universität wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

In vitro-Vermehrung der tibetischen Arzneipflanze *Lancea tibetica* Hook. F. & Thomson

verfasst von / submitted by

Nhu Le

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree programme code as it appears on the student record sheet:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt / degree programme as it appears on the student record sheet:	Diplomstudium Pharmazie
Betreut von / Supervisor:	Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp

Danksagung

Allen voran möchte ich meiner Betreuerin Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie die fachlichen Ratschläge und die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Herrn Ass. Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch danke ich besonders dafür, dass er mir bei der praktischen Arbeit zur Seite stand und mir stets seine Hilfe und Diskussionsbereitschaft anbot.

Für die Einschulung in die sterilen Arbeitstechniken, die Bedienung der Laborgeräte und die technische Hilfe möchte ich mich auch bei Herrn Mag. Florian Gössnitzer bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich hier auch bei meinen Eltern für ihre Liebe, ihre Erziehung und ihren bedingungslosen Beistand bedanken. Auch ein großer Dank an meinen Gatten, der mich stets motivierte und mich während der Ausbildung bei der Betreuung unseres Sohnes immer unterstützte.

Abkürzungen

LAN	Lantibesid
SYL	Sylvatesmin
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration
KIN	Kinetin (6-Furfurylaminopurin)
BAP	6-Benzylaminopurin
IBA	ß-Indolylbuttersäure
IAA	ß-Indolessigsäure
2-iP	N6-2-isopentenylaminopurin
MS, Voll-MS	Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962)
½ -MS	Nährmedium nach Murashige und Skoog mit halber Konzentration an Makroelementen
¼ -MS	Nährmedium nach Murashige und Skoog mit geviertelter Konzentration an Makroelementen
MS 3	Voll-MS + 1 µM Kinetin
MS 4	½ -MS + 1 µM Kinetin
MS 5	¼ -MS + 1 µM Kinetin
NAA	α-Naphthylessigsäure
BA	Benzyladenin
µM	Mikromol

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung 1

2. Material und Methoden 5

2.1. Pflanzenmaterial 5

2.2. Nährmedien 7

2.3. Kulturbedingungen 9

2.4. Auswertungskriterien 10

3. Ergebnisse 13

3.1. Einfluss des Explantats auf Wachstum und Vermehrung 13

3.2. Einfluss der Temperatur auf Wachstum und Vermehrung 17

3.3. Einfluss der Ionenstärke auf Wachstum und Vermehrung 24

3.4. Einfluss der Cytokinine auf Wachstum und Vermehrung 30

3.4.1. 6-Benzylaminopurin (BAP) 30

3.4.2. Zeatin (ZEA) 34

3.4.3. BAP und ZEA im Vergleich 43

3.5. Vorversuche zur Bewurzelung von Sprossen mit ß-Indolylbuttersäure (IBA) 46

4. Diskussion 53

5. Zusammenfassung 59

6. Summary 60

7. Literaturverzeichnis 61

1. Einleitung und Problemstellung

Lancea tibetica HOOK. f. et THOMS gehört zur Familie der Mazaceae und der Ordnung der lippenblütlerartigen Lamiales. Diese Pflanzenart wurde nach J. H. Lance vom bengalischen Zivildienst Myambayar benannt, der die Pflanzen in Kashmir, Dras, Ladakh und Spiti im Jahr 1849 entdeckte. *Lancea tibetica* ist eine ausdauernde kleine Rosettenpflanze mit zarten, fedrigen, ca. 2 bis 7 cm großen lanzettförmigen Blättern, wie in Abbildung 1 dargestellt. Die Rosette ist meist aus 6 – 10 Blättern zusammengesetzt, die Blätter sind mit Ausnahme des Blattstiels unbehaart. Die etwa 2 cm großen violetten Blüten (Blütezeit Mai bis August) sind meist stängellos oder sitzen manchmal an bis zu 2 cm langen Stängeln. Die Blüte (Abb. 2) ist doppellippig mit violett punktiertem, haarigem gelbem Kelch, die Oberlippe zeigt blasse Flecken und Doppelläppchen und unterscheidet sich von der breiteren drei-läppigen Unterlippe (Kletter und Kriechbaum, 2001).

Abb. 1: Habitus von *Lancea tibetica* (Bildquelle: http://www.shamanaustralis.com/forum/index.php?showtopic=33542)

Abb. 2: *Lancea tibetica* mit Blüten am natürlichen Standort (Bildquelle:http://www.youduo.com/forum/leadbbsfile/upload/2006/09/08/123332.jpg)

Lancea tibetica ist in den asiatischen Ländern des Himalaya Gebirgssystems (Ladakh bis Bhutan, tibetisches Hochland, Westchina, Indien und Mongolei) beheimatet, die kleine Pflanze wächst in Höhen von 3000 bis 4800 Metern. Als Standort bevorzugt sie einerseits feuchte Standorte wie Moore, Sümpfe, Fluss- und Seeufer, andererseits auch lichte Wälder und Naturweiden (Kletter und Kriechbaum, 2001)

Traditionelle Anwendungen

Eine sehr große Bedeutung hat *Lancea tibetica* vor allem in der traditionellen Medizin Tibets und Chinas (Liu et al., 2015; Kletter und Kriechbaum, 2001). Als tibetisches Heilmittel wird die ganze Pflanze in Form der Krautdroge verwendet.

Aufgrund der kühlenden Wirkung werden vor allem die Blätter zur innerlichen und äußerlichen Wundheilung herangezogen. Auch für weitere Indikationen wie Schüttelfrost, eitrigen Sputum und faulig riechenden Atem wird sie eingesetzt. Die aus den Wurzeln gewonnene Droge kann zur Behandlung von Lungenerkrankungen verwendet werden, um den Auswurf von angereicherten Sekreten im Respirationstrakt zu fördern (Kletter und Kriechbaum, 2001). Man findet auch Wurzeln in gerösteter Form, welche in Ladakh (Indien) zusammen mit Tabak (*Nicotiana tabacum*) geraucht oder pulverisiert, in Milch suspendiert getrunken werden, um einen anregenden stimulierenden Effekt hervorzurufen (Rätsch, 2012). Im Verbreitungsgebiet spielt *L. tibetica* als traditionelle Heilpflanze eine wichtige Rolle. Im Rahmen einer Studie (Witt et al., 2009) wurden in Tibet angewandte Heilpflanzen dahin gehend evaluiert, welche verschiedene Krankheitssymptome nach ihrer Häufigkeit auftraten und wie die Verschreibungsquote von insgesamt 138 untersuchten Heilpflanzen aussah, mit denen kranke Menschen in Sikkim und Nepal behandelt wurden. Die Arbeitsgruppe kam zum Ergebnis, dass *L. tibetica* in 9,2 % aller verordneten Zubereitungen der Tibetischen Traditionellen Medizin enthalten war. Dazu wurde näher erläutert, dass die von tibetischen Ärzten verwendeten Zubereitungen als Fertigprodukte meistens aus Apotheken und von Pharmafirmen in Indien und Nepal stammen. Die Beschaffung des Pflanzenmaterials für die Arzneimittelherstellung erfolgt vorwiegend durch tibetische Ärzte, Medizinstudenten oder durch Einheimische, die ein Fachwissen über das Vorkommen und die botanischen Merkmale vieler traditioneller Medizinalpflanzen besitzen. Nach der Wildsammlung werden die Drogen weiter an die großen Manufakturen verkauft. Die Traditionelle Tibetische Medizin wird seit über 1200 Jahren praktiziert. Heute wird sie hauptsächlich in asiatischen Ländern (Nepal, Bhutan, Mongolei und Indien) angewandt. In China zeigt sich tendenziell eine zunehmende Nachfrage, was dazu führen könnte, dass auch in Europa der Bedarf an den entsprechenden Heilmitteln steigen wird (Witt et al., 2009). Im Allgemeinen bedeutet dies, dass traditionelle Medizinalpflanzen vermehrt benötigt bzw. sie zunehmend aus dem Wildvorkommen dezimiert werden. Die bereits eintretende Abnahme natürlicher Bestände von *Lancea tibetica* ist ein deutliches Zeichen steigender Nachfrage und wachsender Bedrohung ihres natürlichen Vorkommens (Tian et al., 2016).

Inhaltsstoffe und pharmakologische Wirkungen

In China wurden die Wirkstoffe von *Lancea tibetica* bereits erforscht, angefangen mit der Isolierung des Lignans Lantibesid (Zheng et al., 1985) gefolgt von der Entdeckung eines Lignanglycosids, welches Tibeticosid A benannt wurde (Su et al., 1998). Weiters wurden Studien hinsichtlich der Radikalfängereigenschaft der

Lignane Sylvatesmin (SYL) und Lantibesid (LAN) unternommen (Miao et al., 2004). Diese Verbindungen sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut und unterscheiden sich nur in ihrer Polarität. Mit einer freien Hydroxylgruppe weist SYL eine stärker antioxidative Wirkung auf als das glycosylierte LAN. Li et al. (2008) berichteten von dem Einsatz dieser traditionellen tibetischen Medizinalpflanzen sowohl zur Prävention als auch zur Behandlung von Leukämie, Herzerkrankungen, Angina intestinalis und Husten. Im Rahmen ihrer Untersuchung konnte die Antitumorwirkung der Furofuranolignane Lantibesid B, C und D sowie Lantibetin festgestellt werden. Lantibesid C (IC_{50} = 61 µM) und Lantibesid D (IC_{50} = 99 µM) zeigten an HL-60-Blutzellen schwache Cytotoxizität. Eine starke antitumorale Aktivität wiesen Verbascosid und Isoverbascosid in einer pharmakologischen Studie von Su et al. (1999) auf. Auch die hemmende Wirkung von LAN und SYL auf drei Tumorzelllinien (humane Hepatomazellen, HeLa-Zellen, B 13-Zellen von Mäusen) wurde getestet, wobei die höchst effektive Antitumorwirkung von SYL besonders auf die B 16-Zellen erwähnenswert ist. Zur Quantifizierung der Inhaltsstoffe wurde eine HPLC-Methode entwickelt, welche die Bestimmung von 9 Lignanen und dem Phenylpropanglycosid Verbascosid erlaubt (Song et al., 2011).

Problemstellung

Pflanzliche Arzneimitteln haben in Asien nach wie vor eine wesentliche Bedeutung in der medizinischen Versorgung der Bevölkerung. Da ein Großteil dieser Arzneipflanzen aus ihrem Wildvorkommen entnommen wird, führt dies bei stetig steigender Nachfrage zu einer unaufhaltsamen Abnahme ihres Bestandes. Dadurch sind immer mehr Spezies in ihrem natürlichen Lebensraum gefährdet. Weitere Ursachen wie menschliche oder umweltbedingte Einflüsse (vermehrte Besiedlung, Anbauflächen für Nutzpflanzen, Überweidung durch Tierhaltung in Feuchtgebieten, Heugewinnung, lang anhaltende Dürre, Umweltverschmutzung, ect.) führen zu unwiderruflichem Verlust von Lebensräumen wildwachsender Heilpflanzen (Nyambayar et al. 2011). Durch unkontrollierte Übersammlung wurden bereits viele Populationen von *Lancea tibetica* zerstört (Tian et al., 2016). Als Lösung für diese Problematik käme grundsätzlich die Feldkultur in Frage. Die Bereitstellung von Setzlingen kann dabei über konventionelle Vermehrung, je nach Art über Samen oder Stecklinge, erfolgen, die klonale vegetative Vermehrung in vitro bietet allerdings einige Vorteile. Nach in vitro Massenvermehrung, Bewurzelung und Akklimatisierung werden solcherart gewonnene Setzlinge ins Glashaus und anschliessend ins Freiland transferiert. Durch das Klonieren von selektionierten Ausgangspflanzen kann in vergleichsweise kurzer Zeit letztlich ein hochwertiges Drogenmaterial mit definiertem Wirkstoffgehalt gewonnen werden (Heß, 2008; Lou

und Gould, 1999). Neben anderen Maßnahmen des Naturschutzes bietet die Kombination von Methoden der pflanzlichen Gewebekultur mit weiterführender Feldkultur vielversprechende Möglichkeiten, die Gefahr der Ausrottung wertvoller Heilpflanzen wie beispielsweise *Lancea tibetica* abzuwenden und die biologischen Ressourcen zu erhalten.

Die vorliegende Arbeit sollte sich mit Untersuchungen zur Mikrovermehrung von *Lancea tibetica* befassen. Hierzu sollte einerseits die Eignung der Cytokinine 6-Benzylaminopurin (BAP) und Zeatin (ZEA) für die Sprossvermehrung überprüft werden. Andererseits sollte auch der Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums, der Art des Explantats sowie der Kultivierungstemperatur untersucht werden. Ausserdem sollten auch Vorversuche zur Bewurzelung von in vitro-vermehrten Sprossen mit dem Auxin ß-Indolylbuttersäure (IBA) geprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Für die vorliegende Arbeit standen verschiedene Klonlinien zur Verfügung, die von Frau Dr. Davaakhuu Gaamaa (National University of Mongolia, School of Chemistry and Chemical Engineering) aus Samen etabliert worden waren und auf MS-Medium (Murashige und Skoog 1962) mit 1 µM Kinetin kultiviert wurden. Für unsere Versuche wählten wir drei Klone aus, die sehr gutes Wachstum zeigten und von denen genügend Kulturen für die Präparation von Nodien und Sprossspitzen zur Verfügung standen. Für jede Versuchsserie wurden 120 Nodienexplantate zur Testung der beiden Cytokinine BAP und ZEA und 45 Sprossspitzenexplantate zur Testung des Auxins IBA aus demselben Pflanzenklon benötigt (Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht der eingesetzten Klone von *L. tibetica.* Hauptversuchsreihe zur Prüfung der Cytokine BAP, ZEA und IBA auf ihre Eignung

Bezeichnung der Klonlinien	**Anzahl der Nodienexplante für BAP-Versuche**	**Anzahl der Nodienexplantate für ZEA-Versuche**	**Anzahl der Sprossspitzen für IBA-Versuch**
5b	60 Nodien	60 Nodien	45 Sprossspitzen
2c	60 Nodien	60 Nodien	45 Sprossspitzen
9b	60 Nodien	60 Nodien	45 Sprossspitzen

Die Präparation und Übertragung von Explantaten auf das Nährmedium erfolgte unter steriler Umgebung unter einer Laminar Flow Bank. Nach Vereinzeln der Sprosse von etwa 7 Wochen alten Stammkulturen (Abb. 3, S. 6) und Entfernen der Blätter erfolgte die Zerteilung der verdickten Stengelbereiche an der Stelle des Blattansatzes in ca. 1 cm lange Segmente (Nodienexplantate, siehe Abb. 4, S. 6) sowie die Präparation von etwa 1,5 cm langen Sprossspitzen (Abb. 5, S. 6). Ein Kulturgefäß wurde immer mit 3 Explantaten beimpft, wobei darauf zu achten war, dass sich das Nodium jedes Explantates über der Oberfläche des Nährmediums befand.

