

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Somatische Embryogenese	1
1.2	Somatische Embryogenese bei <i>Euphorbia pulcherrima</i>	2
1.3	Konditionierung des Kulturmediums durch extrazelluläre Proteine	4
1.4	Zielsetzung	6
2	Literaturübersicht	8
2.1	Embryogene Kompetenz	8
2.2	Konditionierung des Mediums durch Proteine und Glykoproteine	9
2.3	Intrazelluläre Glykoproteine	13
3	Material und Methoden	15
3.1	Pflanzenmaterial	15
3.2	Sterilisation des Arbeitsmaterials und der Nährlösung	15
3.3	Sterilisation des Pflanzenmaterials	15
3.4	Kulturführung	15
3.4.1	Präparation von Sproßspitzen vegetativ wachsender Gewächshauspflanzen	16
3.4.2	Präparation von Hypokotylsegmenten (Standardmethode)	16
3.4.3	Fraktionierung der Hypokotylsegmente	17
3.4.4	Herstellung embryogener Kalluskulturen	18
3.4.5	Herstellung embryogener Suspensionskulturen	20
3.4.6	Kultivierung einer nicht-embryogenen Suspension	21
3.4.7	Etablierung einer nicht-embryogenen Suspension	21
3.5	Kulturbedingungen im Bioreaktor	22
3.6	Kulturverlauf der Suspensionskulturen	22
3.6.1	Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts	23
3.6.2	Bestimmung des PCV	23
3.6.3	Bestimmung der Vitalität	23
3.6.4	Bestimmung der Anzahl somatischer Embryonen	24
3.7	Probennahme und Aufarbeitung	24
3.7.1	Gewinnung des konditionierten Mediums	24
3.7.2	Aufarbeitung des Mediums für die Analysen	25
3.8	Proteinbestimmung	26
3.9	Glykoprotein-Quantifizierung	27
3.10	Enzymaktivitätsbestimmungen	28
3.10.1	Bestimmung der Peroxidase-Aktivität	28
3.10.2	Bestimmung der β -Glucosidase-Aktivität	29
3.11	Elektrophoretische Proteintrennung	30
3.11.1	Disk-Elektrophorese in Röhrchengelen	30
3.11.2	Das PhastSystem	31
3.11.2.1	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	32
3.11.3	Anfärbung der Peroxidasen	35
3.12	Blotverfahren	35

3.13	Glykoproteinanalyse	36
3.13.1	Differenzierung der Glykoproteine über Lektinspezifitäten	36
3.13.2	Nachweis von Glykoproteinen im Gel	38
3.14	Affinitätschromatografie	38
3.15	Mikrokultursystem	41
3.15.1	Optimierung der Kulturparameter im Mikrokultursystem	41
3.15.2	Zugabe definierter Protein- und Glykoproteinfraktionen	42
3.16	Statistische Auswertung	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Anlage und Charakterisierung embryogener und nicht-embryogener Kulturen	44
4.1.1	Einfluß des Explantattyps auf Wachstum und Embryogenität von Kalluskulturen	44
4.1.1.1	Einfluß unterschiedlicher Verfestigungsmittel auf das Wachstum der Kalli und auf die Bildung von Embryonen	46
4.1.2	Einfluß des Explantattyps auf Wachstum und Embryogenität von Suspensionskulturen	50
4.1.2.1	Vergleich nicht-embryogener Suspensionen unterschiedlicher Zelllinien	50
4.1.2.2	Vergleich embryogener und nicht-embryogener Suspensionen etabliert aus unterschiedlichen Explantattypen	52
4.1.2.3	Beeinflussung von Wachstum und Embryogenität der Suspensionskulturen durch die Kallusvorkultur	57
4.1.3	Vergleich embryogener und nicht-embryogener Suspensionskulturen im Bioreaktor	59
4.1.4	Einfluß des konditionierten Mediums auf Wachstum und Embryogenität von Kallus- und Suspensionskulturen	61
4.1.4.1	Kalluskulturen	61
4.1.4.2	Suspensionskulturen	64
4.2	Komponenten im konditionierten Medium embryogener und nicht-embryogener Suspensionskulturen	66
4.2.1	Extrazelluläre Proteine	66
4.2.2	Extrazelluläre Peroxidasen	68
4.2.3	Vergleich der intra- und extrazellulären Proteinkonzentrationen und der Peroxidase-Aktivität	70
4.2.4	Extrazelluläre β -Glucosidase-Aktivität	71
4.2.5	Extrazelluläre Glykoproteine	73
4.2.6	Isolierung Con A-spezifischer Glykoproteine	77
4.3	Protein- und Glykoproteinbandenmuster im Medium embryogener und nicht-embryogener Suspensionen	81
4.3.1	Methodische Vorversuche	81
4.3.1.1	Computer-gestützte Auswertung der Elektrophorese-Gele	81
4.3.2	Extrazelluläre Proteine	84
4.3.3	Extrazelluläre Con A-spezifische Glykoproteine	93
4.3.4	Extrazelluläre nicht Con A-spezifische Proteine	103

4.4	Etablierung eines Mikrokultursystems zur Analyse regulatorisch wirksamer Komponenten aus dem konditionierten Medium	107
4.4.1	Optimierung der Kulturparameter im Mikrokultursystem	108
4.4.2	Einfluß extrazellulärer Glykoprotein- und Proteinfaktionen auf die Weiterentwicklung globulärer Stadien aus embryogenen Suspensionen	112
5	Diskussion	119
5.1	Embryogenität und Wuchsform von Kallus- und Suspensionskulturen in Abhängigkeit vom verwendeten Explantattyp	119
5.1.1	Einfluß des Geliermittels auf Wachstum und Embryogenität der Kalluskulturen	121
5.1.2	Einfluß des Geliermittels auf Wachstum und Embryogenität der Suspensionskulturen	122
5.1.3	Einfluß von konditioniertem Medium auf Wachstum und Embryogenität von Kallus- und Suspensionskulturen	126
5.2	Komponenten im konditionierten Medium embryogener und nicht-embryogener Suspensionskulturen	129
5.2.1	Extrazelluläre Proteine	129
5.2.2	Extrazelluläre Peroxidase-Aktivität	130
5.2.3	Extrazelluläre β -Glucosidase Aktivität	131
5.2.4	Extrazelluläre Proteine und Glykoproteine in embryogenen und nicht-embryogenen Suspensionen in Abhängigkeit vom Explantattyp	132
5.3	Einfluß extrazellulärer Glykoprotein- und Proteinfaktionen auf die Weiterentwicklung globulärer Embryonen aus embryogenen Suspensionen von <i>Euphorbia pulcherrima</i>	137
6	Zusammenfassung	143
7	Literaturverzeichnis	145
8	Abkürzungsverzeichnis	157
9	Anhang	160
9.1	Bandenmuster nach IEF und Silberfärbung.	160
9.2	Densitogramme	166
9.3	Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962)	175