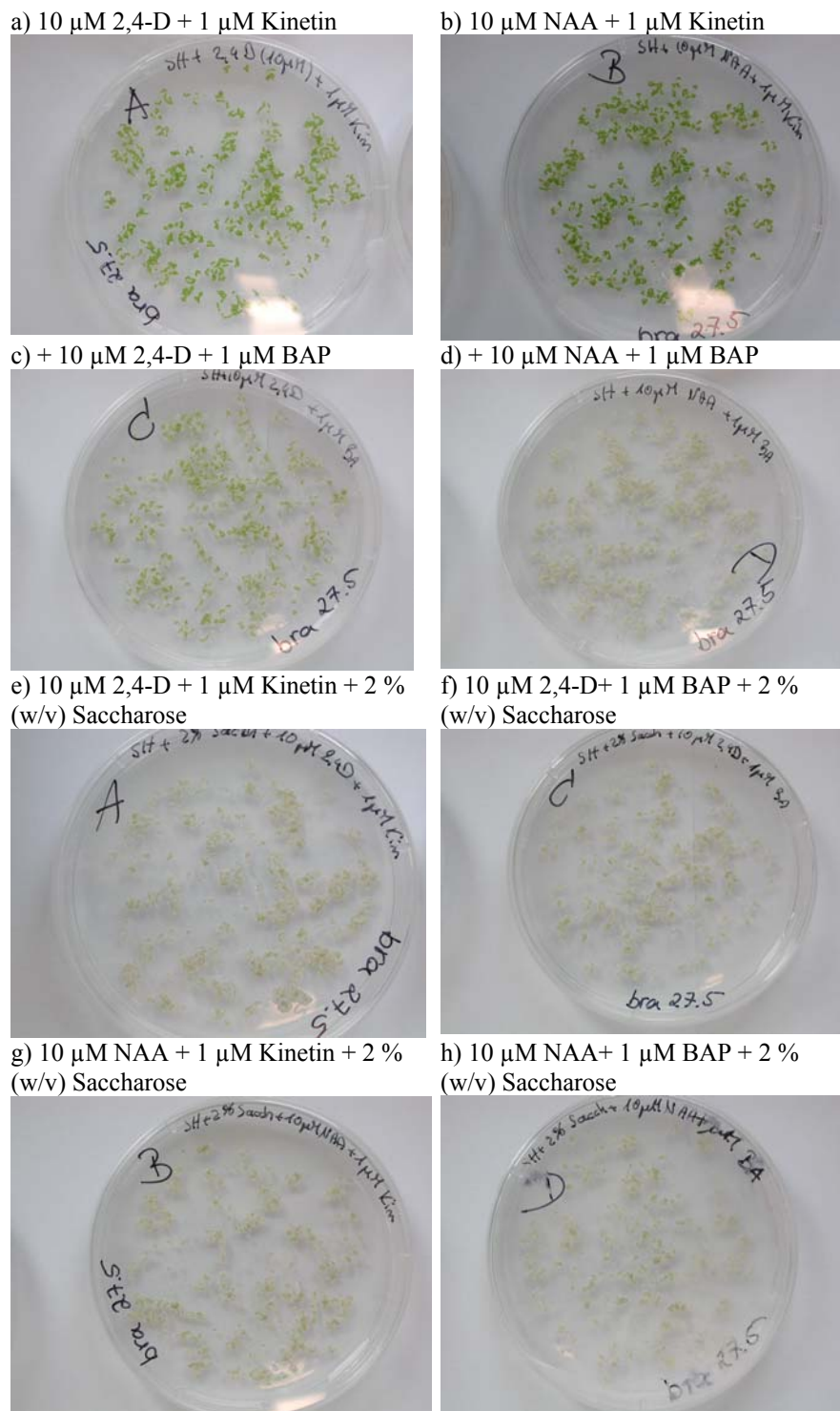


Abb. 49) *W. brasiliensis* auf dem Grundmedium SH mit verschiedenen Phytohormonregimen nach neun Wochen Kultivierungszeit

Die Kontrollpflanzen von *W. australiana*, die von einem zweiprozentigen Saccharoseregime nach sechs Wochen auf 1 % (w/v) Saccharose umgesetzt wurden, waren nach insgesamt neunwöchiger Kultivierungszeit größtenteils (ca. 90 %) grün und vital. Die verletzte Charge unterschied sich dabei kaum von den unverletzten Pflanzen. Vitrifizierungseffekte konnten vereinzelt bis massiv auf allen Platten, mit allen Phytohormon-Varianten und auch auf den Kontrollplatten beobachtet werden. Alle Fronds aus den Regimen, in denen 10  $\mu\text{M}$  NAA im SH-Grundmedium vertreten war, waren

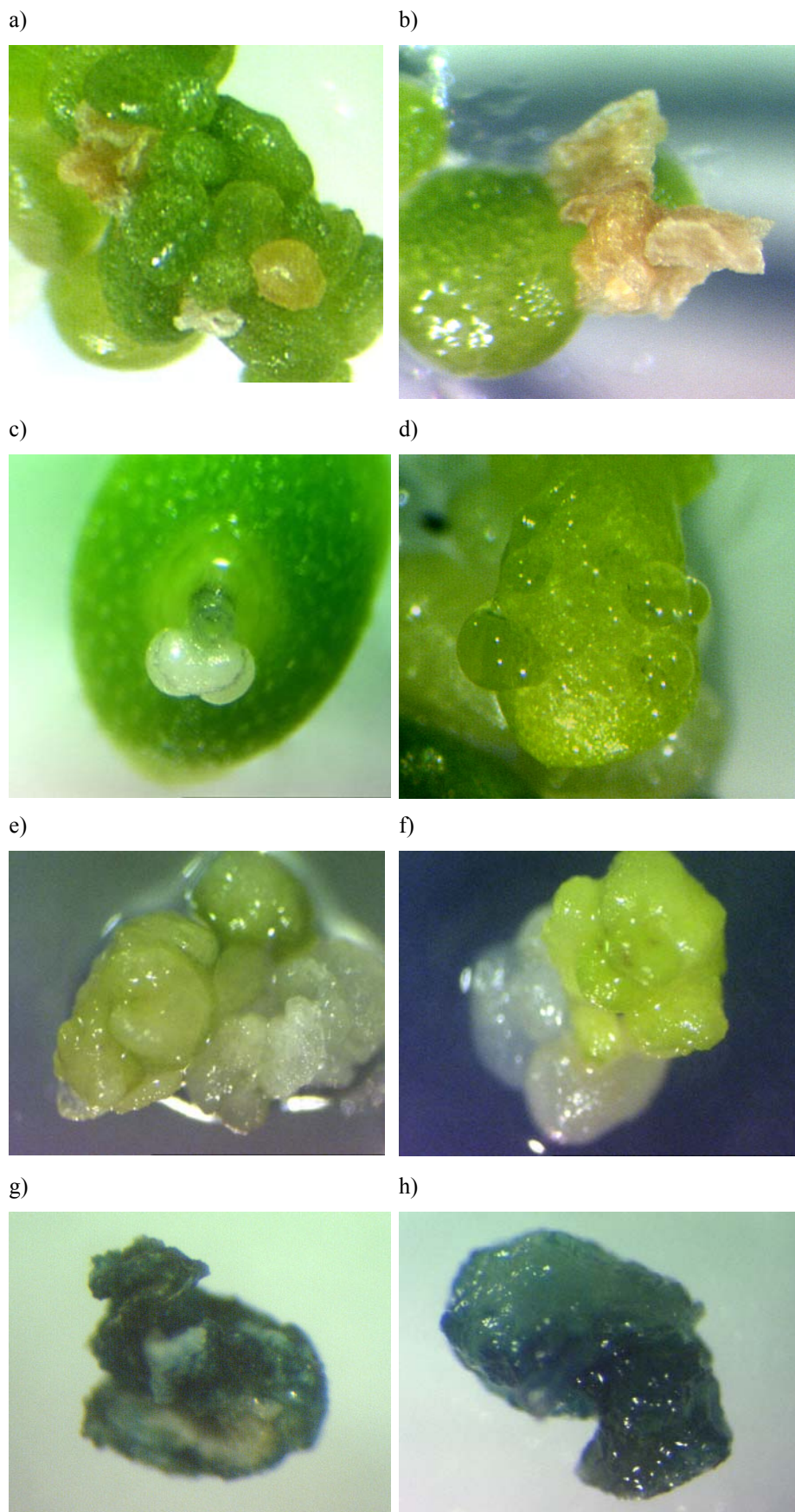


nach sechs Wochen Kultivierung aufgeheilt, sehr stark vitrifiziert und erschienen abnorm aufgedunsen. Da keine kallösen Strukturen zu beobachten waren, sind Pflanzen aus NAA-Chargen nicht auf Erhaltungsmedium umgesetzt worden. Eine einmalige Ausnahme stellte die Variante 10  $\mu\text{M}$  NAA + 1  $\mu\text{M}$  BAP in SH-Medium dar, in der beigefarbene Wucherungen zu beobachten waren, die im Laufe der Kultivierung vertrockneten. Viele *W. australiana*-Fronde wiesen nach sechs Wochen auf Kallusinduktionsmedium mit 2,4-D differenzierte, z. T. beigefarbene Strukturen (Abbildung 50a und b) bei kontinuierlicher Pflanzenvermehrung auf. Unverletzte Fronde aus dem Regime mit 10  $\mu\text{M}$  2,4-D + 1  $\mu\text{M}$  BAP zeigten nach dem Umsetzen auf das entsprechende Kalluserhaltungsmedium fortschreitende Vitrifizierung (Abbildung 50d). Auch in dieser Variante konnte kein wesentlicher Unterschied zu der verletzten Charge festgestellt werden. Das Phytohormonregime 10  $\mu\text{M}$  2,4-D + 1  $\mu\text{M}$  Kinetin sowohl mit als auch ohne Saccharose zog nach dem Umsetzen auf das entsprechende Erhaltungsmedium eine fortschreitende Verbräunung nach sich. Zusammenfassend konnte für *W. australiana* unter den beschriebenen Phytohormonregimen kein Kallus generiert werden, der dauerhaft proliferierte. Die beobachteten kallösen Strukturen könnten jedoch den Beginn eines proliferierenden Kallus darstellen (Abbildung 50c und d), für den die Erhaltungsbedingungen optimiert werden müssen.

*W. australiana* reagiert im Gegensatz zu *W. brasiliensis* mit erhöhtem Wachstum auf einen zweiprozentigen Saccharosezusatz. Zudem konnte, bezogen auf die Generierung kallöser Strukturen, kein Unterschied zwischen verletzten und unverletzten Pflanzen festgestellt werden. Verletzte Fronde erscheinen jedoch, wenn auch nicht wesentlich, etwas weniger vital und neigen zu schnellerer Verbräunung als unverletzte Pflanzen.

Das später getestete Shoot-Induction-Medium (SHI) führte bei *W. australiana*-Pflanzen zu überdurchschnittlich vielen kallösen Strukturen (Abbildung 50e und f). Einmalig konnte sogar eine Blütenentwicklung beobachtet werden (Abbildung 50c). Kallöse Strukturen, die Agrobakterien ausgesetzt waren, färbten sich trotz Ethanol-Entfärbung nahezu komplett blau (Abbildung 50g und h).





**Abb. 50)** Dedifferenzierte Strukturen von *W. australiana* nach verschiedenen Phytohormonregimen (a-f) und nach Co-Kultivierung mit Agrobakterien mit X-Gluc gefärbte kallöse Strukturen nach Entfärbung mit EtOH (g und h)

Ein zweiter Versuchsansatz, der neben SH zusätzlich DM und MS als Grundmedium für das Phytohormon-Regime beinhaltete, wurde sowohl im Licht-/Dunkelrhythmus (LDR) als auch ausschließlich in Dunkelheit durchgeführt. Bei der Variante MS/10  $\mu\text{M}$  NAA + 1  $\mu\text{M}$  Kinetin konnten bei *W. brasiliensis* nach acht Wochen sowohl im Dunkelversuch als auch im LDR aufgehellte, nicht vitrifizierte Dreiecks-Strukturen beobachtet werden. Äquivalente Beobachtungen konnten im Regime SH/10  $\mu\text{M}$  NAA + 1  $\mu\text{M}$  Kinetin festgehalten werden. Alle anderen Phytohormon-Regime ließen keine abnormen Strukturen erkennen. Die Fronds verblieben jedoch über den gesamten Kultivierungszeitraum zum größten Teil grün. Pflanzen aus den Varianten mit DM-Grundmedium zeigten keine Vitrifizierung.

## 4. Diskussion

*Wolffia*-Pflanzen sollen für die Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine herangezogen werden, da in ihnen als pflanzliches Expressionssystem große Chancen für die Humantherapie gesehen werden (Kapitel 1.3). Im Gegensatz zu den etablierten Pflanzen-Systemen wie *N. tabacum* und *A. thaliana* sind Daten über *Wolffia spec.* diesbezüglich bisher nicht verfügbar.

Ziel dieser Arbeit war deshalb u. a. die Evaluierung verschiedener Parameter wie Medium, Wachstum, Vitalität und Sterilität für *Wolffia spec.*. Die zu treffende Auswahl geeigneter Spezies konzentrierte sich im Vorfeld besonders auf die höchsten Zuwachsraten und den Proteingehalt. Die Erfahrung mit den Pflanzen hat jedoch gezeigt, daß diese Auswahl-Kriterien gegenüber der generellen Eignung der Spezies als Laborkultur zurücktreten müssen. Einer unter Laborbedingungen vitalen und konstant wachsenden Spezies ist demnach der Vorzug gegenüber vergleichsweise „besseren“ Spezies bezogen auf Wachstum und Proteingehalt zu geben.

### 4.1. *Wolffia* als definierte Kultur

Um die Entwicklung einer stabilen Laborkultur sicherzustellen, ist das Wissen um das spezifische Ökosystem und das Verhalten der Wasserlinsen essentiell. So können möglicherweise Nähr- und Wachstumskomponenten kompensiert bzw. besser berücksichtigt werden, die im natürlichen Lebensraum, jedoch nicht mehr unter definierten Laborbedingungen vorkommen. Beispielhaft ist hierbei der Verlust der natürlichen Begleitflora bzw. -fauna, die durch den quantitativen Zusatz von Nährelementen ausgeglichen werden könnte. Ein besonderer Aspekt stellt sich zudem in Form der jahreszeitlichen Rhythmik dar, die die *Wolffia*-Pflanzen auch nach z. T. Jahrzehnten unter minimalen Versorgungsbedingungen (Hungermedium) konserviert zu haben scheinen.

#### 4.1.1 *Wolffia* im Ökosystem

Grundsätzliche Unterschiede zwischen den Familienmitgliedern der *Lemnaceae* dokumentieren Meister und Liebert (2000), die von einer sehr hohen Diversität innerhalb der gesamten Lemnaceen-Familie ausgehen. Es wurden z. B. deutliche Unterschiede in pH- und Temperaturempfindlichkeit beobachtet. Die Autoren erweitern diese Aussage mit den Untersuchungen zu spezifischen Elementarzusammensetzungen von Wasserlinsen, die auf den Einfluß von unterschiedlichen Uferextrakten von Talsperren zurückzuführen sind. Lemnaceen sind demnach in der Lage, ökologische Nischen in Gewässern mit spezifischer Nährstoffzusammensetzung zu besetzen. Da innerhalb der Gattung *Wolffia* von einer geringen genetischen Identität gesprochen wird (Landolt 1994), scheint die hohe Diversität der zwölf getesteten *Wolffia*-Spezies bzw. Klonen nicht überraschend.