Abb. 3:
7 Wochen alte Stammkultur von *L. tibetica*

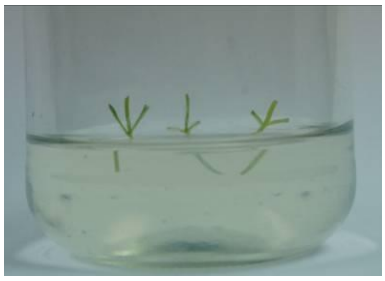


Abb. 4:
Nodienexplantate auf cytokininhältigem Nährboden

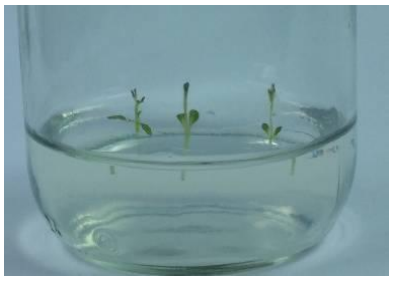


Abb. 5:
Sprossspitzenexplantate auf auxinhältigem Nährboden

Die Fragestellung, ob sich die Art des Explantats auf das Vermehrungspotential auswirkt, wurde an Klon 11b untersucht (Tab. 2). Parallel zu unseren Versuchen mit Sprossexplantaten untersuchte Osmen (2015) die Eignung von Nodienexplantaten und stellte ihre Ergebnisse für einen Vergleich zur Verfügung.

Tabelle 2: Übersicht des Vorversuchs zum Einfluss des Explantattyps auf Wachstum und Vermehrung (Nährmedien: siehe Tab. 6, S. 8)

Klonlinie	**Explantattyp**	**Nährmedien**
11b	45 Sprosse	MS 3, MS 4, MS 5
11b	45 Nodien (Osmen, 2015)	MS 3, MS 4, MS 5

Durch Knappheit des zur Verfügung stehenden Pflanzenmaterials konnten Klon 5b und Klon 9b nicht bei 25° C im Rahmen des Vorversuchs zum Einfluss der Temperatur kultiviert werden. Für diesen Versuch wurde deshalb der Klon 11b verwendet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht des Vorversuchs zum Einfluss der Temperatur auf Wachstum und Vermehrung (Nährmedien: siehe Tab. 6, S. 8)

Klonlinien	**Temperatur**	**Explantattyp**	**Nährmedien**
11b	25 °C	30 Sprosse	MS 3, MS 4
5b	20 °C	30 Sprosse	MS 3, MS 4
9b	20 °C	30 Sprosse	MS 3, MS 4

Die Daten der Nodienkulturen des untersuchten Klons 9b der vorliegenden Arbeit und jene von Klon 11a (Osmen, 2015) wurden herangezogen, um die Auswirkung der Ionenstärke im Nährmedium auf Wachstum und Vermehrung zu vergleichen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht des Vorversuchs zum Einfluss der Ionenstärke auf Wachstum und Vermehrung (Nährmedien: siehe Tab. 6, S. 8)

Klonlinien	**Explantattyp**	**Nährmedien**
11a (Osmen)	45 Nodien	MS 3, MS 4, MS 5
9b	45 Nodien	MS 3, MS 4, MS 5

2.2. Nährmedien

Als Basisnährmedium diente das häufig eingesetzte MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962), eine Auflistung der einzelnen Bestandteile des MS-Mediums ist der Tabelle 5 zu entnehmen. Basisnährmedium ohne Zusatz von Pflanzenwuchstoffen wurde in den Versuchen für die Kontrollkulturen eingesetzt.

Tabelle 5: MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962)

Anorganische Komponenten:			**organische Komponenten:**	
Stammlösungen der Makro-elemente (100fach konzentriert)	KNO_3	10ml/l	Vitaminlösung (200fach konzentriert)	5 ml/l
	NH_4NO_3	10ml/l	Myo-inosit	100 mg/l
	$CaCl_2$	10ml/l	Saccharose	10 g/l
	KH_2PO_4	10ml/l	Gelrite®	3 g/l
	$MgSO_4$	10ml/l		
Stammlösungen der Spuren-elemente (Fe 100fach, sonst 1000fach konzentriert)	$FeSO_4$	10ml/l		
	$ZnSO_4$, $MnSO_4$,$CuSO_4$, $CoCl_2$	1ml/l		

Zubereitung des Nährmediums

In große Erlenmeyerkolben wurde destilliertes Wasser etwa bis zur Hälfte des benötigten Gesamtvolumens gefüllt. Die Stammlösungen von Makroelementen, Spurenelementen und Vitaminen wurden in entsprechender Menge dazugegeben. Dann folgte die Beimengung von myo-Inosit, Saccharose und zuletzt des

Gelbildners Gelrite®, und letztlich wurde mit destilliertem Wasser auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Vor dem Abfüllen stellten wir mit 1m KOH beziehungsweise mit 1m HCl den pH-Wert auf 5,7 ± 0,1 ein. Mit Hilfe einer Abfüllvorrichtung wurden Gläser der Firma HIPP mit jeweils 40 ml Nährmedium befüllt. Die mit Kunststoffkappen (Magenta B®-Caps, Firma SIGMA) verschlossenen Kulturgläser wurden im Autoklav für 20 Minuten bei 121°C und einem Druck von 1 bar sterilisiert. Bis zur Anwendung erfolgte die Lagerung im Dunklen bei einer Temperatur von 5°C.

Nährmedien mit unterschiedlicher Ionenstärke

Für die Fragestellung, ob die Ionenstärke des Nährmediums Sprossbildung und -wachstum von *L. tibetica* beeinflusst, variierten wir die Konzentration der Makroelemente des MS-Mediums. Insgesamt wurden 3 verschiedene Nährböden zur Untersuchung der geeigneten Ionenstärke eingesetzt: Voll-MS, ½-MS und ¼-MS, jeweils mit Zusatz von 1 µM KIN.

Jenes Medium, das die volle Konzentration der Makroelementen enthielt, bezeichnen wir als MS 3. Die Bezeichnung MS 4 galt für Medien, bei denen die Ionenkonzentration der Mineralstoffe halbiert wurde, und bei den mit MS 5 bezeichneten Nährmedien entsprach die Konzentration der Makroelemente nur noch einem Viertel des vollen MS-Mediums (Tab. 6).

Tabelle 6: Nährmedien mit unterschiedlicher Ionenstärke

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
MS 3	Voll-MS + 1 µM KIN
MS 4	½ -MS + 1 µM KIN
MS 5	¼ -MS + 1 µM KIN

Pflanzliche Wuchsstoffe

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen kamen die Cytokinine 6-Benzylaminopurin (BAP) und Zeatin (ZEA) zum Einsatz, zur Wurzelbildung wählten wir das Auxin ß-Indolylbuttersäure (IBA) aus (Tab. 7, S. 9). Bei der Zubereitung von Wuchsstoff-hältigen Nährmedien wurde die entsprechende Menge einer 1mM Stammlösung des Wuchsstoffes vor der Einstellung des pH-Wertes zupipettiert.

Tabelle 7 : Überblick über die verwendeten Wuchsstoffe

	Wuchs-stoff	chemische Bezeichnung	Firma	Bestell-nummer
CYTOKININE	**BAP**	6-Benzylaminopurin	Fluka	B-3408
	ZEA	4-Hydroxy-3-methyl-trans-2 –butenyl-aminopurin	Sigma	Z-0876
AUXIN	**IBA**	ß-Indolylbuttersäure	Sigma	I-5386

2.3. Kulturbedingungen

Bis auf die pflanzlichen Wuchsstoffe und die Ionenstärke, die als variable Kulturfaktoren galten, blieben alle anderen Kulturbedingungen immer wie folgt:

Einheitliche Kulturbedingungen:

Nährmedium: Zusammensetzung nach Murashige und Skoog (1962)

Kulturgefäße: HIPP®-Gläser (L: 95 mm, ∅ : 60 mm) mit 40 ml Medium

Kultivierungstemperatur: 25 ± 1°C)

Licht-/Dunkeldauer: 16 Stunden / 8 Stunden

Lichtstärke: 40 $\mu M \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (Leuchtstoffröhren SYLVANIA Gro-Lux)

Variable Kulturbedingungen:

Pflanzenwuchstoffe: ZEA und BAP aus der Gruppe der Cytokinine, IBA als Vertreter der Auxine. Die Cytokinine wurden in Konzentrationen von 0,5 µM, 1 µM und 5 µM eingesetzt, IBA kam in Konzentrationen von 1 µM und 5 µM zum Einsatz. Zu jeder Wuchsstoffreihe wurden Kontrollkulturen auf Medium ohne Wuchsstoff angelegt.

Ionenstärke: Makroelemente des MS-Mediums, es wurden Medien mit voller, halbierter und geviertelter Konzentration der Makroelemente getestet.

Versuchsaufbau:

Eine Versuchsreihe bestand aus 5 Gläsern mit jeweils 3 Explantaten (Stichprobengröße n=15), wobei das Nährmedium entweder einen der 3 getesteten Wuchsstoffe BAP, ZEA bzw. IBA enthielt oder als hormonfreies Medium zur Kontrolle eingesetzt wurde.

Für die Versuche wurden 3 Klone von *Lancea tibetica* verwendet, welche die Bezeichnung 2c, 5b und 9b trugen. Zusätzlich kam im Versuch zum Einfluss des Explantattyps auf Wachstum und Vermehrung der Klon 11b zum Einsatz. In Abbildung 6 ist ein kompletter Versuch mit einem Klon dargestellt.

Abb. 6 : Gesamtanzahl der Kulturgefäße für den Vermehrungs- und Bewurzelungsversuch mit ZEA, BAP und IBA an einem Pflanzenklon

2.4. Auswertungskriterien

Die Auswertung der Versuche erfolgte nach einer Kultivierungsdauer von 7 Wochen, da sich in den ersten 3 bis 5 Wochen nur sehr schwaches Wachstum zeigte. Die erhobenen Daten wurden statistisch mittels der Software STATISTICA (Firma Statsoft Inc.) bearbeitet, wir berechneten Mittelwerte und Standardfehler und führten Varianzanalysen (ANOVA, Duncan's Test) durch.

Als Parameter für das Wachstum wurde die Anzahl der neu gebildeten Nodien und Sprosse ermittelt sowie die Länge der Sprosse und Wurzeln erhoben. Daraus können folgende Werte berechnet werden:

a) **Mittelwert Anzahl der Sprosse**
b) **Mittelwert Anzahl der Nodien**
c) **durchschnittliche Nodien**: die Summe aller aus einem Explantat regenerierten Nodien wurde durch die Anzahl der gebildeten Sprosse dividiert
d) **durchschnittliche Sprosslänge (mm)**: die Summe aller gemessenen Längen der gebildeten Sprosse pro Explantat wurde durch Anzahl vorhandener Sprosse desselben Explantats dividiert
e) **Mittelwert aller gebildeten Wurzeln**
f) **durchschnittliche Wurzellänge (mm)**: die Summe der Längen aller Wurzeln pro Explantat wurde durch Anzahl neugebildeter Wurzeln pro Explantat dividiert.

Auch Vitalitätsfaktoren wurden bei der Auswertung mitberücksichtigt. Folgende auffällige Merkmale konnten beobachtet und statistisch erfasst werden:

g) **Hyperhydratisierung (%):** prozentueller Anteil an hyperhydratisierten Sprossen, bezogen auf die Gesamtanzahl der vorhandenen Sprosse pro Explantat (Abb. 7, S 12)

h) **Kallusbildung (%):** Häufigkeit der Kallusbildung (Abb. 8, S. 12) bezogen auf alle Expantate (n=15)
i) **Kallusdurchmesser (mm):** Angabe pro Explantat
j) **Clusterbildung (%) :** Häufigkeit des Vorkommens büschelartiger Aggregate neu gebildeter Sprosse (Abb. 9, S. 12)

Abb. 7: Hyperhydratisierte Sprosse

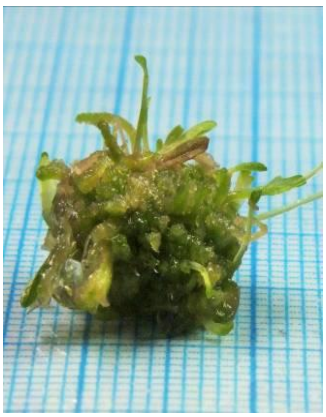


Abb. 8: Explantat mit Kallusbildung

Abb. 9: „Clusterbildung“: büschelartige Aggregate neu gebildeter Sprosse

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss des Explantattyps auf Wachstum und Vermehrung

Die Fragestellung, ob sich die Art des Explantats auf die Vermehrungsparameter auswirkt, wurde an Klon 11b untersucht, wobei Nodien- und Sprossexplantate zum Einsatz kamen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Sprossexplantate getestet, während Osmen (2015) die Eignung von Nodienexplantaten untersuchte. Anders als in den Versuchen zur Wirkung von Wuchsstoffen wurden Nährmedien verschiedener Ionenstärke, nämlich Voll-MS (MS 3), ½ MS (MS 4) und ¼ MS (MS 5) eingesetzt, die zusätzlich 1 µM KIN enthielten.

Wie in Abb. 10 illustriert, wuchsen die Sprosskulturen auf Medium MS 3 und MS 5 sowie die Nodienkulturen auf den Medien MS 3, MS 4 und MS 5 in ähnlichen Größenordnungen. Zusammenfassend kamen wir zum Resultat, dass der Einsatz von Sprossexplantaten auf Nährmedium MS 4 im Vergleich zu Nodienexplantaten zu einer etwas erhöhten Vermehrungsrate führte.

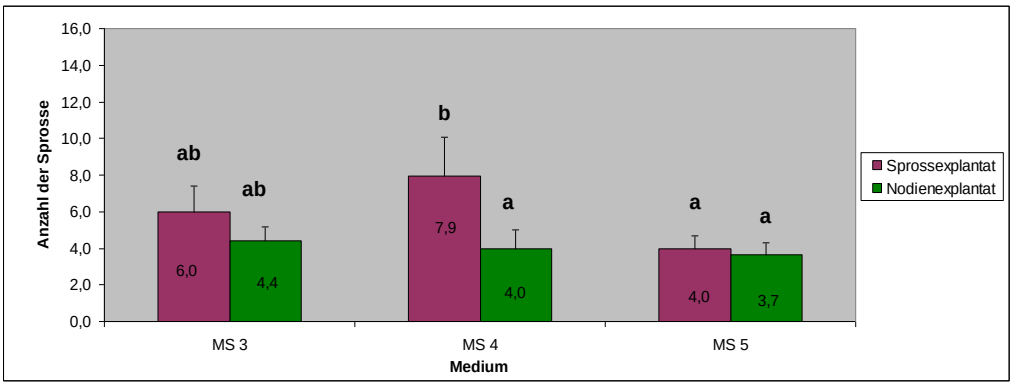


Abb. 10 : Einfluss des Explantattyps und der Ionenstärke auf die **Sprossanzahl.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Bei Einsatz von Sprossexplantaten war die durchschnittliche Sprosslänge größer als bei Verwendung von Nodienexplantaten. Besonders die Sprosskulturen auf Medium MS 3 wuchsen deutlich schneller als Nodien: Mit einer Sprosslänge von 36 mm unterschieden sie sich signifikant von Vergleichsexplantanten, auch von den Nodien auf demselben Medium. Jedoch reduzierte sich mit abnehmender Ionenkonzentration die Sprosselongation wesentlich, bei Medium MS 5 sogar auf mehr als die Hälfte der höchst gemessenen Sprosslänge. Bei Nodienkulturen ergab MS 3 zwar die größte Sprosslänge, doch die Ergebnisse auf den beiden anderen

Medien waren nicht signifikant niedriger. Sprossexplantate führten auf Medium MS 3 zum höchsten Längenwachstum (Abb. 11).