Dies bezieht sich im Rahmen dieser Arbeit auf die verschiedenen Medien- bzw. Nährstoffansprüche, jedoch vor allem auf die Empfindlichkeit gegenüber Streßfaktoren, die im Besonderen bei der Sterilisation von Bedeutung sind.

#### 4.1.2 Wechselbeziehungen zwischen biotischen und abiotischen Faktoren

In ihrer natürlichen Umgebung sind *Wolffia*-Pflanzen neben abiotischen Faktoren einer vielfältigen makro- und mikrobiellen Flora ausgesetzt (Landolt 1986), an deren flexibler Adaptation das Überleben der Population abhängt. Eine außergewöhnlich gute Verteidigung gegen pathogene Organismen ist bei diesen Anpassungsprozessen vorteilhaft. Neben der Verteidigung gegen Schaderreger ist es ebenso denkbar, daß im Laufe der Evolution eine Assoziation (Landolt 1999) bzw. symbiotische Beziehung, z. B. mit stickstofffixierenden Bakterien, entstanden ist (Duong und Tiedje 1985, Landolt 1999).

Die Komplexität aquatischer Systeme im Hinblick auf offensichtlich wechselwirkende Zusammenhänge wird durch das folgende Beispiel unterstützt: Landolt (1999) identifizierte „Leitspezies“ (die jeweils anteilig den größten Vertreter des Gewässers darstellt) und konzentrierte die Beobachtungen dahingehend, ob typische „Partner“ auszumachen wären. Ein solcher, mit Wasserlinsen vergesellschafteter Partner, konnte in allen untersuchten Gewässern (Südamerika) durch das Lebermoos *Ricciocarpus natans* repräsentiert werden. Weitere Assoziationen von einer Leitspezies aus der Familie der *Lemnaceae* mit einem spezifischen Partner sind darüber hinaus im Detail dokumentiert (Landolt 1999). Dagegen vertritt Wolek (1997) die Ansicht, daß die Besiedlung von Wasserflächen mit Wasserlinsen und Begleitorganismen ausschließlich auf abiotische Faktoren und unvorhersehbare Randeffekte zurückzuführen ist. Elankovich und Wooten (1989) beschreiben dagegen das allelopathische Potential von 16 aquatischen Pflanzen untereinander und fanden, daß Wasserlilien einen inhibitorischen Effekt auf die Vermehrung von Wasserlinsen haben.

Ungeachtet der verschiedenen Argumente bezüglich biotischer und abiotischer Wechselwirkungen kann festgehalten werden, daß innerhalb der Gattung *Wolffia* die Populationen mit individuellem Charakter zu betrachten sind und deshalb nur wenige generelle Aussagen die ganze Gattung betreffend möglich sind. Es ist daher sinnvoll und notwendig, experimentelle Ergebnisse aus den Laborversuchen, beispielsweise zu den verschiedenen Nährstoff-Zusammensetzungen der evaluierten Medien, nur auf den getesteten Klon aus der Landolt'schen Sammlung zu beziehen, ohne Allgemeinaussagen zu postulieren.

Es ist schwierig, den exakten Nährstoffbedarf für ein optimales Wachstum der Pflanzen zu ermitteln, denn die diesbezügliche Literatur enthält Angaben mit extrem hoher Spannweite. Der herangezogenen Quelle (Landolt 1986) ist nicht zu entnehmen, ob es sich bei den Angaben um Gesamtbestimmungen des jeweiligen Nährelementes handelt (z. B. Gesamt-Stickstoff) oder ob sich

die Werte auf die pflanzenverfügbaren Ionen beziehen (z. B.  $\text{NO}_3^-$ ). So wurden an verschiedenen Standorten Magnesium-Konzentrationen von 2,1 und 850 mg/l festgestellt. Die gemessenen Kalium-Konzentrationen differierten zwischen 0,5 und 100 mg/l und die Chlorid-Konzentrationen variierten sogar zwischen 0,1 und 4650 mg/l (Landolt 1986). Weniger große Schwankungen konnten in Naturseen bei Natrium (600 bis 1400 mg/l), Schwefel (0 bis 5 mg/l) und Eisen (0,01 bis 0,68 mg/l) gemessen werden, wobei anzumerken ist, daß bei einer Laborkultur mit einem Eisen-Gehalt von ca. 1 mg/l von einem sehr guten Wachstum ausgegangen werden kann (Landolt 1986). Weitere Nährelemente wurden in den von Landolt untersuchten Gewässern in sehr geringen Konzentrationen gemessen: Mangan (ca. 0,01 mg/l), Zink (ca. 1 mg/l) und Bor (0,05 mg/l). Molybdän, Kupfer und Nickel konnten nicht detektiert werden. Das anorganische Carbonat  $\text{HCO}_3^-$  scheint für submers lebende Pflanzen essentiell zu sein. Zudem wird der Bicarbonat-Gehalt bei submerser Lebensweise als außergewöhnlich hoch beschrieben ( $> 100$  mg/l, Landolt 1986).

Der Phosphat-Gehalt gilt als entscheidender Faktor für optimale Wachstumsbedingungen und variiert an verschiedenen Standorten zwischen 0,014 und 3 mg/l (Landolt und Kandelar 1987). Bemerkenswert ist, daß Wasserlinsen einen Phosphatgehalt von bis zu 10 mg/l tolerieren (Appenroth 1993). Wasserlinsen sind in der Lage, einem Gewässer innerhalb von zehn Tagen über 80 % des Gesamtstickstoffs und fast 70 % des Gesamtphosphats zu entziehen (Appenroth 1993); dieser Erkenntnis wurde im regelmäßigen Mediumwechsel der *Wolffia*-Kulturen Rechnung getragen.

Beim Hauptnährstoff Stickstoff wurden in den Gewässern relativ geringe Konzentrationen von  $< 0,04$  mg/l gemessen (Landolt 1986) und die Schlußfolgerung gezogen, daß Wasserlinsen ein Nitrataufnahmesystem mit hoher Affinität besitzen, welches die Stickstoffversorgung auch im mikromolaren Bereich sichern kann (Appenroth 1993). Interessanterweise liefert die Literatur auch Vermutungen über eine mögliche symbiotische Beziehung der Lemnaceen mit dem stickstofffixierenden Bakterium *Anabaena* (Landolt 1986). Die getesteten gängigen Grundmedien aus der Zell- und Gewebekultur stellen in Bezug auf die notwendigen Nährstoffe zusammenfassend noch kein Optimum für *Wolffia* als Laborkultur dar.

Weiterführende Untersuchungen zu Wachstumsförderern sollten bei den weiteren Arbeiten mit *Wolffia* Berücksichtigung finden. Neben den getesteten Supplementen Saccharose, Kinetin und Kokosnußwasser könnten andere Zucker und Cytokinin-Phytohormone vielversprechend sein. Auch erscheint es sinnvoll, eine geeignete Ammonium-/Nitratkombination zu ermitteln und die dadurch beschriebene Proteingehalterhöhung auf bis zu 45 % (Appenroth und Augsten 1986) zu forcieren. Neuere Forschungsergebnisse zeigen eine Steigerung der Glutaminproduktion von 0 auf 0,1 mM nach zwölf Tagen in einer *W. australiana*-Kultur (Rechmann 2004), was als indirekter, meßbarer Photosynthesenachweis durch die Glutamat-Synthetasereaktion betrachtet werden kann. Die

Kaliumnitrat-Konzentration des SH-Mediums (2,5 g/l) kann als optimal betrachtet werden (Kapitel 4.1.5). Ammoniumdihydrogenphosphat hat bis zu einer fünffachen Konzentration (1500 mg/l) gegenüber der ursprünglichen Konzentration des SH-Mediums (300 mg/l) keine negativen Effekte auf eine wachsende *W. australiana*-Kultur (Rechmann 2004). Um die optimale Nährstoffzusammensetzung für ein *Wolffia*-Medium zu ermitteln, sind Studien der pflanzenverfügbaren Ionen wie  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  und das für Wasserpflanzen sehr wichtige  $\text{Fe}^{2+}$  notwendig. Neben den Grundnährstoffen ist der Faktor der Lichtintensität nicht zu vernachlässigen, der ebenfalls noch einen optimierbaren Parameter (ca. 3000-8000 lux) darstellen könnte.

Alle genannten Parameter haben einen Einfluß auf das Wachstumsverhalten von Lemnaceen (Landolt 1986, Landolt und Kandelar 1987, Meister und Liebert 2000). Kulturen unter Laborbedingungen sind jedoch im speziellen nicht mit Populationen im offenen Ökosystem vergleichbar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, daß wechselwirkende Faktoren auch in den Laborkulturen zu diskutieren bleiben.

Die steigende Sensitivität der Laborkulturen hinsichtlich externer Umweltfaktoren bei zunehmender Sterilität läßt zumindest auf eine Assoziation mit Mikroorganismen, wie Landolt (1999) sie diskutiert, schließen. Eine obligate Symbiose ist unwahrscheinlich, da es sich um eine photoautotrophe Pflanze handelt, die in der Lage sein sollte, den Verlust möglicher Begleitflora über das Nährstoffangebot kompensieren zu können. Interessant für eine schonendere Sterilisation wäre an dieser Stelle eine Ammenkultur, die sterile Pflanzen durch eine semipermeable Membran gegen eine unsterile Kultur abschirmt, der jedoch die offensichtlich fördernden Stoffwechselprodukte der Kontaminanten zur Verfügung stehen. Dies könnte die Vitalität der sensitiven sterilen Pflanzen effektiv absichern. Im Rahmen einer aktuellen Diplomarbeit (Hetzel 2005) konnten mittels 16s-rRNA-Sequenzierung einige endogene Bakterien identifiziert werden. Es handelt sich um mehrere *Micrococcus*-Vertreter, darunter *Micrococcus luteus*, und zudem um *Brevundimonas diminuta*. *M. luteus* ist im Rahmen dieser Arbeit schon im frühen Stadium identifiziert worden. Es stellt den bislang einzigen konstanten Bakterien-Vertreter in den *Wolffia*-Pflanzen nach ca. dreijähriger Kultivierung dar. Alle anderen detektierten endogenen Keime (Kapitel 3.4) konnten in den jüngsten Untersuchungen der oberflächensterilen Kulturen nicht mehr nachgewiesen werden. *Micrococcus*-Vertreter sind streng obligate Aerobier, gram-positiv und werden im allgemeinen als „Luftkeime“ bezeichnet. Sie finden sich in fast allen sauerstoffreichen Bereichen, so auch z. B. auf der menschlichen Haut. In der modernen Zeit werden Micrococci, darunter auch der detektierte *M. luteus*, systematisch in der Rohwurstherstellung eingesetzt, da sie als Milchsäurebakterien konservierende Eigenschaften aufweisen (Schlegel 1992). Im Hinblick auf diese Erkenntnisse deutet sich lediglich ein Kommensalismus zwischen *Micrococcus* und *Wolffia* an. Dies bedeutet, daß ein Organismus an seinem Partner partizipiert (in diesem Fall könnte es der

Sauerstoff der photosynthetisch aktiven Pflanze sein), diesen aber nicht schädigt (Munk 2001). Ein nicht zu verachtender Aspekt ist jedoch, daß diese im Normalfall harmlosen Bakterien in ihrer Vielzahl Nischen besetzen, die von pathogenen Keimen somit nicht besetzt werden können. Die in den vorliegenden *Wolffia*-Kulturen anzutreffenden endogenen *Micrococcus*-Vertreter würden somit ein antagonistisches Potential zu phytopathogenen Keimen darstellen. Micrococci sind reich an Glykogen (Schlegel 1992), was für die Pflanzen einen nutritiven Vorteil durch eine zusätzliche Kohlenstoffquelle bedeuten könnte. Grundsätzlich könnte die Beziehung *Wolffia-Micrococcus* über den Kommensalismus hinaus die Dimension eines fakultativen Mutualismus darstellen.

*Brevundimonas diminuta* gehört zu den Pseudomonaden und ist ein streng aerobes, gram-negatives Stäbchen-Bakterium. Anaerobe Lebensweise ist unter Nitrat- oder Arginin-Ernährung möglich (Segers *et al.* 1994). Mit 0,2 µm handelt es sich um einen der kleinsten bekannten Organismen. Die Lebensräume dieser Bakterien sind sowohl aquatische Tiere und Pflanzen als auch das Wasser selbst. Unter mangelnden hygienischen Umständen ist *B. diminuta* auch im Blut des Menschen, im Besonderen aber in der Mundhöhle, detektiert worden ([www.hpa.org.uk](http://www.hpa.org.uk)). *Brevundimonas*-Vertreter sind bekannt für Resistenzen gegen die Antibiotika-Wirkstoffgruppe der Fluoroquinolone (Gyrasehemmer), zu der neben Ofloxacin auch Norofloxacin und Ciprofloxacin gehören. Hochgradige Sensitivität wird dagegen z. B. gegenüber Ticarcillin/Clavulansäure beschrieben (Han und Andrade 2005). *B. diminuta* wird im Gegensatz zu anderen Pseudomonaden-Vertretern wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *B. cepacia* als nicht generell medizinisch bedrohlich klassifiziert. Kolonisation nicht immungeschwächter Menschen wird außerhalb von Krankenhäusern als harmlos eingestuft, da *B. diminuta* über eine nur geringe Virulenz verfügt ([www.hpa.org.uk](http://www.hpa.org.uk)).

Durch die Photoautotrophie der Wasserlinsen sollte eine Kompensation fehlender biotisch verursachter Effekte über das Nährstoffangebot möglich sein. Eine obligate Grundlage hierfür ist eine ausreichende Lichtintensität, da zum einen photosynthetische Prozesse nur durch geeignete Wellenlängen (450-700 nm) induziert werden, zum anderen ein wesentliches Enzym des primären Stoffwechsels, die Nitratreduktase, lichtabhängig arbeitet. Während der *Wolffia*-Versuche konnte von einer tageslichtäquivalenten Beleuchtung ausgegangen werden. Wie in Kapitel 3.6 dargestellt, konnte z. T. ein deutlich besserer Biomassezuwachs von *Wolffia*-Kulturen erzielt werden, wenn dem Medium Saccharose (hier 2 % (w/v)) zugesetzt würde. Untersuchungen von *W. australiana*-Kulturen mit dem **Respiration Activity Monitoring System** (RAMOS) haben ergeben, daß die Saccharose-Konzentration von ca. 12 mM im Kulturmedium innerhalb von ca. neun Tagen auf 7 mM sinkt. Zum gleichen Zeitpunkt kann eine Verdopplung der Pflanzen festgestellt werden (Rechmann 2004). Diese Ergebnisse deuten auf eine fakultativ heterotrophe Ernährung von *W. australiana* hin. Frick (1994) beobachtete ebenfalls heterotrophe Ernährung in Lemnaceen. Das Wachstum in Dunkelheit von *L. minor* und *W. brasiliensis* war durch einen Saccharosezusatz

verbessert. Zudem wurde festgestellt, daß beide *Lemnaceae*-Arten unter Lichtbedingungen photomixotroph reagieren. Dies bedeutet, daß neben der Autotrophie auch eine heterotrophe Ernährung möglich ist, sobald eine geeignete Kohlenhydratquelle verfügbar ist.

Diese These wird dadurch gestützt, daß in weiteren RAMOS-Messungen *W. australiana* unter den gewählten Kulturparametern durchschnittlich doppelt so viel Sauerstoff in der Dunkelphase verbrauchte ( $2,5 \times 10^{-3}$  mol/l), wie sie bei kontinuierlichem Wachstum in der Lichtphase produzierte (Rechmann 2004). Für *W. brasiliensis* kann gesagt werden, daß sie auf den Saccharosezusatz (2 % (w/v)) in Flüssigkultur mit leicht vermehrtem Wachstum reagiert, auf Festmedium jedoch innerhalb von drei Tagen einer vollständigen Chlorose unterliegt. Welche Parameter und regulatorischen Mechanismen im Einzelnen die Pflanzen befähigen, ihre photochemischen Signalkaskaden einer heterotrophen Ernährungsoption anzupassen, bleibt zu untersuchen.

#### 4.1.3 Wachstum der Laborkulturen

Die ermittelte Verdopplungszeit einer *Wolffia*-Kultur beträgt fünf bis sieben Tage. Die Wachstumsangabe der Literatur, die von einer Verdopplung der Biomasse innerhalb von 24 Stunden spricht (Appenroth und Augsten 1996), kann anhand der Daten dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Für *W. australiana* konnte unter abweichenden Kultivierungsbedingungen ebenfalls eine Verdopplungszeit (Juli bis September) von sieben Tagen festgestellt werden (Rechmann 2004). Zu berücksichtigen ist der Einfluß einer signifikanten jahreszeitlichen Rhythmik (Kapitel 3.6.3) auf das Wachstumsverhalten. Zudem variiert der Phänotyp der Spezies, vor allem hinsichtlich der Größe, deutlich über das Jahr. *Wolffia*-Pflanzen zeigen statistisch im Frühjahr ein vermehrtes Wachstum gegenüber anderen Jahreszeiten (Kapitel 3.6.3). Die multiplen Einflüsse auf den Zirkadian-Rhythmus und die Dormanz-Induktion sind in der Literatur für Tiere (Monecke und Wollnik 2005), Pilze (Ying *et al.* 2004) und Höhere Pflanzen (Bakshi *et al.* 1979, Ito *et al.* 2005) dokumentiert. Melatonin löst in *Alfalfa spec.* Kurzzeffekte aus, in den *Lemnaceae Spirodela polyrrhiza*, *Lemna minor* und *Lemna trisulca* konnte kein differierender Melatonin-Spiegel unter variierenden Tagesbedingungen festgestellt werden (van Tassel und O'Neill 2001). Pseudo Response Regulators (PRRs) werden von verschiedenen Autoren als photochemischer Linker zwischen der Photoperiode und Effekten wie Blühbeginn in *A. thaliana* beschrieben. Eine verwandte Protein-Familie (OsPRRs) konnte in der monokotylen Pflanze *Oryza sativa* gefunden werden (Murakami *et al.* 2005). Die beschriebenen Effekte wie z. B. Blühbeginn und Dormanz werden als Resultat auf die Beeinflussung des Zirkadian-Rhythmus beschrieben, welcher in erster Linie von der Photoperiode (Kurz- bzw. Langtagsbedingungen) abhängig ist. Da die *Wolffia*-Pflanzen durch definierte Kultivierungsbedingungen im Labor konstanten Lichtverhältnissen ausgesetzt sind, könnte eine



genetische Konservierung des Zirkadian-Rhythmus und damit eine weitgehende Unabhängigkeit von externen Umweltbedingungen vorliegen.

Ein anderer zu berücksichtigender Aspekt sind die allelopathischen Beziehungen der Pflanzenindividuen einer Kultur untereinander. Eine gewisse Inokulumsmenge Pflanzen pro Volumen sollte nicht unterschritten werden, da die Pflanzen sonst eine Stagnationsphase überwinden müssen, bevor erneut ein Zuwachs verzeichnet werden kann. Dies könnte ursächlich in einer Autokonditionierung des Mediums durch unbekannte Stoffwechselprodukte begründet liegen. Ein sehr deutlicher, reproduzierbarer Parameter ist der stark abfallende pH-Wert innerhalb von drei Tagen von 6 auf ca. 3,5. Wird die Kultur dagegen von vorn herein einem sauren Milieu ausgesetzt, sterben die Pflanzen innerhalb kurzer Zeit ab. Es ist bekannt, daß terrestrische Pflanzen in der Lage sind, durch aktive Veränderungen in der unmittelbaren Rhizosphäre durch z. B. die Ausscheidung organischer Säuren bzw.  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen eine bessere Zugänglichkeit sonst nicht mehr pflanzenverfügbarer Nährstoffe zu erhalten (Amberger 1996). Auch spielt in der pH-Verschiebung die präferierte Stickstoffaufnahme der Pflanzen eine Rolle. Bei bevorzugter Nitrataufnahme ist eine Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich zu beobachten, während eine vermehrte Ammoniumaufnahme zu einer Versauerung des Bodens führt (Marschner Aufl. 2003). Über die aktiven Einflußmöglichkeiten einer wurzelreduzierten Wasserlinse ist der Literatur nichts zu entnehmen. Ein Ansatzpunkt für weitere Arbeiten zur Erforschung der konditionierenden Substanzen könnte u. a. in Untersuchungen auf Proteinebene liegen: Aus Zeitreihen entnommene Aliquots aus dem Kulturmedium könnten durch Proteinbestimmung nach Bradford bzw. Lowry, (alternativ: Gesamtproteinisolation nach Starcher 2001), SDS-PAGE, HPLC und FPLC untersucht werden. Dies könnte einen wichtigen Aufschluß darüber geben, welche Substanzen bei der Autokonditionierung eine Rolle spielen. Die Nährstoffbilanz einer *Wolffia*-Kultur könnte durch regelmäßige Untersuchungen mittels Massenspektrometrie, HPLC und MALDI untersucht werden. Zu den erläuterten Schwierigkeiten zu Beginn der Kultivierung von *Wolffia*-Pflanzen kommen allelopathische Wechselwirkungen, welche auch negativ in die Kultivierung eingreifen können. Ist ein bestimmtes Maß jener Stoffwechselprodukte oder anderer Substanzen überschritten, läßt sich ein negatives Feedback beobachten. Die Pflanzen verlieren an Vitalität, stagnieren im Wachstum und sterben schließlich ab. Dies wird durch rechtzeitiges Umsetzen auf Frischmedium verhindert. Appenroth (1993) erachtet Abscisinsäure als eine Substanz, mit der es möglich wäre, eine Lemnaceen-Kultur bezüglich ihrer Vitalität zu charakterisieren. Landolt (1986) schlägt Ethylen als negative Rückkopplung auslösendes Phytohormon vor. Beide Autoren erläutern keine Messungen oder andere zu diesem Schluß führenden Untersuchungen und berufen sich auf bestehende Quellen zu diesbezüglichen Untersuchungen von Kormophyten. Dagegen erläutern Banga *et al.* (1996) die

Beschleunigung von Seneszenz-Vorgängen bei *Rumex spec.* unter submersen Bedingungen, welche durch das ethyleninduzierte Enzym ACC-Synthase hervorgerufen werden.

Verschiedene Kultivierungsmöglichkeiten in Flüssig- und auf Festmedium sind für *Wolffia* evaluiert worden. Die Messungen mit dem Scannalyzer ergaben für *W. arrhiza* 8272 auf CHU-Festmedium einen Zuwachs bezogen auf den Oberflächendeckungsgrad von bis zu 4100 % (Lemnatec, Kapitel 3.2.3). Der exponentielle Anstieg der Wachstumskurve läßt auf eine sehr geeignete Kultivierungsform schließen, um in einem Zeitraum von ca. sechs Wochen viel Pflanzenmasse zu erzeugen. Die Erfahrungswerte, bezogen auf die Haltung von *Wolffia*-Pflanzen auf Festmedium, lassen jedoch den Schluß zu, daß Festmediumplatten im Vergleich mit einer Flüssigkultur nicht für eine schnelle Biomassevermehrung geeignet sind. Alle nachfolgenden Versuche, *W. arrhiza* 8272 auf Festmedium zu kultivieren, hatten keinen nachhaltigen Erfolg. Die Pflanzen stagnierten sehr bald im Wachstum und unterlagen den typischen Aufhellungsprozessen einer sterbenden Kultur. Der Erfolg des Lemnatec-Experimentes muß demzufolge auf eine einmalige, optimale Kombination verschiedener Effekte zurückzuführen sein. Als Parameter sind der individuelle physiologische Zustand, die Inokulummenge und die Jahreszeit (Kapitel 3.6.3) zu nennen, wobei sich diese Faktoren erfahrungsgemäß gegenseitig zu kompensieren vermögen. Zu bemerken ist abschließend, daß die Lemnatec-Software teilweise Probleme hatte, den Umriß einer *Wolffia*-Pflanze zu erkennen, da der Phänotyp, anders als bei *Lemna spec.*, während des vegetativen Wachstums stark variiert. Die individuellen Umrisse einzelner Fronds sind andere als die von Mutterpflanzen mit ihren in verschiedener Größe vorliegenden Tochterfronds. Die Ergebnisse des Lemnatec-Experimentes sind deshalb kritisch zu betrachten.

Festmediumplatten sind generell arbeitsexensiver als Flüssigkulturen, da kein 14 bis 21-täglicher Mediumwechsel erfolgen muß. Zudem können Kontaminationen leichter erkannt werden. Das Umsetzen der Pflanzen auf frisches Festmedium muß lediglich alle drei bis vier Monate erfolgen. Einen Saccharose-Zusatz verträgt *W. brasiliensis* auch in der geringsten Zugabe von 0,5 % (w/v) nicht; daher ist eine Kompensation offensichtlich schlechter externer Bedingungen auf der Agarplatte auf diesem Wege nicht gegeben. Bei *W. columbiana* gelang keine nachhaltig sterile Festplatten-Kultur, obwohl teilweise kaum Vitalitätsverluste zu beobachten waren. Alle anderen *Wolffia*-Spezies stagnierten sehr schnell im Wachstum und starben im schlimmsten Fall ab. Als nachhaltig vitale und widerstandsfähige Spezies auf Festmedium ist unter den gegebenen Kulturparametern nur *W. australiana* anzusehen (Kapitel 3.5).

Ventflaschen stellten sich als ungeeignet für die Kultivierung für *Wolffia*-Pflanzen und *L. gibba* heraus. Da der Gasaustausch dank der ventilierten Öffnung keinen limitierenden Faktor darstellen sollte und sowohl in den beschichteten als auch in den unbeschichteten Flaschen keine kontinuierlich wachsende Kultur zu beobachten war, ist der negative Einfluß im System zu suchen.

Unter Umständen vertragen die Fronds die allseitige Lichtreflektion nicht, die durch die Transparenz der Flaschen gegeben ist. Ein dunkler und lichtabsorbierender Untergrund könnte dahingehend getestet werden. Die Platzersparnis, die das Ventflaschen-System bietet, wäre ein großer Vorteil in der Aufbewahrung der Pflanzen. Ventflaschen würden sich allerdings nur bei stabil oberflächensterilen Kulturen rentieren, da ein mehrfacher Austausch ökonomisch nicht vorteilhaft wäre.

Als die geeignete Kultivierungsform für Wachstum in Flüssigmedium und im besonderen für die Sterilisation haben sich Erlenmeyerkolben bewährt (Kapitel 3.2.4). Sie sind wiederverwendbar, autoklavierbar und leicht im Umgang. Allerdings stellen sie auch eine arbeitsintensive Kultivierungsform dar, deren Zeitaufwand in Bonitur und Pflege einen nicht zu unterschätzenden Faktor darstellt. Für die Generierung oberflächensteriler Kulturen ist die Kultivierung auf Flüssigmedium jedoch nicht zu ersetzen.

#### 4.1.4 Sterilität

Sterilität des Pflanzenmaterials gehört unter Laborbedingungen zur guten wissenschaftlichen Praxis und sollte eine der Grundvoraussetzungen für das Ziel reproduzierbarer Ergebnisse, besonders im Hinblick auf Transformationsversuche, sein. Die Daten der vorliegenden Arbeit legen offen, daß die Schnittmenge zwischen einer sterilen *Wolffia*-Kultur und vitalen Pflanzen als sehr klein zu betrachten ist. Die getesteten *Wolffia*-Spezies reagieren in hohem Maße letal auf die standardisierten Sterilisationssubstanzen wie Ethanol, Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit (Kapitel 3.3.1). Vergleichbare Schwierigkeiten mit der Sterilisation in *Lemna*-Kulturen beschreiben ebenso Vaughan und Baker (1994).

Mit der Anwendung verschiedener Antibiotika sowohl gegen gram-positive und gram-negative Bakterien als auch gegen pilzliche Kontaminanten konnten nachhaltig oberflächensterile, vitale Kulturen von nahezu allen getesteten Spezies generiert werden. Ein zu diskutierender Aspekt für Laborversuche bleiben die endogen vorhandenen Organismen, die mit einer optimierten Infiltrationsmethode von verschiedenen Antibiotika zwar erreicht, aber nicht final beseitigt werden konnten (Hetzl 2005). Betrachtet man die Sterilität gängiger Laborpflanzen wie Tabak oder *Arabidopsis* im Allgemeinen, so wäre es interessant zu untersuchen, inwiefern es sich bei diesen Kulturen um oberflächensteriles Material handelt oder ob auch hier endogene Mikroorganismen zu detektieren wären. Auch sollte die Möglichkeit nicht außer acht gelassen werden, daß die bekannten Sterilitätstests nicht in der Lage sind, wirklich sämtliche Keime zu detektieren. Nährmedien, die versprechen, daß alle vorhandenen Mikroorganismen darauf wachsen, bleiben kritisch zu prüfen. Neuere Möglichkeiten wie z. B. Bunte-Reihen-Kammersysteme, die gleichzeitig z. B. aerobe und anaerobe Keime abtesten, sind für Schnelltests im humanpathogenen Bereich optimiert.

Nichthumanpathogene Keime sind hier nicht berücksichtigt. Letztlich ist zudem nicht auszuschließen, daß gänzlich unbekannte Mikroorganismen in den zu testenden Proben existieren. Ein umfassend durchgeführter Sterilitätstest, der als negativ festgestellt wurde, könnte deshalb trotzdem Detektionslücken aufweisen.

Für die absolute Dekontamination von *Wolffia*-Pflanzen ist es denkbar, Turionen zu sterilisieren, die auf Grund ihres hohen Regenerationspotentials und ihrer Kompaktheit effektiv mit Alkohol oder Natriumhypochlorit behandelt werden könnten. Der Vorteil gegenüber der Antibiotika-Behandlung läge in der Vermeidung von Resistenzen der Mikroorganismen und zudem in dem Erhalt einer physiologisch homogenen Kultur aus Turionen. Für die Sterilisation von Trinkwasser wird in heutiger Zeit Ozon eingesetzt ([www.fisheries.nsw.gov.au](http://www.fisheries.nsw.gov.au)), dessen Einsatz in *Wolffia*-Kulturen zur Sterilisation überprüft werden könnte. Zu beachten bleibt, daß *Wolffia*-Kulturen, deren mikrobielle Keimzahl durch Sterilisationsbehandlungen reduziert worden waren, eine durchschnittlich geringere Fitness aufwiesen (Kapitel 4.2.4).