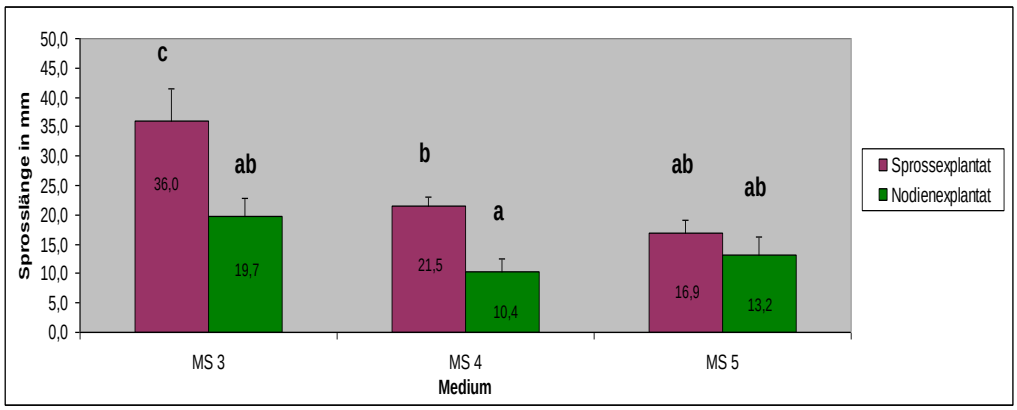


Abb. 11 : Einfluss des Explantattyps und der Ionenstärke auf die **Sprosslänge.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Ähnlich ergab die Auswertung der Nodienanzahl in allen 3 getesteten Nährmedien bessere Ergebnisse für die Sprossexplantate. Die Nodienbildung in Sprosskulturen nahm bei reduzierter Makroelementkonzentration tendenziell ab. Als maßgebliche Ursache für das schwache Wachstum auf Medium MS 5 ist die geringe Ionenkonzentration anzunehmen, weswegen mit zunehmender Kulturdauer (7 Wochen) nicht mehr ausreichend Nährstoffe zur Verfügung standen. Die Ergebnisse sind der Abb. 12 zu entnehmen.

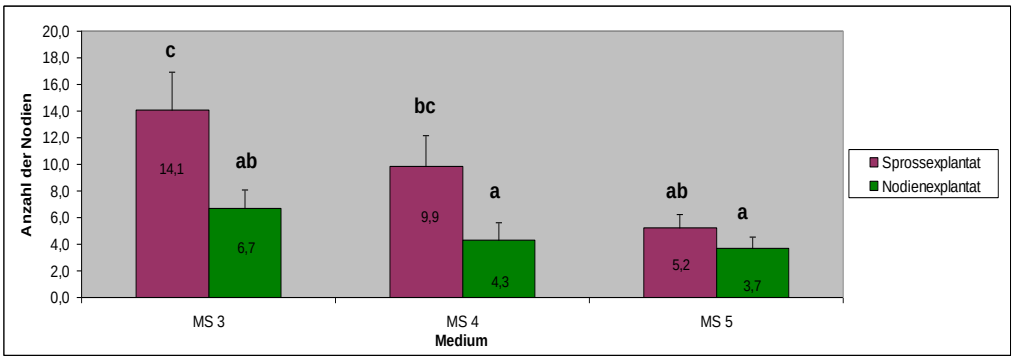


Abb. 12 : Einfluss des Explantattyps und der Ionenstärke auf die **Anzahl der Nodien.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Bezüglich der Wurzelbildung liess sich kein signifikanter Einfluss von Explantattyp oder Ionenstärke im Nährmedium feststellen (Abb. 13, S. 15).

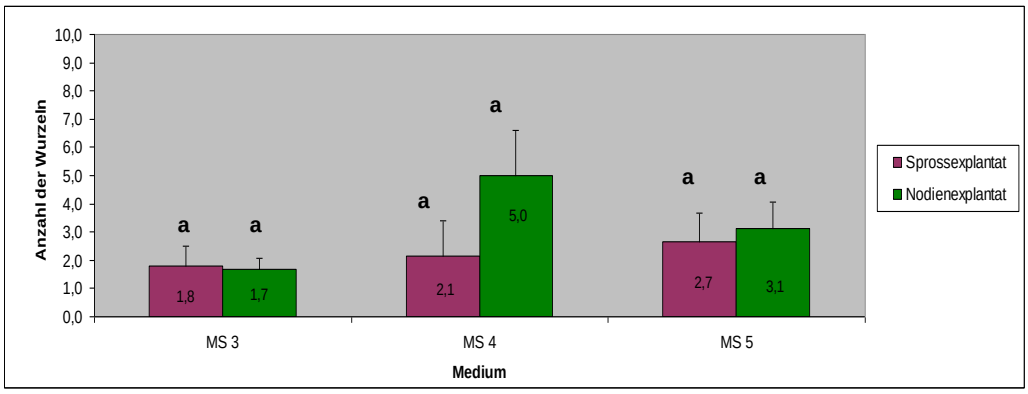


Abb. 13 : Einfluss des Explantattyps und der Ionenstärke auf die **Anzahl der Wurzeln.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die längsten Wurzeln bildeten sich bei Einsatz von Sprossexplantaten, mit abnehmender Ionenkonzentration nahm auch die Wurzellänge ab. Bei den Nodienkulturen konnten wir keinen signifikanten Einfluss des Mediums auf die Wurzellänge feststellen (Abb. 14). Die kultivierten Nodien schienen zwar vergleichsweise mehr Wurzeln zu bilden als Sprossexplantate, bei letzteren zeigte sich jedoch ein höheres Längenwachstum der Wurzeln.

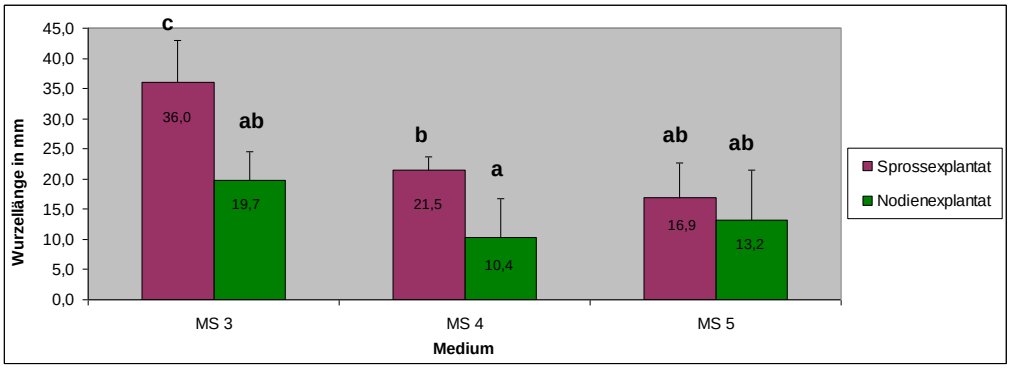


Abb. 14 : Einfluss des Explantattyps und der Ionenstärke auf die **Wurzellänge.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen war bei Einsatz von Nodien höher als bei Sprossexplantaten. Die geringste Hyperhydratisierung wurde bei Sprossexplantaten auf Medium MS 3 beobachtet. Insgesamt zeigten sowohl Nodien als auch Sprosse ein vergleichbares, relativ hohes Ausmaß an Hyperhydratisierung auf allen drei Nährmedien (Abb. 15, S. 16).

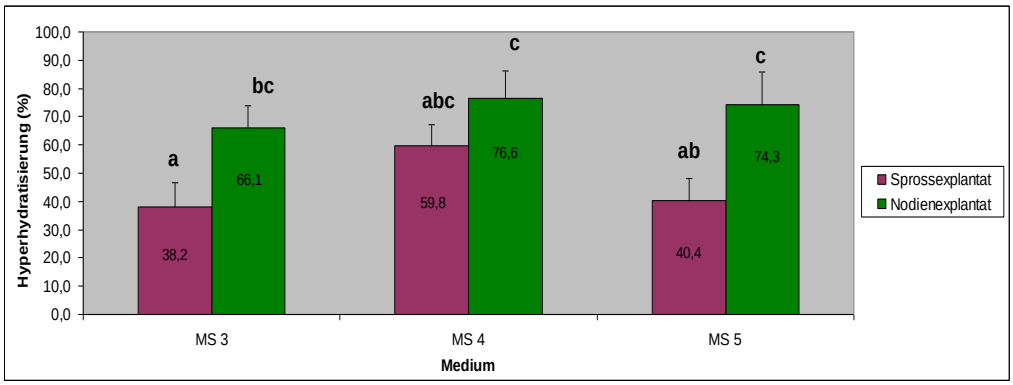


Abb. 15 : Einfluss des Explantattyps und der Ionenstärke auf die **Hyperhydratisierung.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Hinsichtlich der Kallusbildung kann aus den gesammelten Daten geschlossen werden, dass der Explantattyp keinen wesentlichen Einfluss auf die Bildung von undifferenziertem Gewebe hatte. Nur auf Medium MS 4 bildete sich an Sprossexplantaten signifikant mehr Kallus als an Nodienexplantaten (Abb. 16).

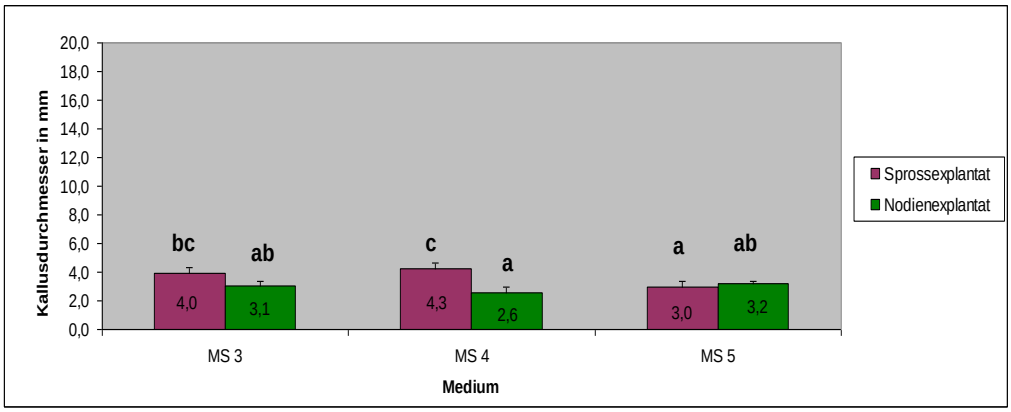


Abb. 16 : Einfluss des Explantattyps und der Ionenstärke auf den **Kallusdurchmesser.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

3. 2. Einfluss der Temperatur auf Wachstum und Vermehrung

Neben der Hauptversuchsreihe und Testung von Cytokininen und Auxin, beschäftigte uns auch die Frage, ob unterschiedliche Temperaturen die Vermehrung von *Lancea tibetica* beeinflussen würden. Um dies zu klären, wurde ein entsprechendes Experiment mit Sprossexplantaten der Klone 5b und 9b (20° C) sowie 11b (25° C) durchgeführt. Der Grund, warum wir Sprossexplantate der Klone 5b und 9b nicht auch bei 25° C kultivierten, war der limitierte Vorrat an Pflanzenmaterial zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten. Wir wählten daher den dritten Klon 11b für den Versuch mit 25°C . Somit verlief dieser Vorversuch ohne Berücksichtigung genetischer Unterschiede zwischen den 3 Klonlinien. Da sich das Nährmedium MS 5 mit geringster Ionenstärke aufgrund der Voruntersuchungen (Versuche zur Ionenstärke und zum Einfluß des Explantatstyps) als nicht optimal herausgestellt hatte, wurden im „Temperaturversuch“ nur die Medien MS 3 und MS 4 eingesetzt.

Die folgenden zwei Abbildungen 17 und 18 (S. 18) zeigen alle in den Kulturgläsern heranwachsenden Klone nach der siebenwöchigen Kulturperiode, um das Wachstum der regenerierten Sprosse in Abhängigkeit der beiden Medien MS 3 und MS 4 und der Temperatur (20° C und 25° C) optisch zu dokumentieren.

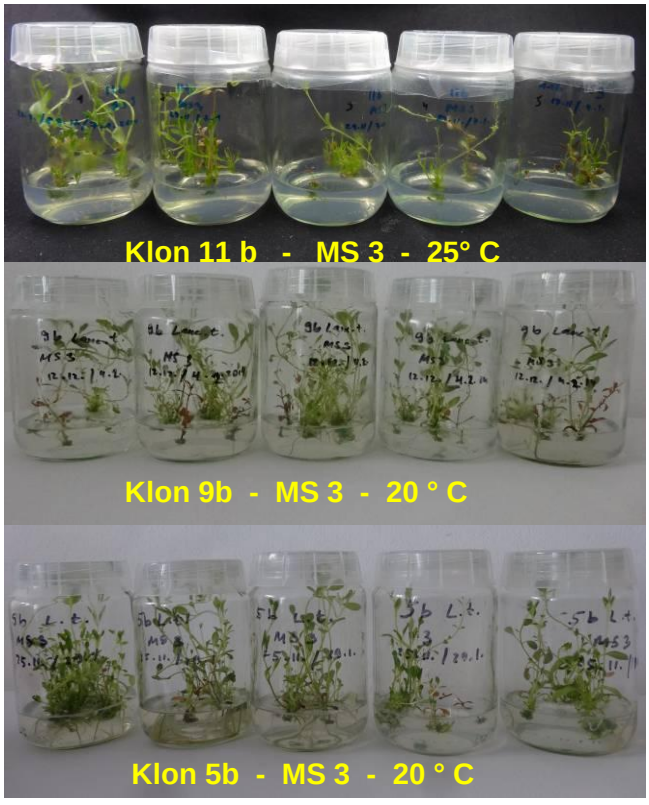


Abb. 17: 7 Wochen alte Sprosskulturen, Klon 11b auf Nährmedium MS 3 bei 25° C kultiviert; Klon 9b und 5b bei 20° C kultiviert

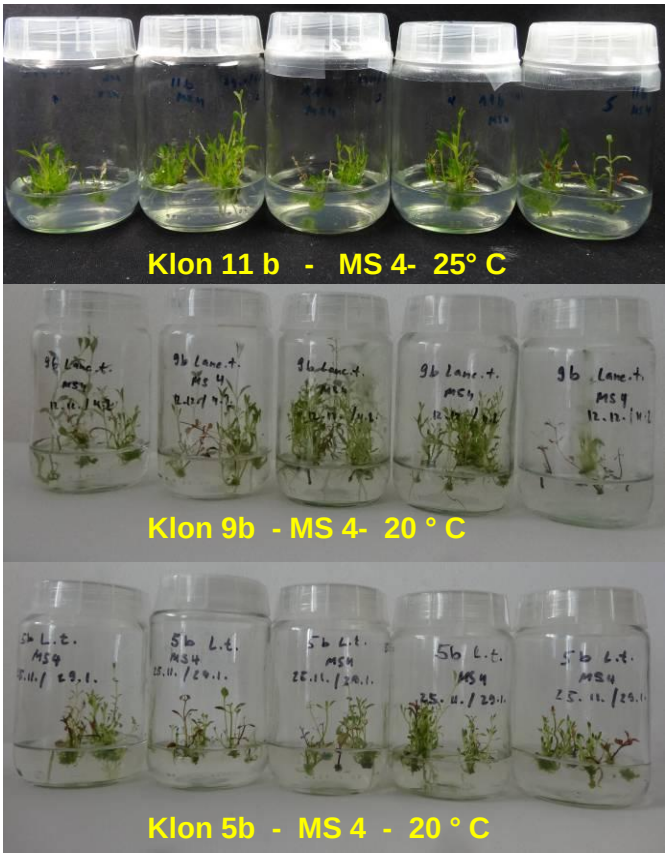


Abb. 18: 7 Wochen alte Sprosskulturen, Klon 11b auf Nährmedium MS 4 bei 25° C kultiviert, Klon 9b und 5b bei 20° C kultiviert

Bezüglich der Sprossbildung konnte kein signifikanter Einfluß der Temperatur festgestellt werden. Allerdings fiel uns auf, dass die bei 20°C kultivierten Sprosse der Klone 5b und 9b ein wesentlich vitaleres und kräftigeres Erscheinungsbild aufwiesen als die Sprosse von Klon 11b bei 25° C. Es wurde auch eine deutlich erhöhte Sprosselongation der Klone 9b und 5b beobachtet, wodurch die Isolierung von Nodiensegmenten für die Weitervermehrung vereinfacht war. Die Sprosse von Klon 11b, kultiviert bei 25° C, zeigten hingegen ein kleinwüchsiges Aussehen mit stark verkürzten Internodien. Was die Sprossanzahl betrifft, so war kein signifikanter Einfluss von Klon, Nährmedium oder Temperatur festzustellen (Abb. 19, S. 19). Die Sprosse des Klons 11b, die bei 25° C kultiviert worden waren schienen aufgrund obiger Beobachtungen zur Weitervermehrung als ungeeignet.

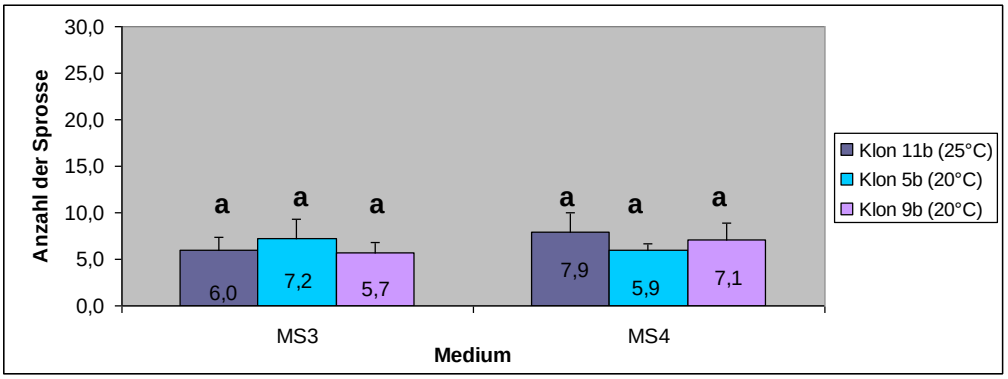


Abb. 19 : Einfluss von Temperatur und Nährmedium auf die **Sprossanzahl.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Betrachtet man die Sprosslänge, so stach die durchschnittliche Länge von 61 mm der Sprosse des Klons 9b heraus (Abb. 20).

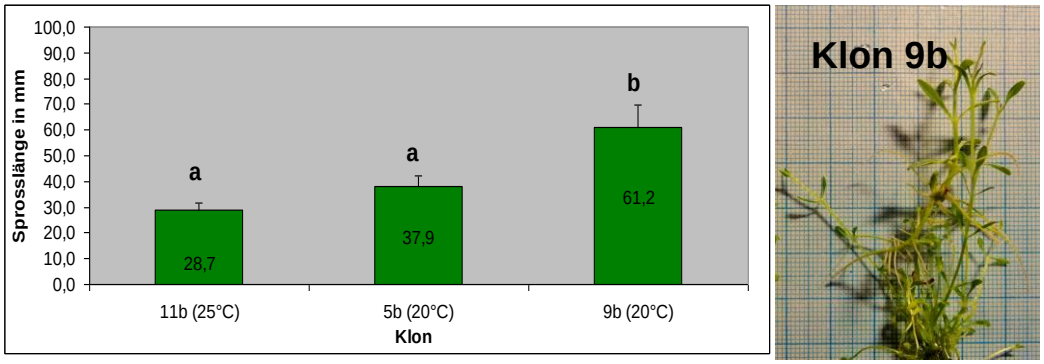


Abb. 20 : Einfluss der Temperatur auf die **Sprosslänge** je Klon.
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Betrachtet man die Versuchsergebnisse unter Berücksichtigung von Klon und Nährmedium, so waren die signifikant längsten Sprosse bei Klon 9b (20° C) auf Medium MS 3 zu finden (Abb. 21, S. 20). Die durchschnittliche Länge der Sprosse von Klons 5b (20° C) auf Medium MS 3 war im Vergleich zu Klon 11b (25° C) größer, allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant. Auch zwischen den Medien MS 3 und MS 4 unterschieden sich die Messwerte für Klon 11b statistisch wenig, bei den beiden anderen Klonen nahm die durchschnittliche Sprosslänge bei reduzierter Ionenkonzentration des Mediums signifikant um mehr als die Hälfte ab.

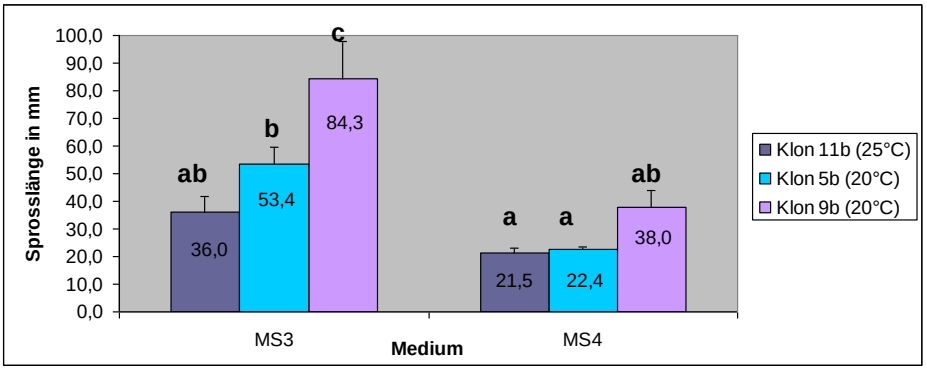
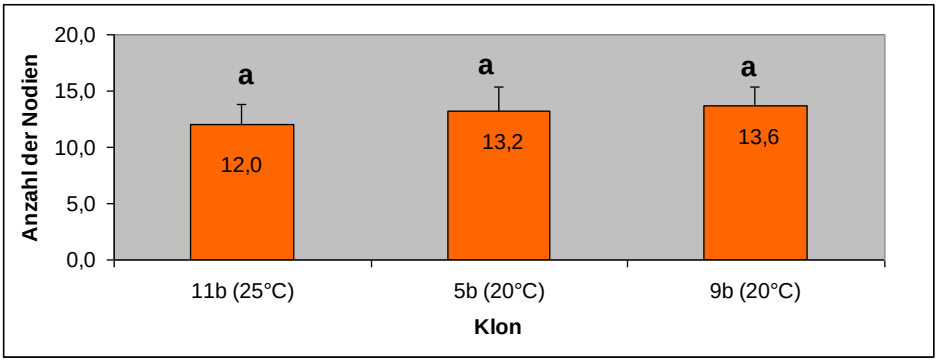


Abb. 21 : Einfluss von Temperatur und Nährmedium auf die **Sprosslänge.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

In den Untersuchungen zeigte die Temperatur keinen erkennbaren Einfluss auf die Nodienbildung. Obwohl sich bei Klon 11b viele kurze Sprosse bildeten, war die Anzahl an Nodien vergleichbar mit den anderen Klonen, welche zwar längere Sprossen bildeten, die jedoch auch längere Internodien aufwiesen. Die unten stehende Grafik (Abb. 22) zeigt die mittlere Anzahl der Nodien aller drei Klone und verdeutlicht zugleich den statistisch geringen Einfluss der Temperatur auf die Nodienbildung.



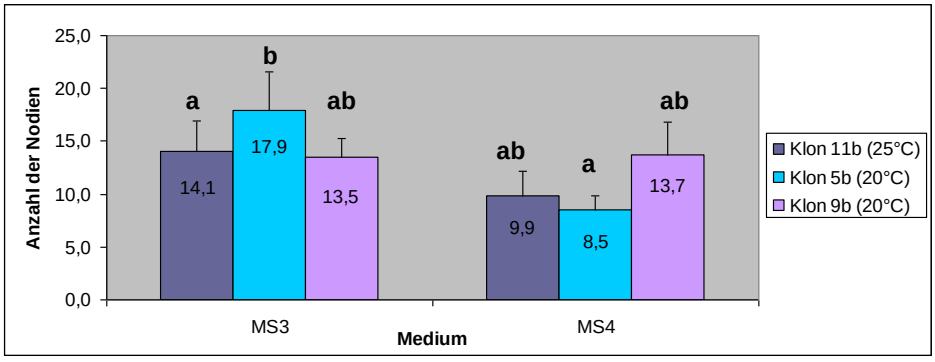


Abb. 22 : Einfluss von Temperatur und Nährmedium auf die **Anzahl der Nodien.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Auch bei der Anzahl an Wurzeln gab es Ähnlichkeiten mit den Resultaten bezüglich der Nodienbildung. Nur auf Medium MS 3 bildeten Explantate von Klon 5b signifikant mehr Wurzeln aus als jene vom selben Klon auf MS 4 und als Klon 9b auf Medium MS 3 (Abb. 23).

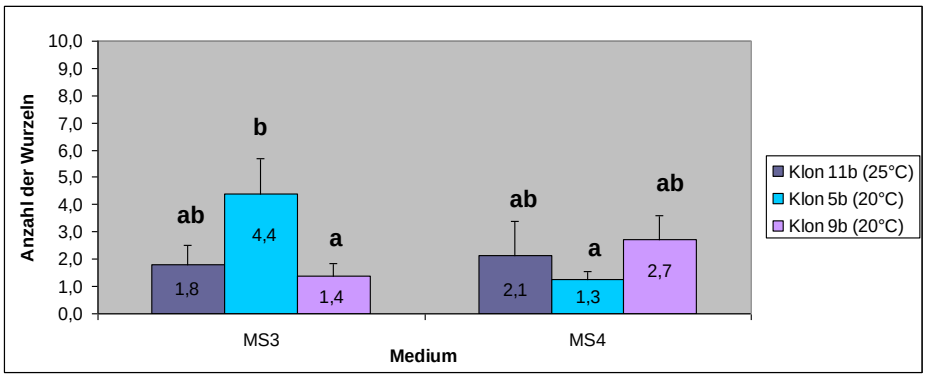


Abb. 23 : Einfluss von Temperatur und Nährmedium auf die **Anzahl der Wurzeln.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die Wurzellänge unterschied sich nur bei Klon 5b auf Medium MS 3 signifikant von den beiden anderen Klonen (Abb. 24): es bildeten sich kräftige lange Wurzeln mit feinen weißen Wurzelhaaren (Abb. 25, S. 22). Ansonsten schienen Klon, Nährmedium oder Temperatur keinen signifikanten Einfluss auf die Wurzellänge zu haben.

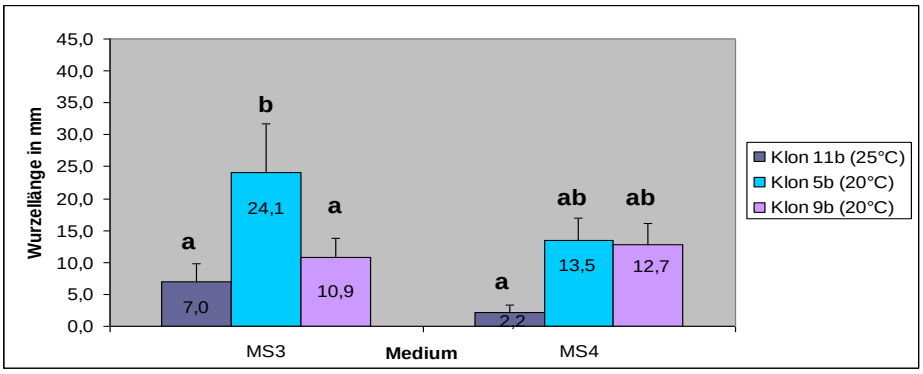


Abb. 24 : Einfluss von Temperatur und Nährmedium auf die **Wurzellänge.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Abb. 25: Wurzelbildung bei Klon 5b (20° C Kultivierungstemperatur)
(**links** : Wurzeln im Kulturglas, **mitte**: Wurzelbüschel, **rechts**: Einzelwurzel mit Wurzelhaaren)

Das Ausmaß an Hyperhydratisierung hingegen schien von der Kultivierungstemperatur abzuhängen: mit 47,7 % für Klon 11b war dieses Phänomen bei 25° C signifikant stärker ausgeprägt als bei den Klonen 5b und 9b, die bei 20° C kultiviert wurden (Abb. 26). Bei Klon 11b war die Hyperhydratisierung bei der niedrigeren Ionenonzentration (MS 4) signifikant höher als auf Medium MS 3.

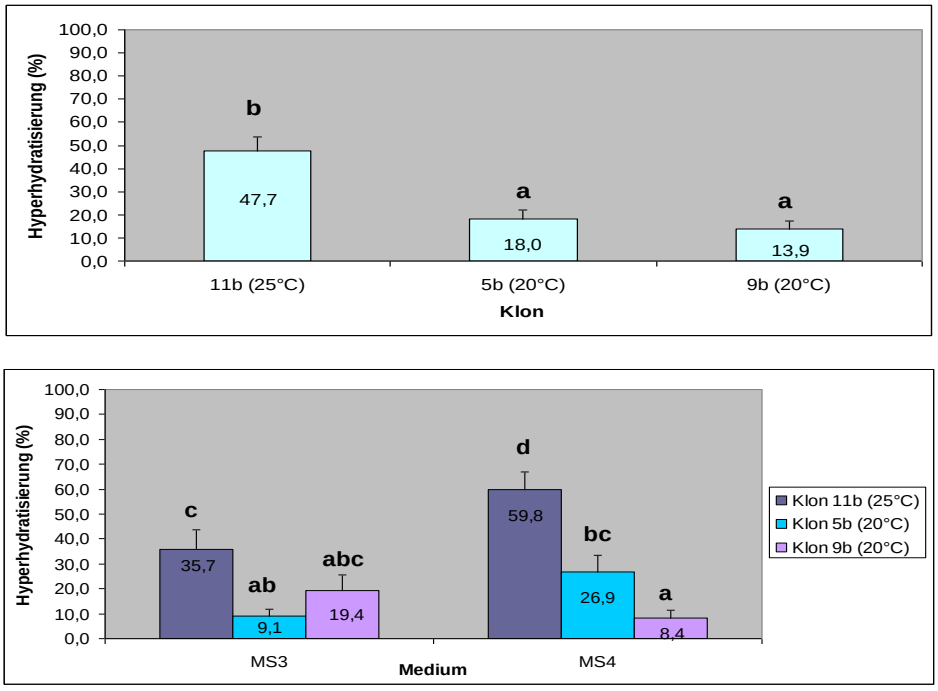


Abb. 26 : Einfluss von Temperatur und Nährmedium auf die **Hyperhydratisierung.** Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die Sprosse des Klons 9b mit Kultivierungstemperatur von 20° C bildeten mit einer Häufigkeit von 30 % am wenigsten Kallusgewebe an der Explantatbasis aus, bei Klon 11b (25° C) war die Kallusbildung auf den beiden Nährmedien MS 3 und MS 4 am höchsten (Abb. 27). Auch der Kallusdurchmesser war bei Klon 11b signifikant größer als bei den beiden anderen Klonen (Abb. 28).