#### 4.1.5 Vitalität

Die Erhaltung der Vitalität pflanzlicher Kulturen muß auch unter sterilen Bedingungen gewährleistet sein. Dies beinhaltet ebenso die Beachtung des positiven Einflusses von Mikroorganismen auf die Pflanzenfitness. Wie bereits in Kapitel 3.3.6 beschrieben, ist die Schnittmenge aus Sterilität und Vitalität in *Wolffia*-Kulturen sehr klein. Eine ausreichende Vitalitäts-Garantie der eingesetzten antimikrobiell wirksamen Substanzen (Antibiotika) muß gegeben sein, da sie auch im Falle einer möglichen Rekontaminierung wertvoller Pflanzen, wie potentiellen Transformanten, herangezogen werden müssen. Dabei sind Faktoren wie Spezies (bzw. Klon!) und der aktuelle physiologische Zustand der Kultur entscheidende Parameter. Die zur Sterilisation herangezogenen Antibiotika aus der o. g. Schnittmenge bedürfen einer eingehenderen Betrachtung.

Die Bakteriozide und Bakterioostatika, die zu oberflächensterilen Pflanzen führen, sind verschiedenen Wirkstoffgruppen zugeordnet. So gehören Penicillin, Ampicillin, Ticarcillin, Piperacillin (und Cefotaxim, welches für die Abtötung der Agrobakterien in den potentiell transgenen *Wolffia*-Kulturen verwendet wurde) in die Gruppe der  $\beta$ -Lactame (Schlegel 1992). Antibiotika dieser Wirkstoffgruppe greifen Bakterien während der Zellwandsynthese an. Sie verhindern den Aufbau der Mureinschicht, aus der die Zellwand gram-positiver Bakterien zu großen Teilen besteht. Gram-negative Bakterien haben anteilig zwar sehr viel weniger Murein, dieses ist jedoch nicht weniger essentiell. Modifizierte  $\beta$ -Lactame, die im Originalzustand kaum eine Wirkung auf gram-negative Bakterien aufweisen, haben die Fähigkeit, die Zellwand zu durchdringen und die innen liegenden Mureinschichten anzugreifen. Dadurch ist die Wirkung der

$\beta$ -Lactame auch gegen gram-negative Bakterien gegeben (Munk 2001). Die erwähnten Antibiotika haben nachhaltig keinen negativen Einfluß auf die Vitalität der *Wolffia*-Pflanzen, da kein Angriffspunkt in den Pflanzen selbst gegeben ist.

Ofloxacin aus der Wirkstoffgruppe der Gyrasehemmer (Schlegel 1992) greift an den Bindungsstellen der Ribosomen an und verhindert somit eine effektive Proteinsynthese. Da Pflanzenorganellen wie Mitochondrien und Chloroplasten bakteriellen Charakter haben (Endosymbiontentheorie), liegt es nahe zu vermuten, daß Ofloxacin auch negativen Einfluß auf die *Wolffia*-Pflanzen haben könnte. Bei einer kurzzeitigen Supplementierung einer *Wolffia*-Kultur mit Ofloxacin führt dies jedoch zu keiner nachhaltigen Schädigung der Pflanzen. Den dadurch induzierten Streß, der in der Bonitur durch vorübergehende schlechtere Noten nachzuvollziehen ist, können die Pflanzen durchaus kompensieren. Werden die Pflanzen jedoch nach Hetzel (2005) infiltriert und gelangt so das Ofloxacin direkt ins Innere, sterben sie nach wenigen Tagen. Eine äußerliche Anwendung trägt zur Beseitigung besonders resistenter Keime wie *Stenotrophomonas maltophilia* sowie von  $\beta$ -Lactam-resistenten Bakterien bei. Zur Bekämpfung der endogenen Mikroorganismen kann Ofloxacin und andere Vertreter der Gyrasehemmer (wozu auch das getestete Ciprofloxacin gehört) nicht herangezogen werden.

Vancomycin ist einer von zwei Vertretern der Glycopeptidantibiotika, die auf ähnliche Weise wie die  $\beta$ -Lactame in die Mureinsynthese eingreifen (Schlegel 1992). Es ist ein antimikrobieller Wirkstoff, der bei Bakterien, die schon Resistenzen gegen Antibiotika anderer Wirkstoffgruppen entwickelt haben, sehr wirksam ist. Da Vancomycin sehr gut von den *Wolffia*-Pflanzen vertragen wird, wäre Teicoplanin als weiteres Glycopeptidantibiotikum eine vielversprechende Ergänzung zur Sterilisation, aus der vitale Pflanzen hervorgehen könnten.

Die Vertreter der Tetracycline (Doxycyclin und Tetracyclin) haben schon in der äußerlichen Anwendung einen negativen Effekt auf die Vitalität von *Wolffia*. Auch hier wird, ähnlich wie bei Gyrasehemmern, die Proteinsynthese der Bakterien gehemmt (Schlegel 1992).

Die Vitalität von *Wolffia*-Kulturen wurde über eine Bonitur festgestellt. Da diesen subjektiven Aussagen objektive Daten gegenübergestellt werden sollten, wurden mehrere Systeme auf ihre Eignung zur Vitalitäts-Messung getestet.

Das PAM-2000 (Kapitel 3.1) ist dazu geeignet, zuverlässige Vitalitätsdaten von *Wolffia*-Kulturen über den Yield auszudrücken. Hierbei ist zu beachten, daß diese Yield-Werte über die Zeit betrachtet einen Trend des Vitalitätsstatus darstellen. Der gemessene Yield-Wert ist stark abhängig von der Distanz des Meßfühlers zur Probe und von der Menge des angeregten Chlorophylls. Dagegen kann der Lichteinfluß unberücksichtigt bleiben, da dieser (durch Ft und Fm) herausgerechnet wird. Die Distanz zur Probe kann in allen Messungen durch einen definierten Abstandshalter als konstant angenommen werden. Die Chlorophyllmenge, die angeregt wurde, ist

dagegen als leicht variabler Faktor zu betrachten. Die Messungen haben sich jedoch als verlässliche Trendaussagen bewährt. So ist es möglich, eine absterbende Kultur zu detektieren, bevor dies durch den Chlorophyllabbau sichtbar geworden wäre. Dieser Zeitfaktor ist im Besonderen unter selektierenden Bedingungen von hoher Bedeutung. Zudem ist vorstellbar, daß sich das PAM-2000 leicht in ein digitales Monitoring-System eines Bioreaktors integrieren ließe, womit eine kontinuierliche Vitalitäts-Überwachung der Kultur gegeben wäre. Ein Nachfolgemodell des PAM-2000, das IMAGING-PAM (Walz, Effeltrich), wäre eine interessante Alternative, um in unter Selektionsdruck stehenden Kulturen noch schneller transgene (vitale) Einzelpflanzen detektieren zu können.

Versuche mit dem Respiration Activity Monitoring System (RAMOS) zeigten, daß über die Sauerstofftransferrate (OTR) generell ein noch schnelleres Erkennen des Vitalitätsstatus möglich ist, da die Pflanzen offensichtlich eher mit einer Änderung der OTR reagieren als mit einer Änderung der Chlorophyllabsorption (Rechmann 2004). Die Messungen mit dem PAM-2000 sind jedoch weit weniger aufwendig und für die schnelle Überprüfung einer Kultur ausreichend.

Als weiteres System zur Vitalitätsbestimmung durch Sauerstoffmessung wurde der CellScan getestet (Kapitel 3.7). Der CellScan ist in der Lage, in einem annähernd geschlossenen System einen Unterschied zwischen vitalen und letal geschädigten *Wolffia*-Pflanzen über die Messung des Sauerstoffgradienten auszumachen (Kapitel 2.11). Ein Vorteil liegt in der voll-automatischen Messung über 24 Stunden, was für ein Monitoring erwünscht ist. Doch unterliegt das System einigen noch unstandardisierten Parametern, die Fehlerquellen beinhalten können. Als Beispiel hierfür kann das manuelle Verkleben der Sensoren am Well-Boden genannt werden. Für ein sauerstoffverbrauchendes System entworfen, müßte der CellScan weiter optimiert werden, wenn er Anwendung in der Vitalitätsmessung eines sauerstoffproduzierenden Systems finden soll. So müßte ein 100 %iges biokompatibles Abdichtungssystem (z. B. Klebstoff) ohne schädigende Aerosolbildung gefunden werden, das sowohl die Platte von der Außenluft als auch die Wells untereinander abschirmt, um exakte Meßdaten für jedes Well erzeugen zu können. Vom heutigen Status ausgehend ist das CellScan-System im Hinblick auf die Vitalitätsmessung einer *Wolffia*-Kultur der Fluoreszenzmessung mit PAM-2000 unterlegen.

## 4.2 Transformation

Verschiedene Transformationsansätze wie Co-Kultivierung mit Agrobakterien, Agrobakterien-Infiltration und Agrobakterien-Injektion sind für *Wolffia* evaluiert worden. Prinzipiell kann festgehalten werden, daß Agrobakterien in der Lage sind, *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* zu transformieren (Kapitel 3.10). Die entscheidenden Kriterien hierbei sind die

Transformationseffizienz und die Frage, ob die Pflanzen in der Lage sind, stabile Transformation mit ausreichender Vitalität nachhaltig zu gewährleisten.

#### 4.2.1 Vitalität nach Transformationsbehandlungen

Die Agrobakterien haben keinen negativen Einfluß auf die Vitalität der transformierten Pflanzen innerhalb eines Versuchszeitraums von mindestens elf Tagen. Über diesen Zeitpunkt hinweg etabliert sich die Bakterien-Kultur jedoch so stark, daß sie mit der Pflanzenkultur in Konkurrenz um Nährstoffe tritt und/oder durch die Produktion negative Rückkopplung auslösender Stoffwechselprodukte einen Faktor darstellt, der die Fronds zunehmend schwächt. In weiterführenden Transformationsversuchen sollte zur Vitalitätsüberprüfung das PAM-2000 hinzugezogen werden. Eine Applikation von Antibiotika wie Cefotaxim gegen gram-negative Bakterien nach einigen Tagen Co-Kultivierung mit den Agrobakterien kann diesen Effekt verringern. Es ist davon auszugehen, daß Agrobakterien, die ihre T-DNA nach drei bis vier Tagen nicht in das Pflanzengenom übertragen haben, dies auch zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr zu tun vermögen. Die Zugabe einer hohen Konzentration Antibiotika (250 µg/ml Cefotaxim) zum Abtöten der Agrobakterien hatte im beobachteten Zeitraum keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität der Pflanzen, sofern sie die Transformationsbehandlungen vital überlebten. Da bekannt ist, daß Antibiotika wie z. B. Cefotaxim phytohormonähnlich (wie z. B. Auxin) wirken und äquivalente Effekte auslösen können (Lin *et al.* 1995), sollte dieser Aspekt im weiteren Verlauf der Transformationsversuche nicht unberücksichtigt bleiben. Dies hat besonders unter dem Gesichtspunkt des Einsatzes von Antibiotika zur Resterilisierung der wertvollen Transformanten Bedeutung. Wildtypen von *Wolffia spec.* haben zwar einen breiten Toleranzbereich gegenüber verschiedener Antibiotika (Kapitel 3.3.3), doch kann nicht vorhergesagt werden, ob gentechnisch veränderte *Wolffia*-Pflanzen äquivalent reagieren. In diesem Zusammenhang muß zudem berücksichtigt werden, daß die durch die Transformation vermittelte pflanzliche Antibiotika-Resistenz ebenfalls einen Einfluß auf die Vitalität der gentechnisch veränderten Pflanze beinhalten könnte. Hierzu sind Studien in *A. thaliana* (Purrington und Bergelson 1997, Tian *et al.* 2003, Roux *et al.* 2004) und *Brassica napus* (Crawley *et al.* 1993) dokumentiert. Demnach wirken sich in *A. thaliana* eingebrachte Herbizidresistenzen in Form einer Verminderung der Samenproduktion aus. Glick (1995) berichtet von negativen Effekten in Bakterien-Systemen durch das Einbringen von Resistenzgenen. Resistenzgene „kosten“ die betreffende Pflanze nach induzierter Expression einen Teil ihrer Fitness, was sich in verminderter Trockenmasse und Samenproduktion ausdrückt (Tian *et al.* 2003). Dieser Erkenntnis folgend, ist das gentechnische Einbringen stark konstitutiver Promotoren für Zielgene und daran gekoppelte Resistenzen kritisch zu betrachten.

Die Streßfaktoren für die Pflanzen durch Agrobakterien, der Transformationsvorgang selbst und die möglichen Vorbehandlungen müssen differenziert betrachtet werden. Durch den Transformationsvorgang der Infiltration oder Injektion werden die *Wolffia*-Pflanzen nicht geschädigt, weshalb davon auszugehen ist, daß sowohl ein sich schnell ändernder Druck als auch die Verletzung mit einer Kapillare keine negativen Auswirkungen auf die getesteten *Wolffia*-Pflanzen hat. Der angenommene Streßfaktor, der durch die Agrobakterien hinzukommt, ist offensichtlich von den Pflanzen kompensierbar. Nachhaltige Schädigung der Pflanzen entsteht jedoch, wenn die Pflanzen vor der eigentlichen Transformation entweder durch Particle Bombardment oder durch Korund verletzt worden sind. Letztere Vorbehandlung hat einen letalen Effekt auf alle getesteten *Wolffia*-Spezies, wobei beschossene Fronds allerdings nachhaltig überleben, wenn sie anschließend keinen Agrobakterien ausgesetzt waren. Die Art und Summe der Streßfaktoren im Rahmen der Transformation spielt demnach eine zentrale Rolle für das Überleben der behandelten Pflanzen.

Die Transformationseffizienz ist bei einer sich vermehrenden Kultur schwierig zu ermitteln. Eine zählbare Menge an Fronds kann für den Transformationsversuch bereitgestellt werden, jedoch ist es abhängig von der versuchsbedingten individuellen Kulturvermehrungsrate der potentiellen Transformanten, wieviele transgene Pflanzen detektiert werden können. Letztlich ist es nicht nachvollziehbar, wieviele transgene Tochterpflanzen aus einem einzigen Transformationsereignis stammen. Dies wäre nur möglich, wenn einzelne Fronds nach der Transformation getrennt voneinander kultiviert würden, was den Bedürfnissen einer *Wolffia*-Kultur aufgrund der in Kapitel 4.1.3 erläuterten allelopathischen Wechselwirkungen widerspricht. Letztlich kann die Transformationseffizienz deshalb nur auf die Ausgangsmenge des Transformationsansatzes bezogen werden.

Da das Abtöten der potentiellen Transformanten durch die verwendete GUS-Färbelösung unumgänglich ist, ist somit die Möglichkeit genommen, die GUS-positiven Pflanzen vital zu erhalten. *In-vivo*-Reportersysteme, wie es ein nicht-letal GUS-Assay oder das GFP-System darstellen, erscheinen deshalb als eine Alternative. Die Detektion transgener Pflanzen blieb nach der Verwendung einer alternativen, nicht letal wirkenden GUS-Färbelösung (Kirchner *et al.* 1993) ohne Erfolg (Kruse, persönliche Mitteilung). Auch konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie kein eindeutiges GFP-Signal beobachtet werden (Kapitel 3.10). Eine alternative Möglichkeit gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie bietet die konfokale Lasermikroskopie, welche zur Detektion von GFP in *Wolffia spec.* zu testen bleibt.



#### 4.2.2 *Agrobacterium-tumefaciens*-vermittelter Gentransfer

Agrobakterien kommen in nahezu allen Böden vor und infizieren terrestrische Pflanzen. Boehm *et al.* (2001) und Kruse *et al.* (2002) demonstrierten, daß *A. tumefaciens* generell in der Lage ist, *W. columbiana* zu infizieren. Die Ergebnisse dokumentieren eine transiente Transformation mit einem hohen Chimären-Anteil. Eine Erhöhung der Transformationsrate und die stabile Transformation ganzer Pflanzen standen deshalb im Fokus der Experimente.