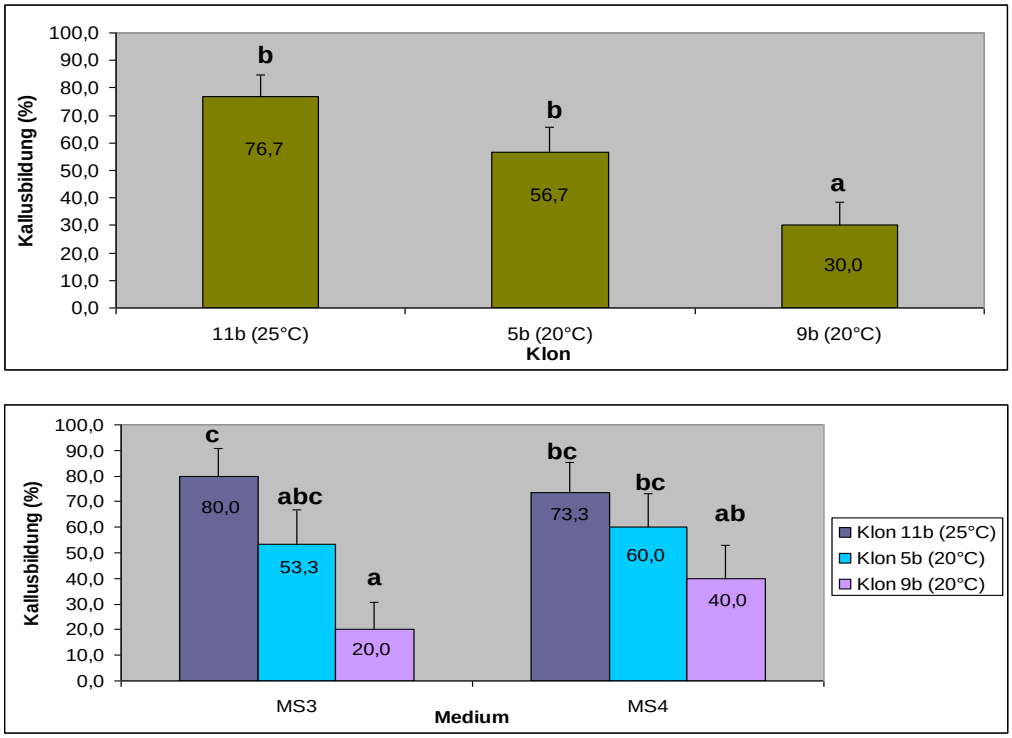


Abb. 27 : Einfluss von Temperatur und Nährmedium auf die **Kallusbildung.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

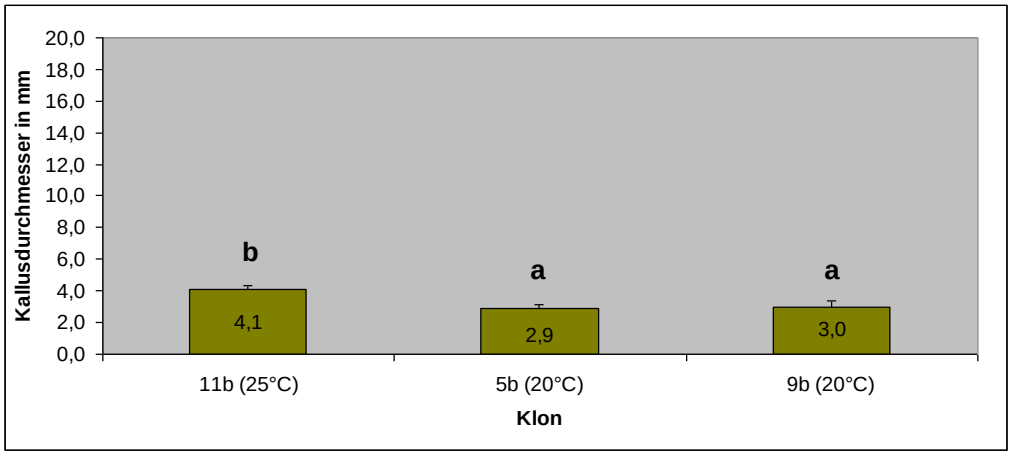


Abb. 28 : Einfluss der Temperatur auf **Kallusdurchmesser** je Klon.
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

3. 3. Einfluss der Ionenstärke auf Wachstum und Vermehrung

In Vorversuchen zur Etablierungen von Nodienkulturen der beiden Klone 2c und 5b war uns aufgefallen, dass bei regenerierten Sprossen auffallend oft Hyperhydratisierung auftrat. Der Grund dafür war möglicherweise eine zu hohe Ionenstärke des Nährmediums, daher untersuchten wir in einem entsprechenden Versuch mit den Klonen 9b und 11a (Osmen, 2015), von denen zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten genügend Material zur Verfügung stand, den Einfluss der Ionenstärke im Nährmedium auf Wachstum und Vermehrung in Nodienkulturen. Als Basisnährmedium diente das MS-Medium in drei Varianten (voll- , halb- und viertelkonzentriert – Medien MS 3, MS 4 und MS 5), denen der Wuchsstoff KIN in einer Konzentration von 1µM zugesetzt wurde.

Ein Vergleich der Sprossbildung beider Klone zeigte, dass diese sich sehr ähnlich verhielten, nur auf Medium MS 4 war bei Klon 11a eine stärkere Sprossbildung zu beobachten (Abb. 29).

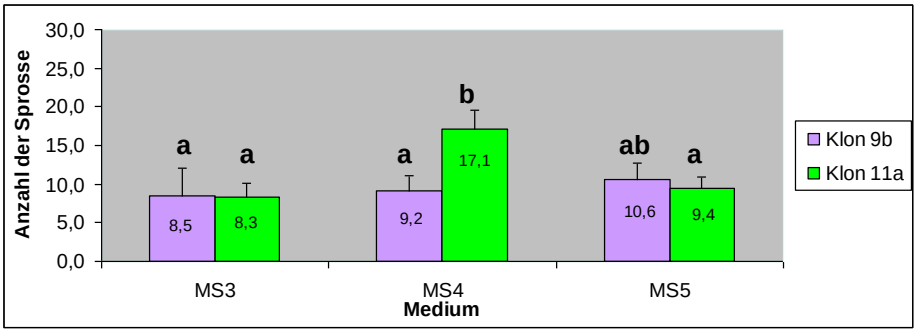


Abb. 29 : Einfluss der Ionenstärke auf die **Sprossanzahl.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Das Längenwachstum der Sprosse war auf Medium MS 4 bei beiden Klonen deutlich besser als auf den beiden anderen Nährmedien. Dies verdeutlicht die nachfolgende Abbildung 30 .

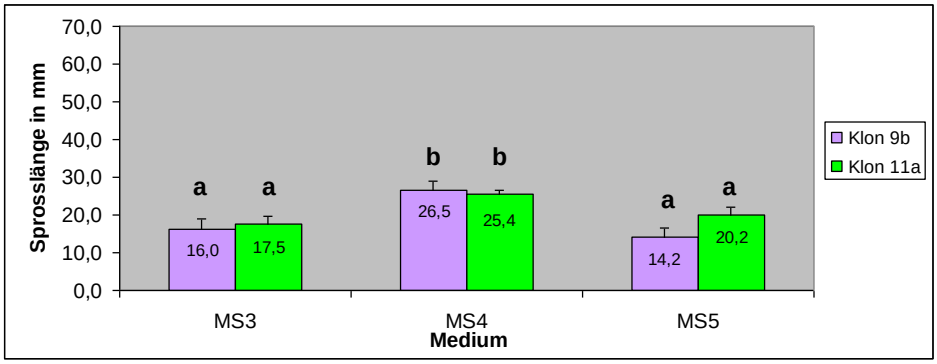


Abb. 30 : Einfluss der Ionenstärke auf die **Sprosslänge.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterscheidbare Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben gekennzeichnet (p=0,05)

Was die Auswirkung der Ionenstärke auf die Nodienbildung betrifft, war die Anzahl der neu gebildeten Nodien bei Klon 11a auf Medium MS 4 signifikant höher als auf den anderen Medien bzw. bei Klon 9b (Abb. 31).

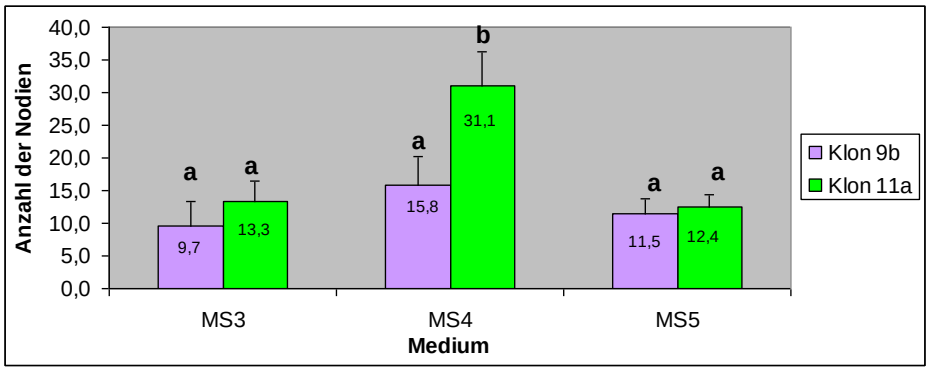


Abb. 31 : Einfluss der Ionenstärke auf die **Anzahl der Nodien.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Anders als bezüglich der Spross- und Nodienbildung verhielten sich die Versuchsklone bei der Wurzelbildung eher heterogen. Bei Klon 9b kam es auf Medium MS 4 zur Bildung von lediglich 4,3 Wurzeln pro Explantat. Im Gegensatz dazu war die Wurzelbildung bei Klon 11a mit 23,9 Wurzeln auf MS 4 und und 15,7 Wurzeln auf MS 5 am stärksten (Abb. 32).

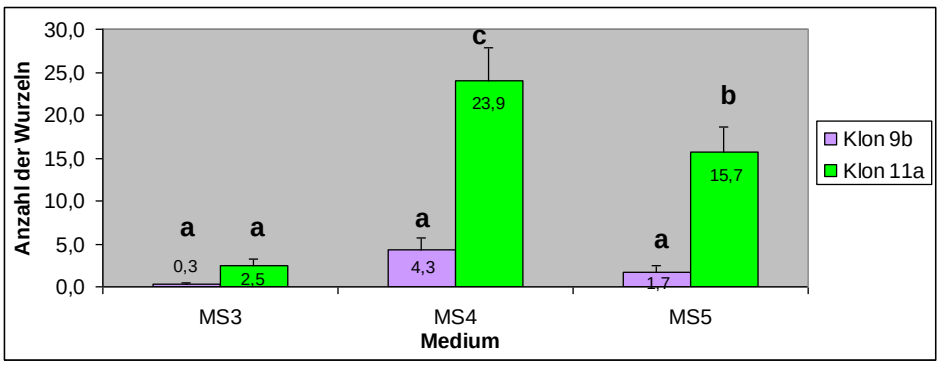


Abb. 32 : Einfluss der Ionenstärke auf **Wurzelanzahl.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Bei der Messung des Längenwachstums der Wurzeln glichen sich die Werte wieder (Abb. 33, S. 26), vor allem bei den auf MS 4 etablierten Nodienkulturen, mit Wurzellängen von 11,1 (Klon 9b) und 13 mm (Klon 11a). Die größte Wurzellänge von 18,2 mm trat bei Klon 11a auf Medium MS 5 auf.

.

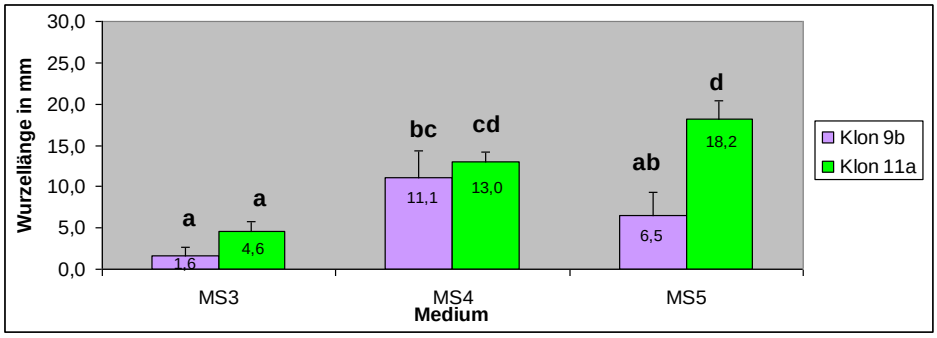


Abb. 33 : Einfluss der Ionenstärke auf die **Wurzellänge.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die Bildung von Clustern (Sprossbüscheln) konnte auf allen 3 getesteten Nährmedien beobachtet werden, die Häufigkeit bei beiden Versuchsklonen war etwa gleich hoch (Abb. 34). Zwar erreichte Klon 11a auf MS 4 mit einem Prozentsatz von 86,7 % den höchsten Wert, doch trat auch bei Klon 9b bei 80 % der Explantate Clusterbildung auf. Allgemein war bei Klon 9b zu erkennen, dass mit abnehmender Ionenkonzentration die Bildung von Sprossbüscheln aus den Nodienexplantaten zunahm, was bei Klon 11a nicht der Fall war.

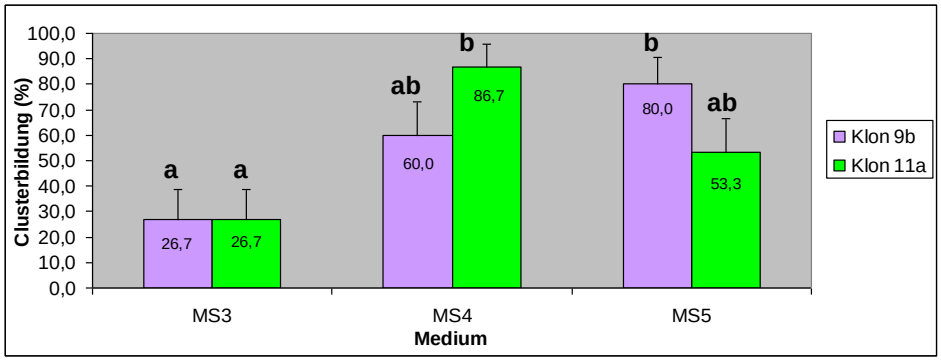


Abb. 34 : Einfluss der Ionenstärke auf die **Clusterbildung.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Hyperhydratisierung trat bei den beiden getesteten Klonen in unterschiedlichem Ausmaß auf. Klon 11a, der die besten Ergebnisse bezüglich Sprossebildung, Nodienzahl oder Wurzelbildung lieferte, zeigte auch wesentlich mehr glasig aussehende Sprossen als Klon 9b, vor allem auf Medium MS 4. Auf Nährmedium MS 5 mit niedrigster Ionenstärke war die Hyperhydriatisierung niedriger, wobei der Unterschied zu Medium MS 4 nur bei Klon 11a signifikant war (Abb. 35, S. 27).

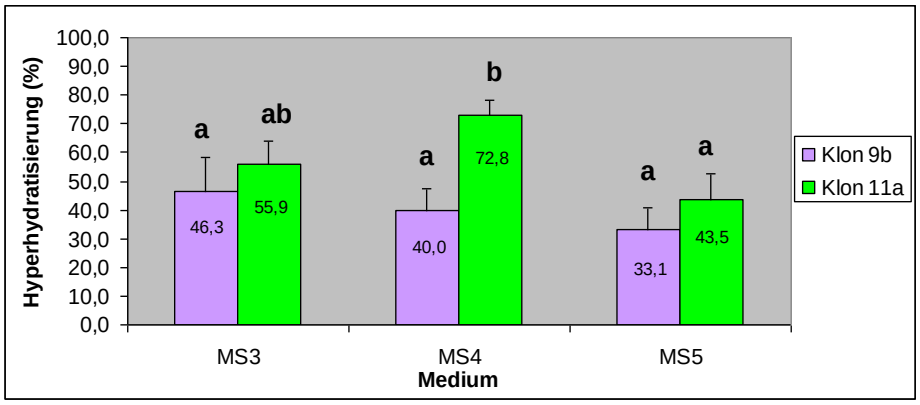


Abb. 35 : Einfluss der Ionenstärke auf die **Hyperhydratisierung.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Auch die durchschnittliche Anzahl an hyperhydratisierten Sprossen pro Explantat wurde bewertet. Die unten angeführte grafische Darstellung (Abb. 36) veranschaulicht, dass vor allem bei Klon 11a auf Medium MS 4 viele Sprosse hyperhydratisiert waren.

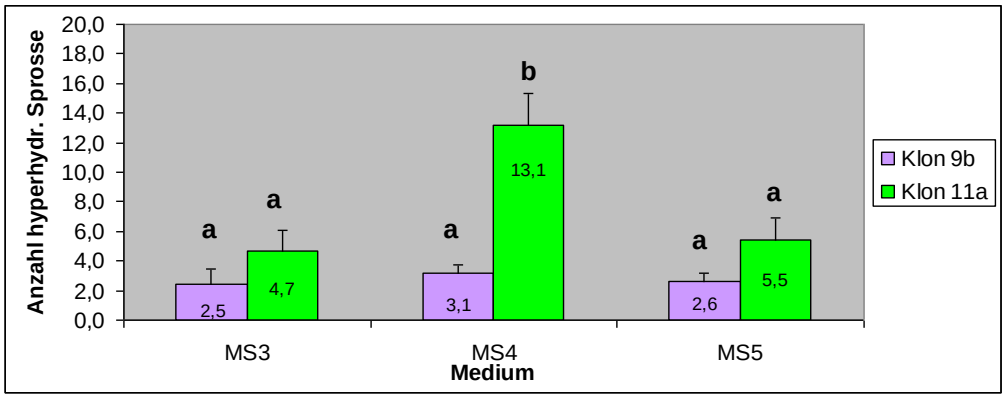


Abb. 36 : Einfluss der Ionenstärke auf die **Anzahl hyperhydratisierter Sprosse** pro Explantat.
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Eine weitere unerwünschte Wachstumserscheinung, nämlich die Kallusbildung, war bei den meisten Explantaten zu finden. Kallusgewebe entstand auf allen Nährmedien, und die Ionenstärke zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Kallusbildung (Abb. 37, S. 28).

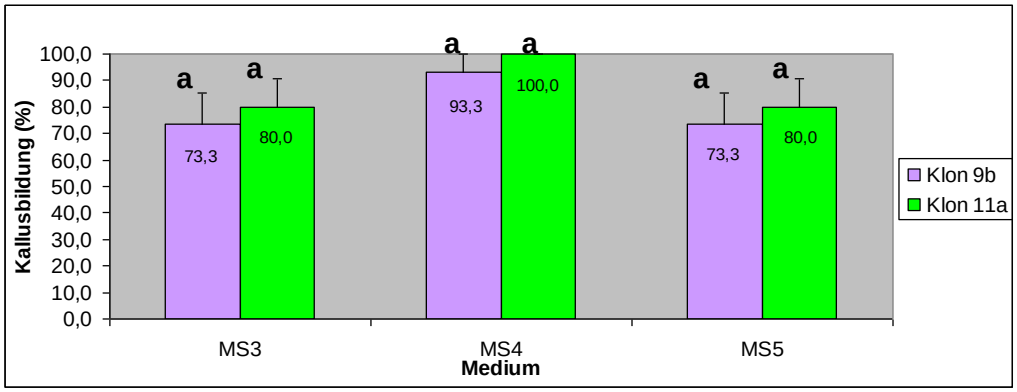


Abb. 37 : Einfluss der Ionenstärke auf die **Kallusbildung.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Auch bezüglich der Größe des basalen Kallusklumpens zeigten sich kaum signifikante Unterschiede zwischen den Nährmedien als auch den beiden Klonen, einzig bei Klon 11a war der Kallusdurchmesser auf Medium MS 3 signifikant größer als auf Medium MS 4 (Abb. 38).

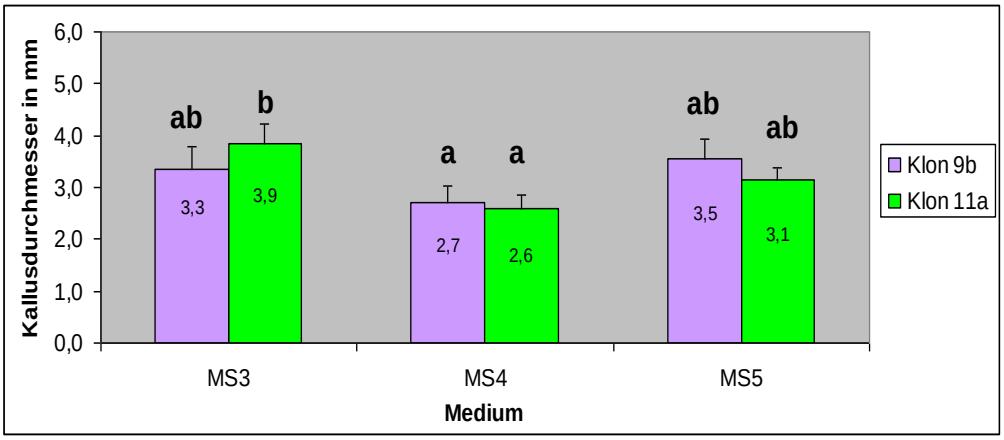


Abb. 38 : Einfluss der Ionenstärke auf **Kallusdurchmesser.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Abbildung 39 zeigt abschliessend das generelle Erscheinungsbild von Nodienkulturen des Klons 9b nach 7 Wochen auf den drei untersuchten Nährmedien.

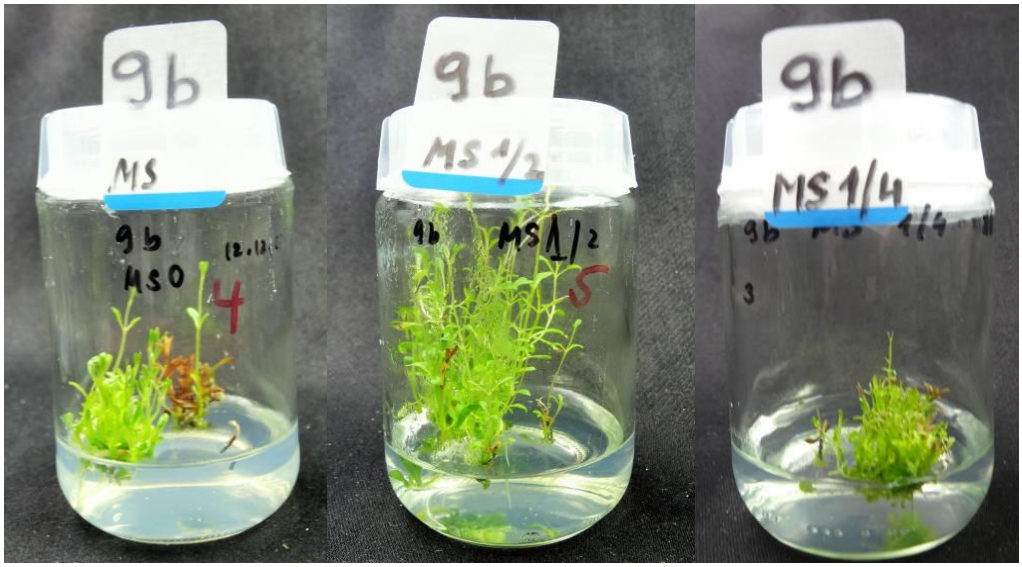


Abb. 39: 7 Wochen alte Nodienkulturen von Klon 9b auf den Medien MS 3 (links), MS 4 (mitte) , MS 5 (rechts)

3.4. Einfluss der Cytokinine auf Wachstum und Vermehrung

3.4.1. Benzylaminopurin (BAP)

Die Wirkung verschiedener Pflanzenwuchsstoffe, begonnen mit BAP aus der Gruppe der Cytokine, auf die in vitro-Vermehrung von *Lancea tibetica* wurde untersucht. Insgesamt führten wir Versuche mit den drei Klonlinien 2c, 5b und 9b durch. An dieser Stelle kann vorweggenommen werden, dass sich die Klone bezüglich des Wachstums ziemlich heterogen verhielten. Jedoch wurde eine Gemeinsamkeit beobachtet: Grundsätzlich war BAP im Nährmedium notwendig, da fast alle Explantate in den Kontrollkulturen ohne Wuchsstoff abstarben. Auch bei Zugabe von BAP war das Wachstum nicht überzeugend. Es wurde festgestellt, dass bei den Klonen 5b und 9b kein Sprosswachstum eintrat, bei diesen Klonen verbräunten alle Nodienexplantate. Bei Klon 2c setzte ab der dritten Kulturwoche Sprossbildung ein, die neu gebildeten Sprossen blieben jedoch mit einer durchschnittlichen Sprosslänge von ca. 10 mm kleinwüchsig (Abb. 40). Aufgrund der sehr geringen Menge an Nodien bei kurzen gestauchten Internodien erwies sich BAP als ungeeignet für die Vermehrung, denn aus solchen Sprossen würden sich mit vertretbarem Aufwand keine neuen Nodienexplantate präparieren lassen.

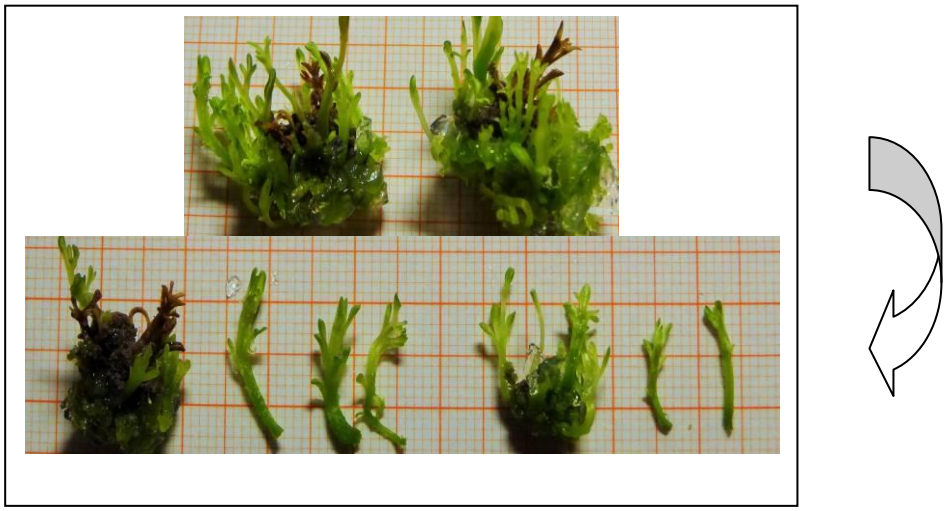


Abb. 40: Kleinwüchsige Sprosse kultiviert auf BAP-hältigen Nährmedien in Büschel- und zerlegter Form

Die unten angeführte Abbildung 41 (S. 31) veranschaulicht die Auswirkung des Wuchsstoffes BAP auf das Wachstum des Klons 2c. In den meisten Kulturgefäßen verbräunten die Nodienexplantate, es kam in den meisten Fällen zum Absterben der Explantate oder zu der oben beschriebenen Kleinwüchsigkeit.

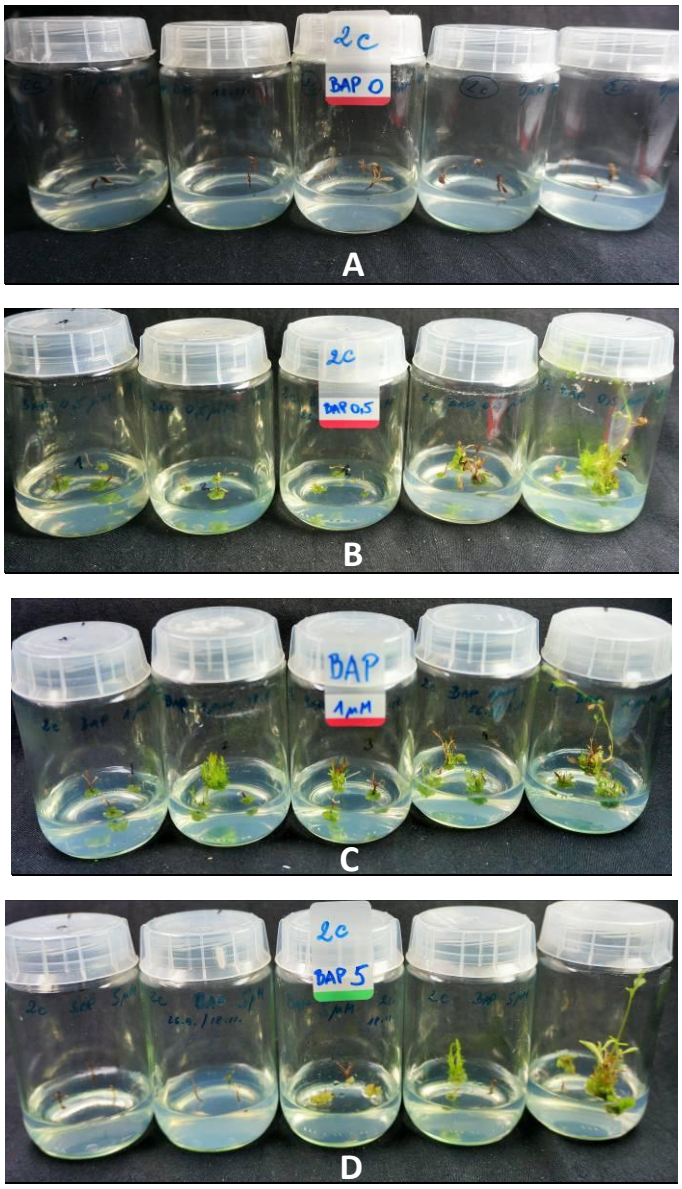


Abb. 41: Alle Versuchsreihen mit Klon 2c auf BAP-hältigen Nährmedien.
A: Kontrolle ohne Wuchsstoffe, **B**: 0,5 µM BAP, **C**: 1 µM BAP, **D**: 5 µM BAP

Inwiefern sich die unterschiedlichen Konzentrationen von BAP auf die Vermehrung des Klons 2c auswirkten, zeigt Abbildung 42 (S. 32) . Bezogen auf die Sprossanzahl war kein signifikanter Unterschied zwischen den BAP-Konzentrationen feststellbar. In den Wuchsstoff-freien Kontrollkulturen fand kein Wachstum der Explantate statt.