##### 4.2.2.1 Co-Kultivierung mit *Wolffia spec.*

Die Co-Kultivierung der *Wolffia*-Pflanzen mit Agrobakterien (GV 3101/pCAMBIA 1301) hatte weder bei verletzten noch bei unverletzten Fronds Transformationsereignisse zur Folge (Kapitel 3.10.1). Agrobakterien benötigen eine Eintrittsmöglichkeit in die Pflanze, wie sie unter natürlichen Bedingungen eine verletzte Wurzel darstellt (Steinbiß 1995). Durch Particle Bombardment verletzte und anschließend mit Agrobakterien inokulierte Pflanzen wiesen punktuelle Blaufärbungen auf (Kapitel 3.10.1). Ist eine Verletzung nicht gegeben, so verbleiben für die Bakterien lediglich die Stomata, die eine Verbindung zum Interzellularraum der Pflanze darstellen, als Möglichkeit, in das Innere der Pflanze vorzudringen. Daß es prinzipiell möglich ist, unverletztes Gewebe zu transformieren, dokumentieren Chumakov *et al.* (2002). Sie behandelten unverletzte Reis- und Weizenkeimlinge mit Fusiococcin (welches für eine CO<sub>2</sub>-Reduktion verantwortlich ist) und IAA und kultivierten die Pflänzchen zwei Stunden vor der Agrobakterienzugabe unter Lichtbedingungen. Diese Maßnahmen dienten dazu, die Stomata als Eintrittspforte für Agrobakterien zu öffnen. Die Autoren vertreten die Ansicht, daß bei Monokotyledonen die Anzahl der Stomata ein wichtiger Faktor für agrobakterieninduzierte Transformation ist sowie daß bei monokotylen Pflanzen ausschließlich juveniles Gewebe transformiert werden kann. Inwieweit diese letzte Aussage zutrifft, kann an Hand von *Wolffia* als ebenfalls monokotylem pflanzlichen Organismus nur schwer kommentiert werden. Die Generationenfolge bei *Wolffia* ist nicht einfach determinierbar, und es kann demzufolge keine Aussage darüber gemacht werden, wie alt die transformierten Pflanzen tatsächlich waren. In dem teilweise sehr hohe Anteil punktueller Blaufärbungen spiegelt sich die Transformation älteren Gewebes wieder. Der Vorteil jedoch, junges meristematisches Gewebe zu transformieren, ist für die stabile Transformation intakter *Wolffia*-Pflanzen mit vorwiegend vegetativem Wachstum die unbedingte Voraussetzung. Die Beobachtung von gänzlich blauen Fronds nach X-Gluc-Färbung, die einer grünen Mutterpflanze entwachsen, zeigte, daß offensichtlich meristematisches Gewebe transformiert wurde, aus welchem sich der vollständig transgene Tochterfrond entwickelt haben muß.

Chumakov *et al.* (2002) arbeiteten ebenfalls mit einem GUS-Reportersystem und inkubierten u. a. Keimlinge von monokotylen Pflanzen (*Oryza sativa* und *Triticum aestivum*) bis zu zwei Tage in X-

Gluc-Färbelösung, bevor ein Blauumschlag sichtbar wurde. Diese sehr lange Inkubationsdauer kann für *Wolffia* mit 12-24 Stunden bestätigt werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß lange Inkubationszeiten die Gefahr einer unspezifischen Blaufärbung erhöhen. Molekularbiologische Nachweise für die erfolgreiche GUS-Transformation sind bei Chumakov *et al.* (2002) ebenso nicht angegeben wie eine Aussage über die stabile Vererbung in der F1-Generation. Die Vorbehandlungen (Licht und IAA-Einsatz) wären jedoch generell zu überprüfende Parameter für die Optimierung der *Wolffia*-Transformation.

Die Co-Kultivierung mit Agrobakterien kann nach den vorliegenden Daten nicht als Transformationsmethode für intakte *Wolffia*-Pflanzen empfohlen werden. Die Co-Kultivierung kallöser Strukturen mit *A. tumefaciens* kann hingegen als erfolgsversprechender Ansatz gewertet werden (Kapitel 4.3).

#### 4.2.2.2 Agrobakterien-Infiltration

Durch die in Kapitel 2.16.4 beschriebene Agrobakterien-Infiltration konnten im Rahmen dieser Arbeit blaue Fronds detektiert werden. Nach eingehender Optimierung dieser Methode konnte eine deutliche Verbesserung der Infiltrationseffizienz, die an Hand des Anteils absinkender Fronds definiert wurde, von ca. 50 % auf über 90 % erreicht werden (Hetzel 2005). Die Agrobakterien-Infiltration nach Hetzel (2005) ist zudem durch einen hohen Pflanzendurchsatz gekennzeichnet. Aus diesen mit *W. australiana* durchgeführten Versuchsreihen mit *A. tumefaciens* C58/pCAMBIA 1301 gingen nach 11 Tagen Co-Kultivierung (ohne Selektion) Pflanzen hervor, für die erstmals eine Transformation auf Transkriptionsebene mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.10.2).

Die Wahl des Agrobakterienstammes kann entscheidenden Einfluß auf die Transformationseffizienz haben und bleibt für jedes Pflanzensystem spezifisch zu prüfen. Der *A. tumefaciens*-Stamm C58 stellt einen vielversprechender Kandidat für eine erfolgreiche stabile Transformation dar. Zukünftige Arbeiten müssen die Infiltrationsbedingungen wie z. B. Dauer und Intervall des Unterdrucks weiter optimiert und die Ergebnisse nach selektierenden Bedingungen reproduziert werden. Zudem könnte ein Western Blot mit entsprechender Antikörperhybridisierung die Transgenität final bestätigen. Erste Ergebnisse aus der Infiltration von *W. australiana* mit *A. tumefaciens* GV3101 pMP90RK/pPAM SARK nach Hetzel (2005) führten zu einem positiven RT-PCR-Signal (Becker, unpubl. Daten) und stellen somit die erste erfolgreiche Transformation von *Wolffia* mit einem Immuntoxin dar.

### 4.2.2.3 Agrobakterien-Injektion

Neben der X-Gluc-Färbung sind stabile Transformationsereignisse ebenso durch einen GUS-Assay nach Agrobakterieninjektion nachgewiesen worden. Diese Methode (nach Boehm, unpubl. Daten) ist jedoch sehr arbeitsintensiv und beinhaltet einen geringen Pflanzendurchsatz. In der Betrachtung der Ergebnisse ergibt sich ein sehr hoher Chimären-Anteil. Das eingesetzte Mazerozym ist in der Hauptfunktion eine Pektinase, die eine Vielzahl von enzymatischen Nebenaktivitäten wie z. B. Cellulase-, Protease- und  $\alpha$ -Amylase-Aktivität aufweist (nach Angabe des Herstellers). Möglich wäre, ein Enzym mit einer anderen enzymatischen Hauptfunktion wie z. B. Cellulase zu wählen, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Wünschenswert wäre ein Enzym, welches die in den Lemnaceen beschriebene Apiose als einen der Hauptbestandteile der Zellwand (Landolt 1986) spaltet. Dies könnte ebenfalls die Protoplasten-Isolation mit ihren Vorteilen für eine vollständige Transformation fördern. Bisherige Ergebnisse lassen auf eine generell schlechte Protoplastierbarkeit von *Wolffia spec.* schließen (Heister, unpubl. Daten). Ein apiose-spaltendes Enzym ist bislang nicht verfügbar.

### 4.2.3 Selektion der Transformanten

Für *W. australiana*, *W. brasiliensis* und *W. columbiana* sind Selektionsprotokolle mit Hygromycin unter Stark- bzw. Schwachlichtbedingungen entwickelt worden (Kapitel 3.3.4). Die einfache Zugabe des Selektionsantibiotikums reichte bei Transformationskulturen von *Wolffia spec.* prinzipiell nicht aus, um transgene und nicht transgenen Fronds differenzieren zu können. Eine effektive Selektion konnte nicht stattfinden. Es ist zu vermuten, daß die transgenen Pflanzen von den negativen Wechselwirkungen einer sterbenden Kultur beeinflusst waren und ebenfalls abstarben. Dies geschah, bevor eine optische Differenzierung zwischen nicht transgenen, weißen Fronds und noch grünen potentiellen Transformanten vorgenommen werden konnte.

Es kann zudem vermutet werden, daß im überwiegenden Teil eines Transformationsansatzes kein Transformationsereignis stattgefunden hat. Die nicht transgenen, unter Selektionsdruck sterbenden Pflanzen bedeuteten einen letalen Streß für die wenigen positiven Klone, die zwar dem Selektionsantibiotikum widerstanden, den negativen Rückkopplungseffekten jedoch nichts entgegenzusetzen hatten und somit ebenfalls abstarben. Streß-Phytohormone wie Ethylen und Auxin waren mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenso an diesem Prozeß beteiligt wie kurze Zeit später toxische Schwefelmetabolite, die während des Abbaus organischer Materie charakteristisch auftreten.

Die Überlegung, wie transgene Pflanzen überleben könnten, führte zu der Schlußfolgerung, daß die negativen Effekte, die unter den Bedingungen einer sterbenden Kultur auftreten, abgepuffert werden mußten. Erreicht wurde dies nach der Aufhebung des Selektionsdruckes nach zwei bzw.

drei Tagen durch das Umsetzen des gesamten Transformationsansatzes auf Frischmedium (alle zwei Tage), was so lange fortgeführt wurde, bis eine optische Differenzierung weißer und grüner Fronds möglich geworden war. Eine Supplementierung des Mediums mit Saccharose bei gleichzeitiger Gabe hoher Dosen Cefotaxim, wie es das Selektionsprotokoll für *L. gibba* nach Yamamoto *et al.* (2001) beschreibt, könnte ein interessanter Versuch in der *Wolffia*-Selektion sein, um die Pflanzenfitness unter den Bedingungen einer negativen Rückkopplung zu erhalten. Zu berücksichtigen sind hierbei zusätzliche Streßfaktoren wie z. B. die Kombination mehrerer Antibiotika und ihre Wirkung auf *Wolffia*, sowie phytohormonäquivalente Reaktionen von Antibiotika, wie Lin *et al.* (1995) sie diskutieren. Zudem könnten Messungen von Phytohormonen und bekannten toxischen Abbauprodukten wie Schwefelmetabolite, Nitrat und Kohlendioxid genaueren Aufschluß über die negative Rückkopplung auslösenden Substanzen geben.

Das PAM-2000 zeigt zuverlässig anhand der Yield-Werte an, daß nach wenigen Tagen unter Selektionsdruck die Kultur ein insgesamt letales Stadium erreicht hat. Diese kurze Zeitspanne ist für eine optische Differenzierung weißer und grüner Fronds zu kurz, da der beginnende Chlorophyllabbau erst nach ca. einer Woche sichtbar wird. Mit einer Weiterentwicklung des PAM-2000, dem Imaging-PAM (Firma Walz, Effeltrich), könnten direkt nach der Aufhebung des Selektionsdruckes einzelne Individuen detektiert werden, deren spezifischer Yield-Wert einen vitalen Frond anzeigt. Erste Versuche hierzu sind vielversprechend (Boehm, persönliche Mitteilung).

#### 4.2.4 Endogene Mikroorganismen in transgenen Pflanzen

Alle Versuche, die endogene Mikroflora zu beseitigen, blieben bislang ohne Erfolg. Es stellt sich die Frage, ob ein Pflanzensystem für Proteinproduktion herangezogen werden sollte, wenn außer dem Expressionsorganismus selbst zudem Mikroorganismen anwesend sind. Ohne Zweifel bedarf diese Frage einer eingehenden Prüfung. Ein absolutes Ausschlußkriterium wären auftretende humanpathogene Keime. Trotz umfassender Prüfungen unter aeroben und anaeroben Bedingungen, unterschiedlichen Inkubationstemperaturen und 17 verschiedenen Medien, darunter verschiedene Blutagarplatten, konnte kein humanpathogener Keim detektiert werden (Hetzl 2005). Bisherige Untersuchungen (Kapitel 4.1.4) identifizierten *B. diminuta*, *M. luteus* und andere *Micrococcus*-Vertreter. Daß Keime dieser Art für den Menschen unter normalen Umständen kein Risiko darstellen, liegt darin begründet, daß diese Mikroorganismen im täglichen Leben (Trinkwasser, Luft, Haut) vorhanden sind ohne Schaden zu verursachen.

Nach Hetzel (2005) existieren wenige weitere endogene Mikroorganismen in *W. australiana*. Diese konnten unter dem Mikroskop zwar detektiert, aber unter keiner der vielseitigen Bedingungen in Kultur genommen werden. Offensichtlich sind die Bedingungen in der *Wolffia*-Pflanze so

spezifisch, daß die Bakterien nicht in der Lage sind, außerhalb ihres Wirtes zu überleben. Dies kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt werden. Oberflächensterile *W. australiana* konnten auf zuckerhaltigem Medium (2 % (w/v) Saccharose) monatelang kultiviert werden, ohne daß Kontaminationen zu beobachten waren. Zudem wurde homogenisiertes *Wolffia*-Material, welches die endogenen Mikroorganismen beinhaltet, in DMEM-Medium gegeben und mehrere Tage inkubiert. Mit diesem besonderen Medium werden in biotechnologischen Anwendungen sämtliche Zellkulturen auf Sterilität überprüft. Fällt der Test negativ aus, so gilt die getestete Fermenterkultur als steril. Nach einer Woche Inkubation mit homogenisiertem *W. australiana*-Material konnte kein für Kontaminationen charakteristischer Farbumschlag beobachtet werden (Rechmann, persönliche Mitteilung). Trifft es folglich zu, daß ein Überleben dieser Mikroorganismen an die einzigartigen Bedingungen innerhalb einer *Wolffia*-Pflanze geknüpft ist, stellen diese Bakterien ebenfalls kein humanpathogenes Potential dar. Zur Identifikation dieser noch unbekanntenen, möglicherweise endosymbiotischen Organismen könnte die 16S-rRNA-Sequenzierung (Weisburg *et al.* 1991) in weiterführenden Untersuchungen beitragen.

Auf Grund der vorliegenden Daten, Erfahrungen und Ergebnisse, dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, daß die endogene Mikroorganismen-Flora kein humanpathogenes Potential enthält und somit von einer transgenen *Wolffia*-Kultur unter kontrollierten fermentierenden Bedingungen kein erhöhtes Risiko für Mensch und Umwelt ausgeht.

Zu prüfen bleibt, ob die endogene Mikroflora Einfluß auf das Expressionsprodukt proteinsekretierender Pflanzen hat. Zu erwähnen wären diesbezüglich falsche Glykosylierungsmuster, inkorrekte Faltung oder gänzlicher Abbau des Produktes.

### 4.3 Kalluskulturen

Da die Transformation von Kalluskulturen eine interessante Alternative zur Transformation ganzer Pflanzen darstellt, sind verschiedene Bedingungen für Kallusinduktion in *Wolffia*-Kulturen evaluiert worden. Transformation von kallösem Gewebe bringt den Vorteil mit sich, mit hoher Wahrscheinlichkeit vollständig transgene Pflanzen zu regenerieren. Dieser Aspekt bekommt hohe Gewichtung, da bei den bislang positiven Ergebnissen aus Agroinjektion und -infiltration ein hoher Anteil chimärer Pflanzen vorlag.