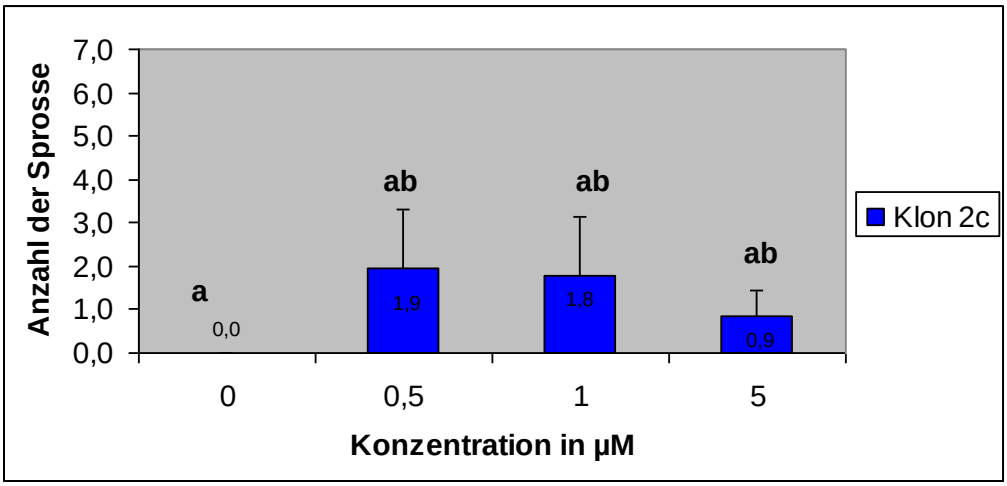


Abb. 42 : Einfluss von BAP auf die **Sprossanzahl** von Klon 2c.
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Was die Nodienbildung betrifft, so zeigte sich kein Einfluß der BAP-Konzentration auf die Anzahl an Nodien pro Explantat des Klons 2c (nur bei diesem Klon hatte sich ja ein Wachstum auf Cytokinin-hältigen Medien eingestellt), wie aus Abbildung 43 ersichtlich ist.

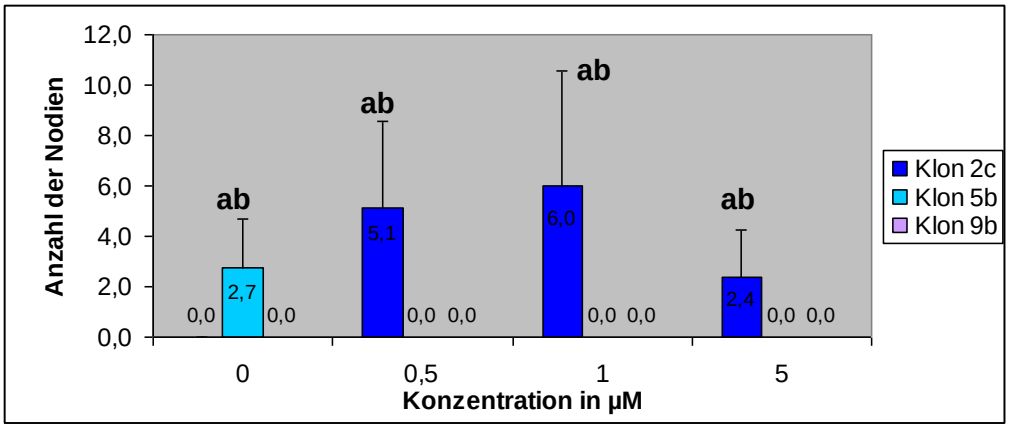


Abb. 43 : Einfluss von BAP auf die **Anzahl an Nodien** pro Explantat.
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Wie in Abbildung 44 (S. 33) dargestellt, trat die Hyperhydratisierung bei den neu gebildeten Sprossen des Klons 2c in hohem Prozentsatz auf, wobei zwischen den 3 verschiedenden BAP-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied vorlag.

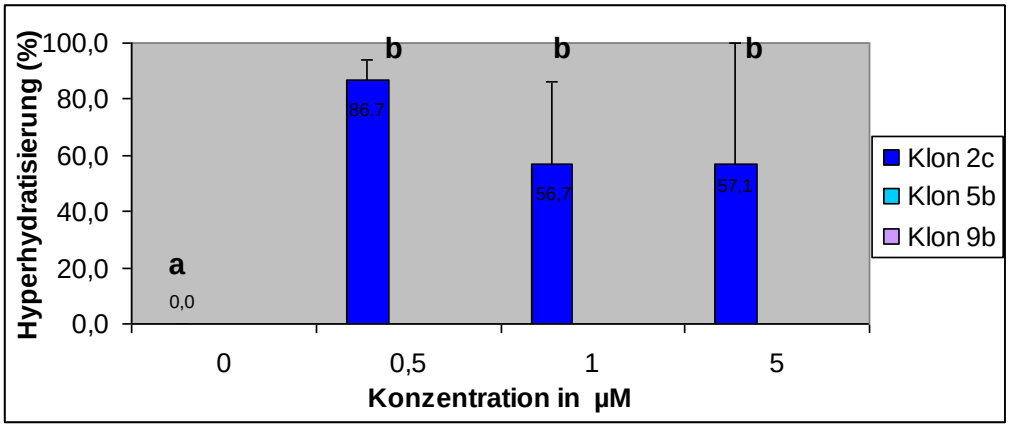


Abb. 44 : Einfluss von BAP auf die **Hyperhydratisierung.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Obwohl das Sprosswachstum bei Klon 5b und 9b auf den Medien mit BAP gänzlich ausblieb, bildete sich in den Kulturen aller drei Klone Kallusgewebe. Dabei verhielten sich die Klone heterogen: An 5 % der Explantate von Klon 5b, aber an 61,7 % bei Klon 2c zeigte sich Kalluswachstum. Bei Klon 9b betrug die Kallusbildung 35 % (Abb. 45).

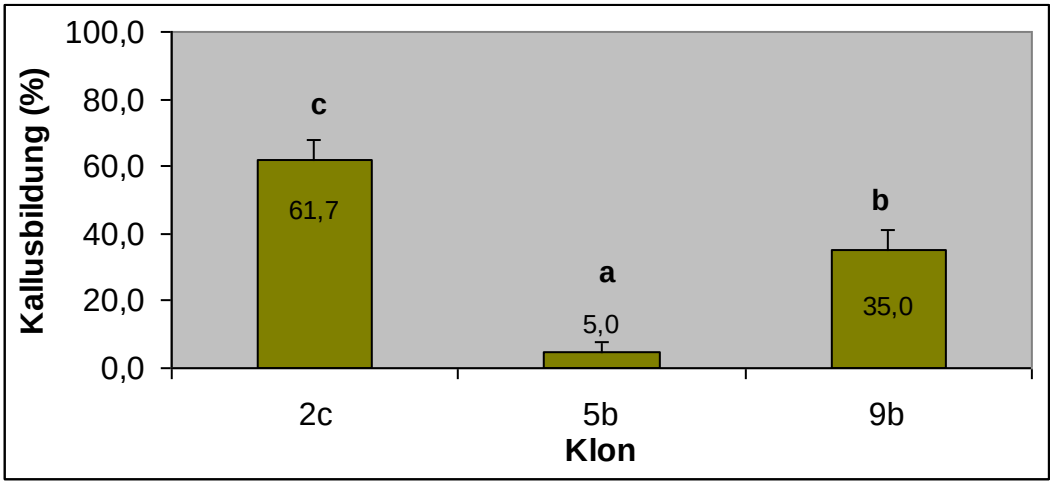


Abb. 45 : Einfluss von BAP auf die **Kallusbildung in %** je Klon.
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Der Kallusdurchmesser lag bei allen drei Klonen in der gleichen Größenordnung, wie aus Abbildung 46 ersichtlich ist.

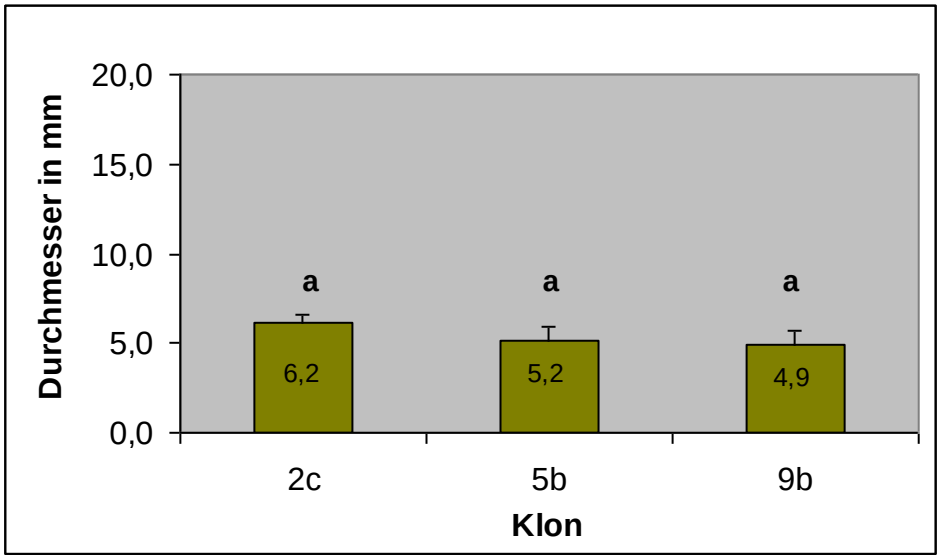


Abb. 46 : Einfluss von BAP auf die **Kallusgröße (Durchmesser)** je Klon.
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

3.4.2. Zeatin (ZEA)

Neben dem Cytokinin BAP wurde, wie bereits erwähnt, auch die Auswirkung eines zweiten Wuchsstoffes, nämlich Zeatin (ZEA), auf die Vermehrung von *Lancea tibetica* in vitro untersucht. Wie bei BAP wurden für die Versuche mit ZEA die Klonlinien 2c, 5b und 9b herangezogen, sodass die Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden konnten. Auch hier zeigte sich in den Kontrollkulturen ohne Wuchsstoff kein Wachstum. Vor der detaillierten Darstellung der erhobenen Kulturparameter sollen im Folgenden die drei Klone bezüglich ihres Wachstumsverhaltens auf Nährmedien mit ZEA kurz charakterisiert werden.

Klon 2c

Bei Klon 2c war die Anzahl neu gebildeter Sprosse im Vergleich zu den zwei anderen Klonen am geringsten. Insgesamt verdeutlichten die Ergebnisse, dass auch die Bildung von Nodien und Wurzeln durch ZEA kaum beeinflusst wurde. Höhere Konzentrationen des Wuchsstoffes verursachten lediglich eine Zunahme von Kallusbildung und Hyperhydratisierung. Die Kulturen auf ZEA-hältigen Medien sind in Abbildung 47 (S. 35) dargestellt.

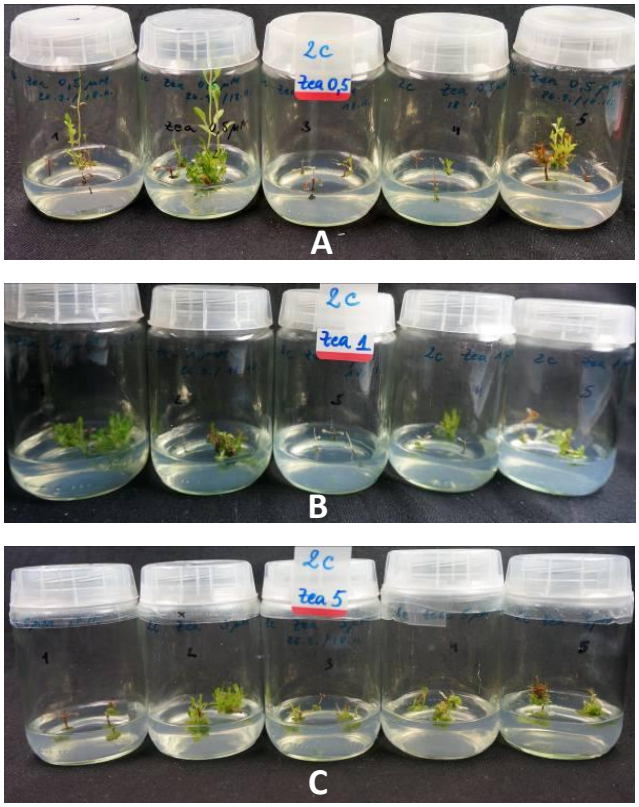


Abb. 47: Alle Versuchsreihen mit Klon 2c auf ZEA-hältigen Nährmedien.
A: 0,5 µM ZEA, **B**: 1 µM ZEA, **C**: 5 µM ZEA

Klon 5b

Im Versuch mit ZEA betreffend die Klonlinie 5b zeigte sich die höchste Sprossvermehrung mit einem Mittelwert von 20 Sprossen pro Explantat bei der Konzentration von 5 µM ZEA (Abb. 48, S. 36). Auch die höchste Anzahl an Nodien und Wurzeln wurde bei dieser Konzentration des Wuchsstoffes beobachtet. Die längsten Wurzeln (durchschnittlich 15 mm) bildeten sich auf Medium mit 1 µM ZEA aus. Von allen 3 untersuchten Klonen war Klon 5b der einzige Klon, bei dem nahezu alle eingesetzten Nodiensegmente auswertbare Resultate lieferten. Insgesamt gesehen konnten bei diesem Klon mit ZEA sehr gute Ergebnisse erzielt werden.