In Tabak (*N. tabacum*) erfolgt Kallusinduktion standardisiert in Dunkelheit an den Wundrändern, d. h. an verletztem Gewebe. Aufgrund des Phytohormoneinflusses kommt es dort zu unkontrollierter Zellteilung; ein Kallus entsteht. In diese Kallus-Zellen können z. B. mittels Particle Bombardment Zielgene eingebracht werden. Unter einem entsprechenden Phytohormoneinfluß kann auf Grund der Totipotenz der Pflanzenzelle nun die Regeneration der Pflanze eingeleitet werden. Da nach der erfolgreichen Transformation kallösen Gewebes mit hoher Wahrscheinlichkeit vollständig

transgene Zellen zugrunde liegen, ist die daraus entstehende Pflanze folglich ebenfalls vollständig transgen (Neumann, 1995).

Moon und Stomp (1997) generierten Kallus aus unverletzten *L. gibba*-Pflanzen unter Lichtbedingungen und 23 °C mittels 50 µM 2,4-D und 3 % (w/v) Saccharose auf einem MS-Grundmedium. NAA wird als weniger effektiv zur Kallusinduktion beschrieben. Für eine bessere Proliferation wird generell eine geringere Auxin-Konzentration empfohlen, da ein erhöhter Anteil (ca. 20 %) seneszenten Pflanzen zu beobachten war. Diese Seneszenzeffekte waren mit einer hohen Saccharose-Zugabe von 30 g/l (w/v) z. T. kompensierbar. Regeneration des Kallus erfolgte auf SH-Medium sowie auf SH-Medium, welches mit 10 µM BA supplementiert war. Fronds, die aus diesen Versuchen hervorgingen, waren nachhaltig vital und phänotypisch nicht von den Ausgangskulturen unterscheidbar.

Arbeiten mit *L. gibba* von Stefaniak *et al.* (2002) führten mit der Supplementierung von MS mit 45 µM 2,4-D -Medium zu kallösen Strukturen. Kallus-Induktion konnte jedoch nur beobachtet werden, wenn sich die verletzten Fronds bei 25 °C in Dunkelheit befanden. Regeneration wurde durch 22 µM IES und 4,6 µM Kinetin auf einem MS-Grundmedium bei 23 °C unter Lichtbedingungen erreicht. Nach Ansicht der Autoren sind höhere Temperaturen zwischen 25 und 28 °C einer erhöhten Kallusinduktionsrate von *L. minor* zuträglich. Neben den Erläuterungen zur Kallusinduktion und -regeneration stellen die Autoren eine indirekte Organogenese fest.

Einer Publikation über Kallusinduktion und -regeneration von *L. gibba* und *Spirodela* (Li *et al.* 2004) kann entnommen werden, daß die Supplementierung mit Zuckern wie Saccharose, Glucose und Fructose in einer Mortalitätsrate der Pflanzen von 100 % endete. Kallusinduktion gelingt mit *Spirodela* auf Woody-Plant-Medium (WP, Lloyd und McCown 1980) mit 2 % (w/v) Sorbitol 1 % (w/v) Maltose, 5 mg/l PCA und 2 mg/l 2iP (N<sup>6</sup>-2-Isopentenyladenin). Die vorangegangene Kultivierung wird als ausschlaggebender Faktor angegeben: WP supplementiert mit 1,5 % (w/v) Galactose, 50 mg/l Dicamba und 2 mg/l BA. Regeneration wird ebenfalls mit WP-Grundmedium, 0,5 % (w/v) Saccharose und 1 mg/l TDZ bei 90-100 % aller Fronds erreicht. Die Autoren erkennen partiell differenzierte Strukturen im sich entwickelnden Kallus.

Für *L. gibba* diskutieren die Autoren (Li *et al.* 2004) den Einfluß der Kohlenhydratquelle und kommen zu dem Schluß, daß Galactose und Glucose in dem optimierten B5-Medium mit 1 % (w/v) Saccharose, 50 mg/l Dicamba und 2 mg/l BA aufgrund bis zu 100 % seneszenten Fronds nicht zu empfehlen sind. Noch grüne Tochterfronds dieser seneszenten Pflanzen wurden von diesem Medium nach vier bis fünf Wochen auf B5-Medium mit den genannten Zusätzen jedoch ohne weiteren Zuckerzusatz überführt. Es konnte daraufhin eine deutliche kallöse Entwicklung fast aller Fronds verzeichnet werden. Unter Cytokinin-Einfluß konnte nach 10-12 Tagen Regeneration

beobachtet werden. Unter Sorbitol- und Mannitolsupplementierung waren weder Induktion noch Proliferation noch Regeneration zu beobachten.

Li *et al.* (2004) evaluieren, daß durch die Wachstumshemmung der Mutterpflanze durch entsprechenden Zuckerzusatz eine verbesserte Kallusinduktion erwartet werden kann, da die Mutterpflanze als alleiniges Sink folglich die Phytohormone akkumuliert und diese dann im meristematischen Bereich zur Kallusinduktion führen. Nicht assimiliertes Zucker führt nach Ansicht der Autoren zur Destruktion der Mutterpflanze, die daraufhin streßlabil den supplementierten Phytohormonen ausgesetzt ist, was final den Tod der Pflanze bedeutet.

Die Autoren der genannten Publikationen sprechen von proliferiertem Gewebe, bleiben den Beweis für Proliferation durch Mitose jedoch schuldig. Bei der Transformation von *L. gibba* und *L. minor* sprechen Yamamoto *et al.* (2001), die auf das Kallusprotokoll nach Moon und Stomp (1997) zurückgreifen, von „teilweise organisiertem“ Kallus. Li *et al.* (2004) entdeckten ebenfalls differenzierte Strukturen innerhalb ihres Kallusgewebes. Durch Zellkern-Färbung ließe sich zeigen, ob es sich um Zellteilung handelt oder lediglich um wassereinlagernde Vitrifizierung. Regeneration vitaler Fronds wird bei Moon und Stomp (1997) u. a. durch Weglassung sämtlicher Phytohormone erreicht. Dieses Verhalten spricht weniger für Kallus-Regeneration als eher für direkte bzw. indirekte somatische Embryogenese. Es ist bekannt, daß 2,4-D direkte Embryogenese einleitet (Neumann, 1995). Ein weiteres Indiz dafür ist die beginnende Differenzierung nach Umsetzen der Dedifferenzierte Strukturen auf 2,4-D-freies Medium (Neumann, 1995). Moon und Stomp (1997) arbeiteten mit unverletzten *L. gibba*-Pflanzen, die zudem unter Lichtbedingungen kallöse Strukturen hervorbrachten. Zusammenfassend liegt hier offensichtlich eine indirekte somatische Embryogenese vor. Li *et al.* (2004) kommen zu dem Schluß, daß für *L. gibba* Saccharose nicht, wie Moon und Stomp (1997) beschreiben, zur Kallus-Induktion geeignet ist, sondern nur für die Kalluserhaltung- bzw. das Kalluswachstum sowie für die Regeneration einsetzbar ist. NAA wird bei den letztgenannten Autoren nicht zur Kallus-Induktion empfohlen, den kallösen Strukturen im Rahmen dieser Arbeit liegt jedoch ein NAA-Regime zugrunde.

Vielversprechende dedifferenzierte Strukturen konnten bei unverletzten *W. australiana*-Pflanzen beobachtet werden (10 µM NAA/1 µM BAP), für die jedoch abschließend keine nachhaltige Proliferation beobachtet werden konnte. Ein vitaler Kallus konnte ebenfalls nicht dauerhaft erhalten werden. *W. brasiliensis* reagierte auf alle getesteten Phytohormon-Regime nicht mit kallösen Strukturen, sondern letztlich letal und kann deshalb nicht für weitere Kallus-Versuche empfohlen werden.

Die in den zuvor genannten verschiedenen Publikationen beschriebenen Pflanzen gehen nicht auf die gleichen Ursprungsorte zurück und entstammen verschiedenen Sammlungen. In den heterogenen Ergebnissen zur Kalluskultur könnte sich erneut die spezifische Heterotrophie der

*Lemnaceae* (Frick 1994) widerspiegeln. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß für verschiedene Klone jeweils eine individuelle Optimierung der Kulturbedingungen vorgenommen werden muß.

Histologische Untersuchungen an Petiolenexplantaten zeigen, daß parenchymatische Zellen bzw. verschiedene Positionen im Gewebe Kompetenz für unterschiedliche morphogenetische Prozesse aufweisen (Neumann 1995). Bezogen auf *Wolffia* oder andere Lemnaceen und deren Transformation hieße dies, daß u. U. über dedifferenzierte Gewebe jeder Art erfolgreiche Transformation gelingen könnte. Zu beachten bleibt im Hinblick auf ein proteinproduzierendes System die Erkenntnis, daß durch indirekte somatische Embryogenese in der F1-Generation von der Originalpflanze abweichende Proteinmuster auftreten können (Neumann 1995). Eine direkte somatische Embryogenese unter IES-Einfluß wäre demzufolge die vorzuziehende Variante, die zudem keine weiteren Optimierungen für die Regeneration beinhaltet.

Für weitere Arbeiten auf diesem Gebiet kann anhand der vorliegenden Daten *W. australiana* empfohlen werden.

#### 4.4 Fermentation

Verschiedene Fermenter aus der klassischen Zell- und Gewebekultur wurden getestet, wobei nicht außer acht gelassen werden darf, daß es sich hierbei um für Bakterien oder tierische Zellen optimierte Systeme handelte. Bioreaktoren für Niedere Pflanzen wie Algen bzw. Moos (Decker und Reski 2004) sind vorhanden, eine Fermentation von *Wolffia*-Pflanzen ist unter diesen Bedingungen jedoch nicht möglich. Ein Fermentationssystem für ganze Höhere Pflanzen wurde bis dato nicht entwickelt.

Sowohl das WaveTec-System (Kapitel 3.8.1) als auch der Osmotek-Fermenter (Kapitel 3.8.4) können anhand der vorliegenden Daten nicht für die getesteten *Wolffia*-Spezies empfohlen werden. Der Grund hierfür liegt u. U. im verwendeten Material begründet, das eine phytotoxische Wirkung auf die Pflanzen beinhalten könnte. Hinzu kommt eine überdurchschnittliche Versauerung des Mediums im Osmotek-Fermenter. Dies liegt vermutlich in der Begasung mit CO<sub>2</sub> und der damit verbundenen Carbonat-Entstehung begründet. Für meristematische Clustergewebe (und Embryonenkultur) von z. B. Orange, Kartoffel und Banane ist die sehr gute Eignung dieses Systems dokumentiert (Ziv *et al.* 1998). Auf *Wolffia spec.* kann diese Aussage nicht erweitert werden.

Der WaveTec-Fermenter verfügt über diverse Möglichkeiten zur sterilen Belüftung, Entnahme und Befüllung sowie über Monitoring-Schnittstellen und stellt ein vollständiges Kultursystem mit Möglichkeiten zum Upscale dar. Den generierten Daten zufolge kann dieses, für bakterielle Kulturen optimierte System, nicht zur Kultivierung von *Wolffia* herangezogen werden.



Die Wachstumsrate von *Wolffia* spec. in den atmungsaktiven Biobeuteln scheint stark vom gewählten Volumen anhängig zu sein, gleichbedeutend mit der Inokulumsmenge an Pflanzen. Auf kleinerem Volumen (50 ml) mit entsprechender Pflanzenmenge ist die Zuwachsrate deutlich höher als bei größeren Volumina. Eine Kompensation durch eine ausreichend große Starterkultur und optimale Konditionierungsverhältnissen ist demnach im Biobeutelsystem zumindest für *W. australiana* denkbar. Die Schweißnähte der Biobeutel waren zum Zeitpunkt der Versuche sehr anfällig und lösten sich schon bei geringem mechanischem Anspruch voneinander. Hier besteht noch Optimierungserfordernis von Seiten des Herstellers. Die Verwendung der atmungsaktiven Biofolie, welche als Meterware erhältlich ist, beinhaltet begrenzte Upscale-Möglichkeiten, die bei optimierter Schweißtechnik jedoch eine Alternative zur Kultivierung von transgenen *Wolffia*-Pflanzen bietet.

Zur Fermentation proteinproduzierender *Wolffia*-Pflanzen erscheint, obwohl nicht monitoringfähig, das MiniPerm-System geeignet. Für die Proteinaufreinigung sekretierender Pflanzen ist das System mit semipermeabler Membran, die eine Anreicherung der Proteinprodukte bei gleichmäßiger Nährstoffversorgung aus dem Versorgungsmodul gewährleistet, für den Labormaßstab zu empfehlen. Das HDC-50-Modul, welches ein Volumen von 50 ml Medium aufnehmen kann, ist für eine Kultivierung unter großtechnischen Gesichtspunkten momentan jedoch nicht konkurrenzfähig.

Der entworfene *Wolffia*-Fermenter JACES beinhaltet die *Wolffia*-spezifischen notwendigen Tools (Kapitel 1.8). Zur Optimierung bedarf es einer Reduzierung der Scherkräfte innerhalb des Produktionsmoduls, um die offensichtlich streßinduzierte mangelnde Wachstumsrate zu verbessern. Zusätzliche Studien sollten klären, ob sich unter fermentierenden Bedingungen das Verhalten transgener Pflanzen, welche durch den geplanten Einsatz eines konstitutiven Promotors u. U. stark physiologisch beansprucht werden, von dem des Wildtyps unterscheidet. Diese Ergebnisse sollten berücksichtigt werden, um letztlich das geeignete Fermentersystem identifizieren zu können.

Der Prototyp eines Airlift-*Wolffia*-Fermenters (Rechmann 2004) stellt einen vielversprechenden Bioreaktor für *W. australiana* dar. Daten bezüglich Wachstumsverhalten und Vitalität müssen zukünftig erhoben werden.

#### 4.5 Ausblick

Durch die Untersuchung verschiedener Parameter wie Kulturbedingungen, Wachstum, Transformationsmöglichkeit und Fermentation verschiedener Spezies sollte in der vorliegenden Arbeit eine Grundlage für *Wolffia* als Expressionssystem für pharmazeutisch relevante Proteine geschaffen werden. Nach Evaluierung von zwölf Spezies bzw. Klonen sind weiterführende Untersuchungen mit *W. australiana* und u. U. mit *W. brasiliensis* zu empfehlen. Für beide

Spezies ist die Möglichkeit einer stabilen Laborkultur als Voraussetzung für weitere Experimente gegeben. Genauso sind beide Pflanzen nachweislich transformierbar, was die Ergebnisse mit dem Gus-Reportersystem belegen. Für *W. australiana* konnte zudem der Nachweis der Gus-Aktivität auf Transkriptionsebene durch RT-PCR geführt werden (Kapitel 3.10.2).

Eine Optimierungsmöglichkeit für die Transformation könnten Pflanzen-Linien einer vorliegenden *Wolffia*-Kultur darstellen, die durch verschiedene Streß-Behandlungen (UV-Licht, Kälte etc.) generiert werden könnten. Durch dadurch ausgelöste zufällige Mutationen könnte die Transformierbarkeit u. U. erleichtert werden. Die schon diskutierte sehr hohe Diversität der Gattung *Wolffia* könnte ebenfalls einen Vorteil darstellen, da eine Population eines anderen Standortes mit hoher Wahrscheinlichkeit andere Spezifikationen aufweist. Die Arbeit mit einem gänzlich neuen Klon von z. B. *W. brasiliensis*, bei welchem noch keine Laborerfahrungen vorliegen, könnte jedoch einen neuerlichen Optimierungsaufwand bedeuten.

Im weiteren müssen nachfolgende Arbeiten mit *Wolffia* den Nachweis des Immuntoxins als Zielprotein zwingend fokussieren. Dies bedeutet, daß neben dem genomischen Nachweis auch bewiesen werden muß, daß die Transkription eines Immuntoxin-Gens keinem Silencing unterliegt und das Fusionsprotein funktional und somit toxisch ist. Zudem ist die erzeugte Menge Zielprotein zu evaluieren, die unter den bestehenden Expressionssystemen wie Tabak, *E. coli*, Hefen und Säugerzellen konkurrenzfähig sein muß. Ausgehend von ersten Proteinuntersuchungen (Kruse, pers. Mitteilung) wurde eine Zielproteinmenge für *W. australiana* von ca. 91 mg/kg FM errechnet. Mit der Annahme, daß der Gehalt des Zielproteins ca. 3 % des Gesamtproteingehalts ausmacht, ist dies ca. die dreifache Menge, die für Tabak bekannt ist und um ein Vielfaches mehr, als ein prokaryotisches System liefern könnte. Diese Annahme ist für *Wolffia* vor allem unter fermentierenden Bedingungen zu überprüfen. Der Prototyp eines *Wolffia*-Airlift-Bioreaktors bietet sich für weitere Untersuchungen zu Verhalten und Wachstum der Pflanzen unter fermentierenden Bedingungen an. Monitoring-Systeme zur Vitalitätsmessung wie das PAM-2000 oder das Meßprinzip des RAMOS wären mit diesem Fermenter vorstellbar. Das Biobeutel- und das MiniPerm-System sollten jedoch nicht aus den Augen verloren werden, denn sie bieten eine gute Alternativmöglichkeit als streßfreies Kultursystem für die *Wolffia*-Pflanzen. Die Vor- und Nachteile bezüglich der Proteinernte bleiben zu evaluieren.

Der Aspekt der Sterilität bzw. das Wissen um endogene Mikroorganismen in *Wolffia*-Pflanzen enthält Diskussionspotential. Es wird deutlich, daß an dieser Stelle Bedarf an Grundlagenforschung besteht. Die jüngsten Untersuchungen und Identifikationen von Mikroorganismen beziehen sich auf *W. australiana*. Eine zu klärende Frage bestünde daher darin, ob andere Pflanzen dieselbe mikrobielle Flora beinhalten oder ob artspezifisch andere Mikroorganismen anzutreffen wären. Auch der Charakter der Beziehung der Begleitflora zu den Wasserlinsen verbleibt eine interessante

Fragestellung. Untersuchungen hierzu und eine vollständige Identifikation der endogenen Keime durch 16S-rRNA-Sequenzierung könnten zukünftige Aufgaben sein. Für die Nutzung als Expressionssystem werden nachfolgende Arbeiten Aufschluß darüber geben müssen, ob das Zielprotein durch die Gegenwart der Mikroorganismen beeinträchtigt wird.

Um ein zukünftiges *Wolffia*-Expressionssystem im Hinblick auf die zu erfüllenden Kriterien, die das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte festlegt, und um die klinische Phase I zu sichern muß ein adäquates Konservierungssystem (z. B. Kryokonservierung) der transgenen Pflanzen evaluiert werden.

Die Erkenntnis, daß die Antibiotika-Wirkstoffgruppen wie Gyrasehemmer und Tetracycline nicht von *Wolffia* vertragen werden, legt die Idee nahe, diese Pflanzen als Monitoring-System für antibiotisch belastete Abwässer (z. B. Krankenhäuser, Kläranlagen, Güllegruben) zu nutzen. Daten über sämtliche Antibiotika aus allen Wirkstoffgruppen und ihre spezifischen Grenzkonzentrationen der Verträglichkeit müßten hierfür erhoben werden. Auch ist es denkbar, mit diesem Schwerpunkt bestehende Biosensorik-Tools wie Imaging-PAM oder Biacore zu benutzen bzw. zu erweitern.

Zusammenfassend tragen die Daten und Dokumentationen der vorliegenden Arbeit dazu bei, *Wolffia* als Expressionssystem für pharmazeutisch relevante Proteine voranzubringen und somit den innovativen Bereich des Molecular Pharmings zu bereichern.

## Zusammenfassung

Die Wasserlinse *Wolffia* spec. aus der Familie der *Lemnaceae* scheint hinsichtlich mehrerer Parameter als effektives pflanzliches Expressionssystem für Proteine geeignet zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden grundlegende Kulturdaten wie Medien, Labortauglichkeit, Biomassezuwachs, Vitalitätsmessung, Transformierbarkeit und Fermentationsparameter von zwölf *Wolffia*-Spezies bzw. Klonen evaluiert.

Klassische Sterilisationsverfahren wie Ethanol oder Wasserstoffperoxid sind in *Wolffia*-Kulturen nicht einsetzbar. Für die Dekontamination wurde ein Protokoll auf Antibiotikabasis entwickelt. Der chronologische Einsatz der antimikrobiellen Wirksubstanzen Amphotericin, Iprodion, Penicillin, Ampicillin, Ticarcillin/Clavulansäure, Vancomycin, Ofloxacin und Piperacillin führten zu *Wolffia*-Pflanzen, für die nachfolgenden Sterilitätstests negativ bewertet wurden. Toleranzen und Sensitivitäten gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika konnten für *Wolffia* spec. festgestellt werden, wobei die Pflanzenfitness einen zu berücksichtigenden Faktor darstellte. Hierfür wurde ein Bonitursystem entwickelt, welches erfolgreich mit den Werten des Fluoreszenzometers PAM-2000 (ausgedrückt im Yield-Wert) korreliert werden konnte. Andere Versuche, Vitalitätsdaten über eine bildgestützte Software (Scannalyzer) oder den Sauerstoffpartialdruck (CellScan) zu erheben, waren erfolglos bzw. erfordern weitere Optimierung. Zu einem späteren Zeitpunkt erwies sich das RAMOS als sensibles und geeignetes System, über die Sauerstofftransferrate den physiologischen Zustand einer *Wolffia*-Kultur wiederzugeben. Bezüglich der Tauglichkeit als Laborkultur wurden deutliche Unterschiede zwischen den getesteten *Wolffia*-Spezies gefunden. Einige Klone sind unter den festgesetzten Laborbedingungen nicht langfristig und arbeitsextensiv kultivierbar (*W. borealis*, *W. microscopica*, *W. angusta*, *W. neglecta*, *W. cylindracea*, *W. arrhiza* 8272 und 7193). Dagegen eignen sich die vorhandenen Klone von *W. columbiana*, *W. brasiliensis* und *W. australiana* für eine arbeitsextensive Langzeitkultivierung. Hervorzuheben hierbei ist *W. australiana*, die sich auch unter der Berücksichtigung der signifikanten jahreszeitlichen Rhythmik bezüglich der kontinuierlichen Biomasseproduktion (15,6 % Tageszuwachs auf SH-Medium bezogen auf 15 Tage) als zuverlässigste Laborkultur erwiesen hat. Generell kann für *W. australiana* eine Kultivierung in 100 ml flüssigem SH-Medium in mit Aluminiumfolie verschlossenen 250 ml-Erlenmeyerkolben, sowie auf Festmedium (SH + 2 % (w/v) Saccharose) empfohlen werden. Die allelopathischen Wechselwirkungen einer *Wolffia*-Kultur bedingen bei unbewegter Batch-Kultivierung eine eher zwei- als dreiwöchige Kultivierungszeit, um konstant hohe Zuwachsraten zu sichern.

Die Transformation von *Wolffia* via *Agrobacterium tumefaciens* hat sich als grundsätzlich geeignet herausgestellt. Die Methode der Agrobakterien-Injektion führte ohne Selektion zu transgenen *Wolffia*-Pflanzen (*W. brasiliensis*, *W. columbiana*, *W. cylindracea* und *W. australiana*), wobei fast ausschließlich Chimären festzustellen waren. Der Einsatz von Mazerozym, welches den Agrobakterien einen einfacheren Zugang in die Pflanzen ermöglichen sollte, kann nicht empfohlen werden. Die Pflanzen, die durch ein entwickeltes Protokoll selektiert wurden (*W. brasiliensis* und *W. columbiana* zwei Tage 100 µg/ml Hygromycin; *W. australiana* drei Tage 300 µg/ml Hygromycin), zeichneten sich durch einen niedrigeren Chimären-Anteil aus. Unter Selektionsdruck und Starklichtbedingungen (ca. 6400 lux) erfolgte eine Chlorose der Wildtypen deutlich schneller als unter Schwachlichtbedingungen (ca. 3500 lux). Für *W. columbiana* wurde dennoch die Selektion unter Schwachlichtbedingungen gewählt, da die Pflanzenfitness im Starklicht nicht aufrecht zu erhalten war. Bei der Entwicklung des Selektionsprotokolls wurde zudem den allelopathischen Wechselwirkungen einer zu selektierenden *Wolffia*-Kultur durch häufige Mediumswechsel Rechnung getragen.

Die Infiltration von Agrobakterien (GV 3101 pMP90/pCAMBIA 1301) resultierte in teilweise vollständig *gus*-transgenen *Wolffia*-Pflanzen (*W. brasiliensis* und *W. australiana*), welche durch X-Gluc-Färbung durch einen blauen Farbumschlag sichtbar wurden. Nach der Optimierung dieser Infiltrationsmethode konnte erstmals ein positives RT-PCR-Signal (*A. tumefaciens* C58/pCAMBIA 1301) in *W. australiana* nach elf Tagen Co-Kultivierung mit den Agrobakterien ohne Selektion detektiert werden. Die zugehörigen Proteindaten nach Bradford und des MUG-Assays sind ebenfalls dokumentiert worden und können als Leitparameter für zukünftige Experimente dienen. Im Vergleich mit der Agrobakterien-Injektion erreicht die Methode der Infiltration einen höheren Pflanzendurchsatz, und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit von Transformationsereignissen.

Um die Erzeugung von unerwünschten Chimären zu vermeiden, wurden verschiedene Kallus-Induktionsmedien evaluiert. Kallöse Strukturen von *W. australiana* konnten auf SHI-Medium induziert werden. Nach anfänglicher Proliferation gelang jedoch keine dauerhafte Erhaltung oder zuverlässige Regeneration. Ein Transformationsversuch kallöser Strukturen durch *gus*-transgenen Agrobakterien resultierte in einem blauen Farbumschlag nach X-Gluc-Färbung. Weitere Experimente hierzu und die Regeneration verbleiben als Objekt zukünftiger Forschung.

Nach der Evaluation verschiedener Fermentations-Systeme für *Wolffia* können der Waver und der begaste Osmotek-Fermenter ausgeschlossen werden. Zuverlässige Biomasseproduktion ist hingegen im Biobeutel-System sowie im MiniPerm möglich. Für beide Systeme sind weitere Optimierungen möglich, wobei ein besonderes Augenmerk auf das Upscaling gelegt werden muß. Der entwickelte IMBIO-Fermenter JACES erfüllt sowohl die Ansprüche submers lebender Pflanzen als auch arbeitsexensiver Kultivierung und diene als Grundlage für die Optimierung eines

vielversprechenden Airlift-Fermenters, für den zukünftig Wachstumsdaten für *Wolffia* erhoben werden müssen.

Basierend auf den Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit können folgende Ergebnisse zusammengefaßt werden:

- 1.) Für jeden der zwölf *Wolffia*-Stämme konnte ein geeignetes Kulturmedium evaluiert werden.
- 2.) *W. cylindracea* und *W. australiana* wurden als Spezies mit überdurchschnittlichem Wachstum identifiziert, wobei der Einfluß der jahreszeitlichen Rhythmik auf das Wachstum statistisch bestätigt werden konnte.
- 3.) Mit dem Fluoreszenzometer PAM-2000 kann schnell und zuverlässig der Vitalitätsstatus einer *Wolffia*-Kultur ermittelt werden.
- 4.) *W. australiana* empfiehlt sich als streßstabile Versuchspflanze.
- 5.) Basierend auf der Anwendung von Antibiotika konnte oberflächensteriles Pflanzenmaterial erzeugt und langfristig sowohl in Flüssig- als auch auf Festmedium erhalten werden. Die Rolle der z. T. identifizierten endogenen Mikroorganismen bleibt zu untersuchen.
- 6.) Nach Agrobakterien-Infiltration konnte das GUS-Gen (*gusA*) mittels RT-PCR in *W. australiana* nachgewiesen werden. Das entwickelte Selektionsprotokoll kann zur Detektion stabiler Transformanten dienen.
- 7.) Der entwickelte *Wolffia*-Fermenter JACES dient als Grundlage eines optimierten Airlift-Fermenters, der den Ansprüchen der *Wolffia*-Pflanzen gerecht wird, sowie die geforderten technischen Anforderungen erfüllt.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit evaluierten Daten konnten erste Expressionsdaten einer entwickelten Immuntoxinkassette, die das Toxin Angiogenin und die Bindemomäne RFT5 enthält (*A. tumefaciens* GV 3101 pMP90RK/pPAM SARK) in *W. australiana* (Becker, unpubl. Daten) zeigen, daß das Expressionssystem *Wolffia* das Potential für die Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine besitzt und somit eine innovative Alternative auf dem Gebiet des Molecular Pharmings darstellt.

**Literaturverzeichnis**

**Amberger A** (1996) Pflanzenernährung. Verlag Eugen Ulmer, 4. Aufl.

**Anh ND, Preston TR** (1997) Evaluation of protein quality in duckweed (*Lemna* ssp.) using a duckling growth assay. Livestock Research for Rural Development Vol: 9 No 2: 100

**Appenroth KJ** (1993) Die Vielwurzelige Teichlinse. Biologie in unserer Zeit /23. Jahrg./Nr.2: 102-107

**Appenroth KJ, Augsten H** (1996) Wasserlinsen und ihre Nutzung. Biologie in unserer Zeit 26: 187-194

**Appenroth KJ, Augsten H, Liebermann B, Feist H** (1982) Effects of Light Quality on Amino Acid Compositions of Proteins in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. using a Specially Modified Bradford Method. Biochem. Physiol. Pflanzen 177:251-258

**Appenroth KJ, Reimann R, Krok F und Szymonska J** (2002) Starch grain surface and starch degradation in turions of the duckweed *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae). Zywnosc Nauka Technologia Jakosc (Food Technology Quality). 4(33): 65-73

**Augsten H** (1984) Lemnaceen: Aspekte ihrer Praxisrelevanz. Biol. Research 22: 225-235

**Bakshi IS, Farooqi AHA, Maheshwari SC** (1979) Control of circadian rhythm in nitrate reductase activity in *Wolffia microscopica* Griff. Plant & Cell Physiology 20(5): 957-963

**Banga M, Slaa E, Bloom C, Voesnek L** (1996) Ethylen Biosynthesis and Accumulation under Drained and Submerged Conditions. Plant Physiology 112: 229-237

**Bhanthumnavin K, McGarry MG** (1971) *Wolffia arrhiza* as a possible source of inexpensive protein. Nature 232: 495

**Boehm R, Kruse C, Voeste D, Barth S, Schnabl H** (2001) A transient transformation system for duckweed (*Wolffia columbiana*) using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Journal of Applied Botany 75: 107-111

- Bowker DW, Duffield AN, Denny P** (1980) Methods for the isolation, sterilization and cultivation of *Lemnaceae*. *Freshwater Biology* 10: 385-388
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brain RA, Johnson DJ, Richards SM, Sanderson H, Sibley P, Solomon KR** (2004) Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day-renewal test. *Environ. Toxic. Chem.* Vol 23 Nr. 2: 371-382
- Chu CC, Wang CC, Sun SC, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY** (1975) Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 5:659-668
- Chumakov MI, Kurbanova IV, Solovova GK** (2002) Agrobacterial Transformation of Uninjured Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* Vol 49 No 6: 898-903
- Conrad U, Fiedler U** (1994) Expression of engineered antibodies in plant cells. *Plant Molec. Biol.* 26: 1023-1030
- Crawford DJ, Landolt E, Les DH, Kimball RT** (2001) Allozyme studies in *Lemnaceae*: Variation and relationship in *Lemna* sections *Alatae* and *Biformes*. *Taxon* 50: 987-999
- Crawley MJ, Hails RS, Rees M, Kohn D, Buxton J** (1993) Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363: 620-623
- Cully D, Epps E** (1973) Use of duckweed for waste treatment and animal feed. *Journal WPCF* 45: 337-347
- Cully D, Rejmánková E, Kvét J, Frye J** (1981) Production, Chemical Quality and Use of Duckweed (*Lemnaceae*) in Aquaculture, Waste Management and Animal Feed. *Journal of World Mariculture Society* 12: 27-49
- Decker EL, Reski R** (2004) The moss bioreactor. *Current Opinion in Plant Biology* Vol 7 No. 2: 166-170



- Diggins FW** (1999) The true history of the discovery of penicillin, with refutation of the misinformation in the literature. *Br J Biomed Sci.* 56(2): 83-93
- Doran PM** (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current Opinion in Biotechnology* 11:199-204
- Duong TP, Tiedje JM** (1985) Nitrogen fixation by naturally occurring duckweed-cyanobacterial associations. *Canadian Journal of Microbiology* Vol 31:327-330
- Elakovich SD, Wooten JW** (1989) Allelopathic Potential of Sixteen Aquatic and Wetland Plants. *J. Aquat. Plant Manage.* 27:78-84
- Fairchild JF, Ruessler DS, Haverland PS, Carlson AR** (1997) Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32: 353-357
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM** (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Op. in Plant Biol.* 7: 152-158
- Franck A, Guilley H, Jonard G, Richards K, Hirth L** (1980) Nucleotide Sequence of Cauliflower Mosaic Virus DNA. *Cell*, Vol. 21:285-294
- Frick H** (1994) Heterotrophy in the *Lemnaceae*. *J. Plant Physiol.* Vol. 144:189-193
- Fujita M, Mori K, Kodera T** (1999) Nutrient Removal and Starch Production through Cultivation of *Wolffia arrhiza*. *J. of Biosciences and Bioengineering* Vol. 87 Issue 2:194-198
- Gadaska JR, Spencer D, Dickey L** (2003) Advantages of Therapeutic Protein Production in the Aquatic Plant *Lemna*. [www.bioprocessingjournal.com](http://www.bioprocessingjournal.com)
- Glick BR** (1995) Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol. Adv.* 13: 247-261
- Gomord V, Faye L** (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 7: 171-181

- Hamid MA, Chowdhury SD, Razzak MA, Roy CR** (1993) Effects of Feeding an Aquatic Weed *Lemna trisulaca* as Partial Replacement of Fish Meal on the Performance of Growing Ducklings. J Sci Food Agric 61: 137-139
- Han XY, Andrade RA** (2005) *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones. J. of Antimicrobial Chemotherapy 155
- Hetzel C** (2005) Optimierung eines Sterilisationsprotokolls für *W. australiana* unter Berücksichtigung und Charakterisierung beteiligter Mikroorganismen. Diplomarbeit, IMBIO, Universität Bonn
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdis K** (1989) Production of antibodies in transgenic plants. Nature Vol 342: 76-78
- Hillman W, Cully D** (1978) The use of duckweed. American Scientist Volume 66: 442-451
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium Ti*-Plasmid. Nature 303: 179-180
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227: 1229-1231
- Huebert D, Dyck B, Shay J** (1993) The Effect of EDTA on the assessment of Cu toxicity in the submerged aquatic macrophyte *Lemna trisulca* L. Aquatic Toxicology 24: 183-194
- Hutner SH** (1953) Comparative physiology of heterotrophic growth. In Loomis WE (ed.): Growth and differentiation in plants. Iowa State Coll. Press 417-446
- ISO TC 147/SC 5N** (2001) Water quality-determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*)-Duckweed growth inhibition test
- Ito S, Nakamichi N, Matsushika A, Fujimori T, Yamashino T, Mizuno T** (2005) Molecular Dissection of the Promotor of the Light-Induced and Circadian-Controlled APRR9 Gene Encoding a Clock-Associated Component of *Arabidopsis thaliana*. Biosc. Biotechnol. Biochem. 69(2): 382-390

- Janssen J, Laatz W** (1999) Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows. 3. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907
- Key G, Uckelmann J, Katerkamp A, Schreiber S, Brinkmann U** (2001) CellScan: Ein innovatives Messsystem zur kontaktfreien Bestimmung der Zellvitalität. *BIOforum* 10: 670-671
- Kirchner G, Kinslow CJ, Bloom GC, Taylor DW** (1993) Nonlethal Assay System of  $\beta$ -Glucuronidase Activity in Transgenic Tobacco Roots. *Plant Molecular Biology Reporter* 11(4): 320-325
- Kruse C, Boehm R, Voeste D, Barth S, Schnabl H** (2002) Transient transformation of *Wolffia columbiana* by particle bombardment. *Aquatic Botany* 72:175-181
- Landolt E** (1986) The family of *Lemnaceae*-a monographic study. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der eidg. techn. Hochschule, Stiftung Rübél, Zürich Vol 1: Heft 71
- Landolt E** (1992) *Wolffiella caudata*, a new *Lemnaceae* species from the Bolivian Amazon region. *Ber. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübél, Zürich* 58: 121-123
- Landolt E** (1994) Taxonomy and Ecology of the Section *Wolffia* of the Genus *Wolffia* (*Lemnaceae*). *Ber. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübél, Zürich* 60: 137-151
- Landolt E** (1997) How do *Lemnaceae* (duckweed family) survive dry conditions? *Bulletin of the Geobotanical Institute ETH* 63: 25-31
- Landolt E** (1998) *Lemna yungensis*, a new duckweed species from rocks of the Andean Yungas in Bolivia. *Bulletin of the Geobotanical Institute ETH* 64: 15-21
- Landolt E** (1999) Pleustonic communities with *Lemnaceae* in South America. *Applied Vegetation Science* 2: 7-16

- Landolt E, Kandeler R** (1987) The family of Lemnaceae-a monographic study. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der eidg. techn. Hochschule, Stiftung Rübel, in Zürich Vol 2: Heft 95
- Les DH, Crawford DJ, Landolt E, Gabel JD, Kimball RT** (2002) Phylogeny and Systematics of *Lemnaceae*, the Duckweed Family. Systematic Botany 27(2): 221-240
- Li J, Jain M, Vunsh R, Vishnevetsky J, Hanania U, Flaishman M, Perl A, Edelman M** (2004) Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*. Plant Cell Report Vol 22, Part 7: 457-464
- Lin JJ, Assad-Garcia N, Kuo J** (1995) Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cells. Plant Science 109:171-177
- Lloyd G, McCown B** (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tipculture. Int. Plant Propagation Soc Proc 30: 421-427
- Ma J, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang FW, Stabila P, van Dollerweerd C, Mostov K, Lehner T** (1995) Generation and Assembly of Secretory Antibodies in Plants. Science Vol. 268: 716-719
- Maliga P, Graham I** (2004) Plant biotechnology molecular farming and metabolic engineering promise a new generation of high-tech crops. Curr. Opin. in Plant Biol. 7: 149-151
- Marschner H** (2003) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, 6. Aufl.
- Mayfield SP, Franklin SE** (2005) Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae. Vaccine 23(15): 1828-1832
- Meister K, Liebert HP** (2000) Einfluß wässriger Extrakte von Uferpflanzen einer Talsperre auf das Wachstum und die Elementzusammensetzung von Lemnaceen. Journal of Applied Botany 74: 164-167
- Monecke S, Wollnik F** (2005) Seasonal variations in circadian rhythms coincide with a phase of sensitivity to short photoperiods in the European Hamster. J. Comp. Physiol. Im Druck

- Moon HK, Stomp AM** (1997) Effects of medium components and light on callus induction, growth and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed). In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33:20-25
- Munk K** (2001) Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer
- Murakami M, Matsushika A, Ashikari M, Yamashino T, Mizuno T** (2005) Circadian-Associated Rice Pseudo Response Regulators (OsPRRs): Insight into the Control of Flowering Time. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 69(2): 410-414
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497
- Neumann KH** (1995) Pflanzliche Zell- und Gewebekultur. UTB, Verlag Eugen Ulmer
- Purrington CB, Bergelson J** (1997) Fitness Consequences of Genetically Engineered Herbicide and Antibiotic Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 145: 807-814
- Rechmann H** (2004) Evaluierung verschiedener Wachstumsparameter zur Konstruktion eines Airlift-Fermenters für *Wolffia australiana*. Diplomarbeit an der Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
- Roberts CS, Rajagopal S, Smith LA, Nguyen TA, Yang W, Nugroho S, Ravi KS, Cao M-L, Vijayachandra P, Patell V, Harcourt RL, Dransfield L, Desamero N, Slamet I, Keese P, Kilian A, Jefferson RA** (1998) A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulation and efficient transformation of plants by both *Agrobacterium* and direct DNA uptake methods. PCAMBIA Vectors release manual version 3.05
- Rodriguez-Saiz M, Diez B, Barredo JL** (2005) Why did Fleming strains fail in penicillin industry? *Fungal Genet Biol.* 42(5): 464-470
- Rong L, Karcher SJ, O'Neil K, Hawes MC, Yerkes CD, Jayaswal RK, Hallberg CA, Gelvin SB** (1990) *picA*, a novel plant-inducible locus on the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome. *J. of Bacteriol.* Vol. 172 No. 10: 5828-5836
- Roux F, Gasquez J, Reboud X** (2004) The Dominance of the Herbicide Resistance Cost in Several *Arabidopsis thaliana* Mutant Lines. *Genetics* 166: 449-460

- Rusoff L, Blakeney E, Cully D** (1980) Duckweed (*Lemnaceae* family): A Potential Source of Protein and Amino Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28: 848-850
- Saks Y, Negbi M, Ilan I** (1980) Involvement of the native abscisic acid in the regulation of onset of dormancy in *Spirodela polyrrhiza*. *Austr. J. Plant. Physiology* 7: 73-70
- Sambrook J, Russell DW** (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Schenk RU, Hildebrandt AC** (1971) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50:199-204
- Schillberg S, Henke M, Fischer R** (2000) Produktion rekombinanter Proteine durch „Molekulares Farming“. *BioTec* 5: 18-20
- Schlegel HG** (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C** (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze E-D and Caldwell MM (eds) *Ecophysiology of Photosynthesis*, Vol 100, pp 49-70
- Segers P, Vancanneyt M, Pot B, Torck U, Hoste B, Dewettinck D, Falsen E, Kersters K, De Vos P** (1994) Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Bushing, Doll and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int. J. of Syst. Bacteriol* 44: 499-510
- Starcher B** (2001) A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Analytical Biochemistry* 292: 125-129
- Stefaniak B, Wozny A, Budna I** (2002) Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L.. *Biologia Plantarum* 45 (3): 469-472

- Steinbiß HH** (1995) *Transgene Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag
- Stoger E, Perrin Y** (2003) *Molecular Farming*.  
<http://www.jic.bbsrc.ac.uk/science/molbio/antibodies.htm>
- Stoger E, Ma JK, Fischer R, Christou P** (2005) Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr Opin Biotechnol.* 16(2): 167-73
- Tian D, Traw MB, Chen JQ, Kreitman M, Bergelson J** (2003) Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 423: 74-77
- Van Tassel DL, O'Neill SD** (2001) Putative regulatory molecules in plants: evaluating melatonin. *J Pineal Res.* 31(1): 1-7
- Vaughan D, Baker RG** (1994) Influence of nutrient on the development of gibbosity in fronds of the duckweed *Lemna gibba* L. *Journal of Experimental Botany* Vol 45 No 270:129-133
- Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, van Montagu M, Schell J** (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacteria* strains. *J. gen. Virol.* 26: 33-48
- Weisburg WG, Brans SM, Pelletier DA, Lane DJ** (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Studies. *J. of Bacteriol.* Vol 173(2): 697-703
- Wolek J** (1997) Species co-occurrence patterns in pleustonic plant communities (class *Lemnatea*). Are there assembly rules governing pleustonic community assembly? *Fragm. Flor. Geobot. Suppl.:* 53-100
- [www.fisheries.nsw.gov.au/aqu/extension/Ozone.htm](http://www.fisheries.nsw.gov.au/aqu/extension/Ozone.htm)
- [www.lemnatec.de](http://www.lemnatec.de)
- [www.mobot.org/jwcross/duckweed-measuring-growth.htm](http://www.mobot.org/jwcross/duckweed-measuring-growth.htm)
- [www.osmotec.com](http://www.osmotec.com)
- [www.ppm4plant-tc.com](http://www.ppm4plant-tc.com)

[www.wavetec.ch](http://www.wavetec.ch)

**Yamamoto YT, Rajbhandari N, Lin X, Bergmann BA, Nishimura Y, Stomp AM (2001)**

Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plants* 37:349-353

**Ying T, Merrow M, Roenneberg T (2004)** Photoperiodism in *Neurospora crassae*. *J. of*

*Biological Rhythms* Vol. 19 No. 2: 135-143

**Ziv M, Ronen G, Raviv M (1998)** Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized

plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plants* 34: 152-158



## **Danksagung**

Die Daten dieser Dissertation wurden am Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn erhoben. Das Projekt wurde gefördert durch das Ministerium für Wissenschaft und Forschung NRW (Projekt Nr.: 17 629).

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Heide Schnabl für die Überlassung des Themas und Prof. Dr. Heinrich-Wilhelm Scherer für die Übernahme des Co-Prüferamtes.

Des weiteren danke ich Dr. Cordula Kruse und allen anderen „Wolffies“, die mich während meiner Zeit der Diss durch Höhen und Tiefen begleitet haben und die unendlich dazu beigetragen haben, auch in meinen Talsohlen Motivation und Spaß aufrecht zu halten. Allen Mitarbeitern, Kollegen, Auszubildenden und Studenten danke ich für die Diskussionen, (Kurs-) Korrekturen, Einblicke, Denkanstöße, neue Sichtweisen und die vielen Mosaiksteinchen.

Ein besonders großes Dankeschön an Cordula, Steffi, Bettina, Claudio, Ninetta und Torsten für eure wertvollen Vorschläge, Mühe und für eure Zeit!

Nicht vergessen werden dürfen:

Dr. Andreas Katerkamp, Dr. Göran Kay und Uwe Brinkmann (ICB/Münster).

Dr. Ulf Barsnik (Lemnatec/Würselen), Christian Paschen mit seinem Watson-Marlow-Team für die tolle und unkomplizierte Zusammenarbeit und Frau Frechen und Frau Brüssel (Uni Bonn) für die freundliche Hilfe bei der Schlacht um die Bakterien.

Danke!

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, deren Unterstützung ich als unerschrockene Selbstverständlichkeit erfahren habe, meiner Familie für „zu Hause“ und den Menschen, ohne die alles sinnentleert wäre: meinen Freunden.

Danke auch an Michael für die Geduld, Unterstützung und die Ruhe...