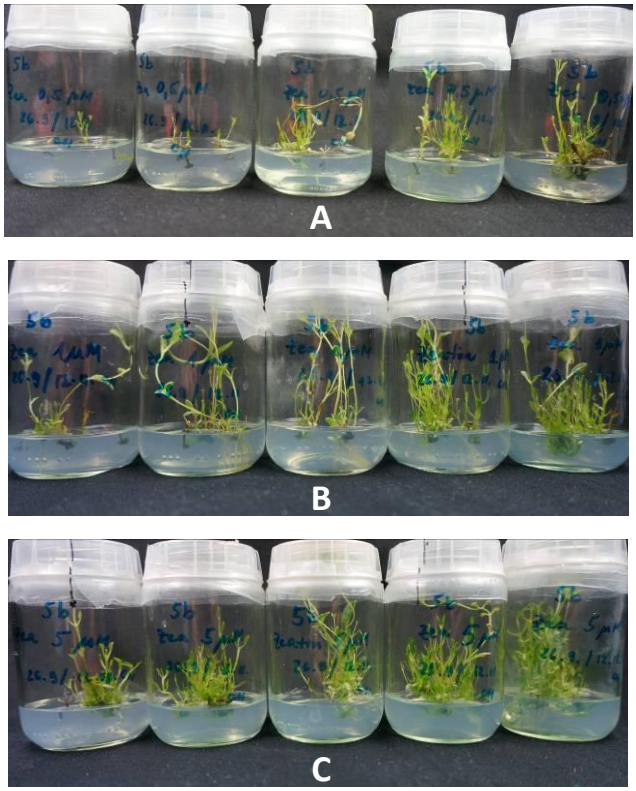


Abb. 48: Alle Versuchsreihen mit Klon 5b auf ZEA-hältigen Nährmedien.
A: 0,5 µM ZEA, **B**: 1 µM ZEA, **C**: 5 µM ZEA

Klon 9b

Mit Klon 9b konnten besonders gute Ergebnisse bei Einsatz von 1 µM ZEA erzielt werden. Erwähnenswert waren beispielsweise die Anzahl von 16 Sprossen und 32 neugebildeten Nodien pro Explantat sowie eine durchschnittliche Sprosslänge von 55 mm. Auch ein Maximum von 5,6 Wurzeln pro Explantat wurde beim Einsatz von 1 µM ZEA festgestellt. Bezüglich des Auftretens von Hyperhydratisierung gab es keinen signifikanten Zusammenhang mit der Konzentration des Wuchsstoffes. In Abbildung 49 (S. 37) sind die Versuchsreihen mit Klon 9b dargestellt.

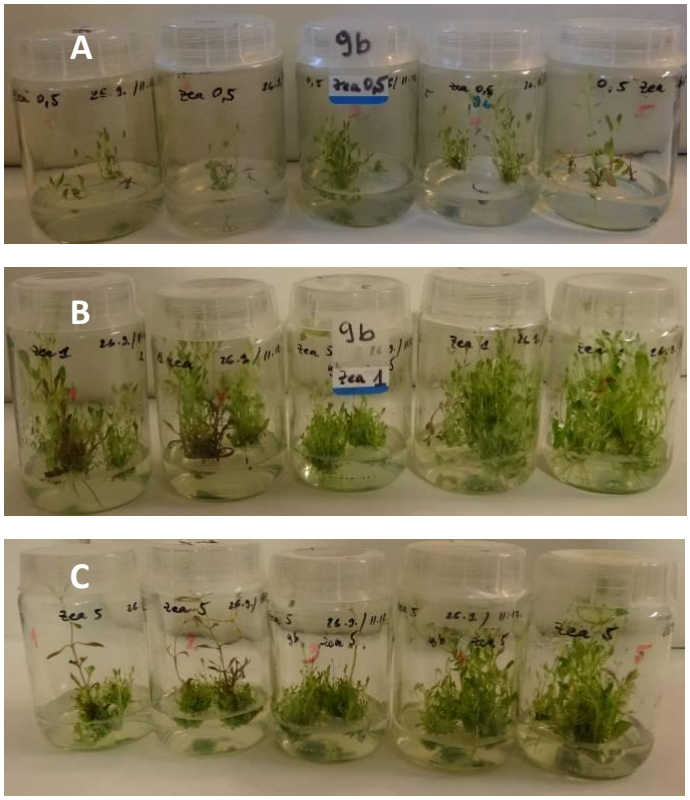
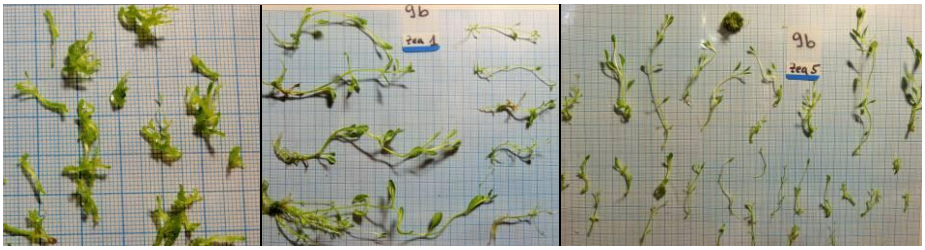


Abb. 49: Alle Versuchsreihen mit Klon 9b auf ZEA-hältigen Nährmedien.
A: 0,5 µM ZEA, **B**: 1 µM ZEA, **C**: 5 µM ZEA

Bild A in der unten angeführten Abbildung 50 (S. 38) illustriert ein besonderes Entwicklungsmerkmal der Sprosse, das während der Auswertung der Kulturen beobachtet wurde. Bei diesen sehr kleinwüchsigen gestauchten Sprossen waren die einzelnen Nodien oder Seitensprosse nicht mehr eindeutig erkennbar. Wegen dieser Eigenschaft war eine Zählung bzw. Messung der Sprosse nicht möglich. Dieses morphologische Charakteristikum führte bei Klon 9b auf Medium mit 5 µM ZEA (Abb. 49 C) zu einer ausgeprägteren und dichteren Clusterbildung als bei Klon 5b und 5 µM ZEA (Abb. 48 C, S. 36). Dies ließ zwar auf ein höheres Sprosswachstum schließen, jedoch zeigte sich nach statistischer Auswertung, wie weiter unten beschrieben, eine niedrigere Vermehrungszahl für Klon 9b, da viele Explantate wegen dieser Kleinwüchsigkeit nicht auswertbar waren.



A **B** **C**

Abb 50: Einzelsprosse von Klon 9b verschiedener Größen und Längen.
A: nicht auswertbare Sprosse, **B**: Sprosse aus der Versuchsreihe mit 1 µM ZEA,
C: Sprosse aus der Versuchsreihe mit 5 µM ZEA

Die eigentliche Vermehrungsphase setzte generell in der 6. bis 7. Kulturwoche ein, zwischen der dritten und fünften Woche ließ sich nur ein schwaches Sprosswachstum erkennen (Abb. 51).

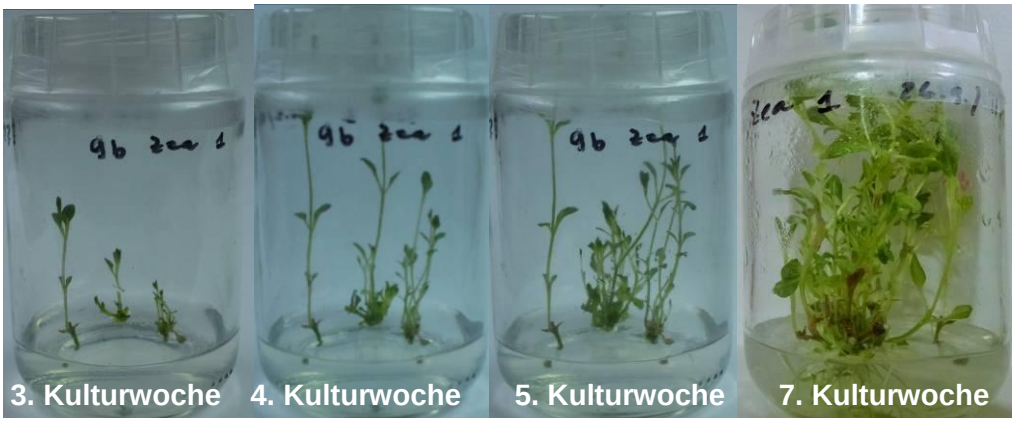


Abb. 51: Nodienkulturen von Klon 9b nach 3, 4, 5 und 7 Wochen auf Medium mit 1 µM ZEA

Ergebnisse aus statistischer Evaluierung der gemessenen Daten

Die statistische Auswertung der Entwicklung der Kulturen auf Medien mit ZEA (Abb. 52, S. 39) ergab, dass die untersuchten Klone bezüglich der Sprosszahl durchgehend heterogen reagierten. Bei Klon 2c hatte die Erhöhung der ZEA-Konzentration keine Auswirkung auf die Sprossvermehrung, bei den beiden anderen kam es wiederum zu einem starken Einfluss, wobei Klon 9b bei 1 µM ZEA die meisten Sprosse bildete, Klon 5b bei 5 µM ZEA die höchste Sprossbildung aufwies. Auf dem Kontrollmedium ohne ZEA blieb die Sprossbildung aus (Abb. 52, S. 39), dies verdeutlichte nochmals, dass in Nodienkulturen von *Lancea tibetica* grundsätzlich den Einsatz von Wuchsstoffen notwendig war.

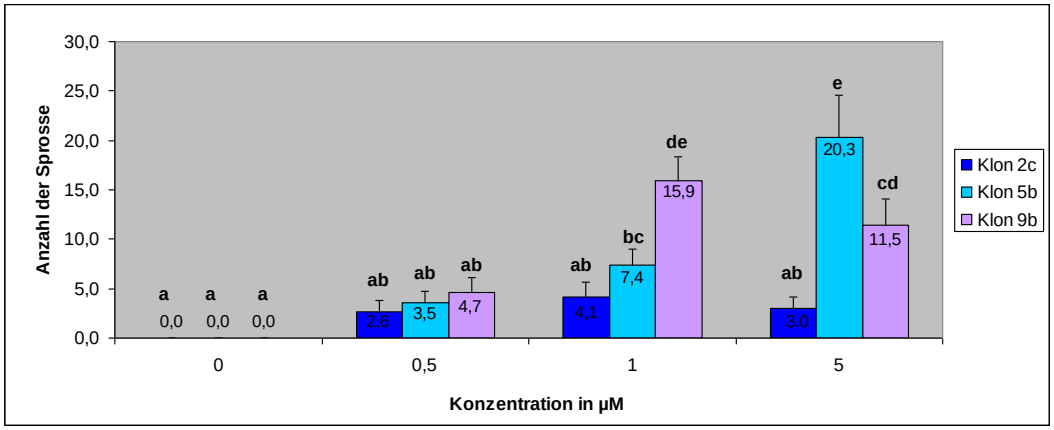


Abb. 52 : Einfluss von ZEA auf die **Sprossanzahl.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Bezüglich der durchschnittlichen Sprosslängen zeigten sich bei 0,5 µM ZEA keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Klonen (Abb. 53). Im Gegensatz dazu kam es bei der Konzentration von 1 µM ZEA zur Ausbildung von sehr kurzen (Klon 2c) als auch ausgesprochen langen (Klon 9b) Sprossen. Unabhänging von der Wuchsstoffkonzentration bildeten sich bei Klon 2c generell nur sehr kurze Sprosse aus.

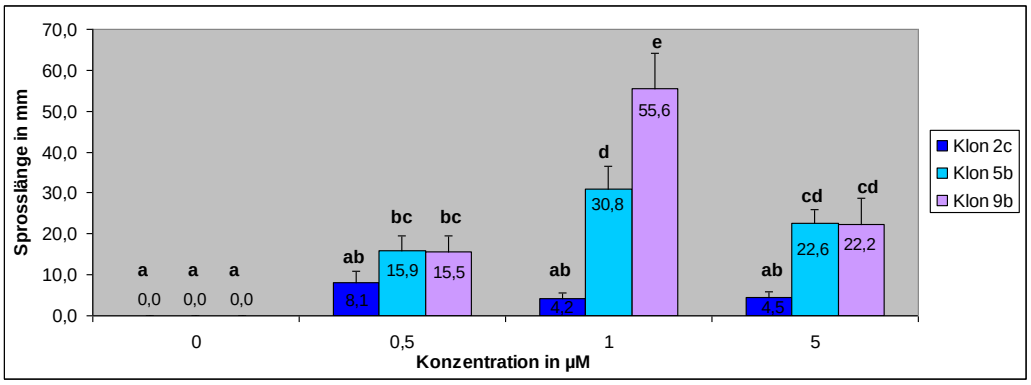


Abb. 53 : Einfluss von ZEA auf die **Sprosslänge.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Für die Weitervermehrung der kultivierten Klone ist die Anzahl an neu gebildeten Nodien ein wichtiger Parameter. Diesbezüglich zeigte sich vor allem bei Klon 5b die signifikant höchste Anzahl an Nodien (57,7) auf Medium mit 5 µM ZEA (Abb. 54, S. 40). Nur wenig Nodien bildeten sich bei Klon 2c aus, die Konzentration an Wuchsstoff schien dabei keinen signifikanten Einfluss zu haben. Eine Konzentration von 1 µM ZEA führte bei Klon 9b zur maximale Nodienanzahl. Die Heterogenität des

Wachstumsverhaltens der untersuchten Klone von *Lancea tibetica* war auch hier deutlich sichtbar.

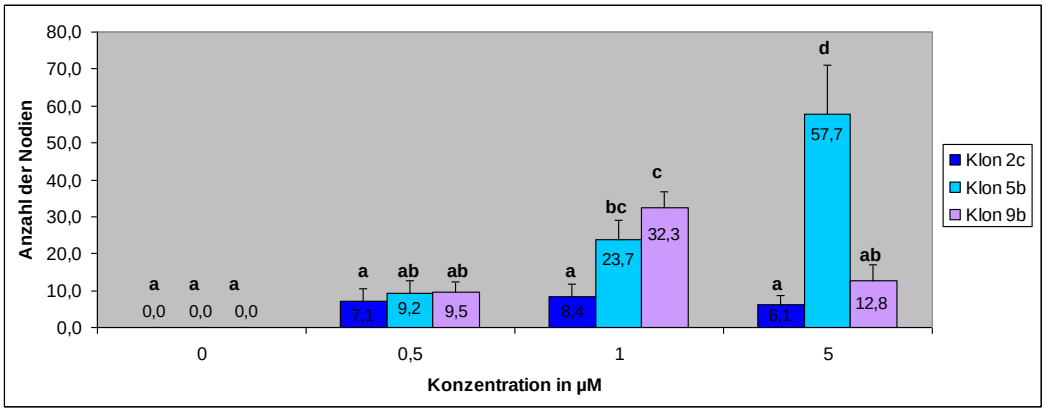


Abb. 54 : Einfluss von ZEA auf die **Anzahl der Nodien.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Wertesind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Der Einfluss von ZEA, das als Cytokinin vorwiegend Sprossbildung und –vermehrung fördert, zeigte sich auch bei der Wurzelbildung in statistisch relevantem Ausmaß. Die Anzahl der gebildeten Wurzeln bei Klon 5b nahm klar erkennbar mit steigender ZEA Konzentration zu. Die im Durchschnitt höchste Wurzelanzahl pro Explantat betrug 6,3 auf Medium mit 5 µM ZEA. Die zweithöchste Wurzelanzahl (5,6) wurde bei Klon 9b auf Medium mit 1 µM ZEA gemessen. Nicht in allen Versuchsreihen kam es zur Wurzelbildung. Beispielsweise bildeten die Explantate der Klone 9b und 2c auf den Nährmedien mit 5 µM ZEA auch nach 7 Wochen keinerlei Wurzeln (Abb. 55, S. 41).

Während ZEA eine Konzentration von 5 µM bei Klon 5b in der höchsten Anzahl an Wurzeln resultierte, bildeten sich bei 1 µM des Wuchsstoffes die längsten Wurzeln aus (Abb. 56, S. 41). Bei 5 µM ZEA waren die Wurzeln dieses Klons kürzer, allerdings nicht in statistisch signifikantem Ausmaß. Explantate von Klon 9b hingegen zeigten nur auf Medium mit 1 µM ZEA optimale Wurzelbildung.

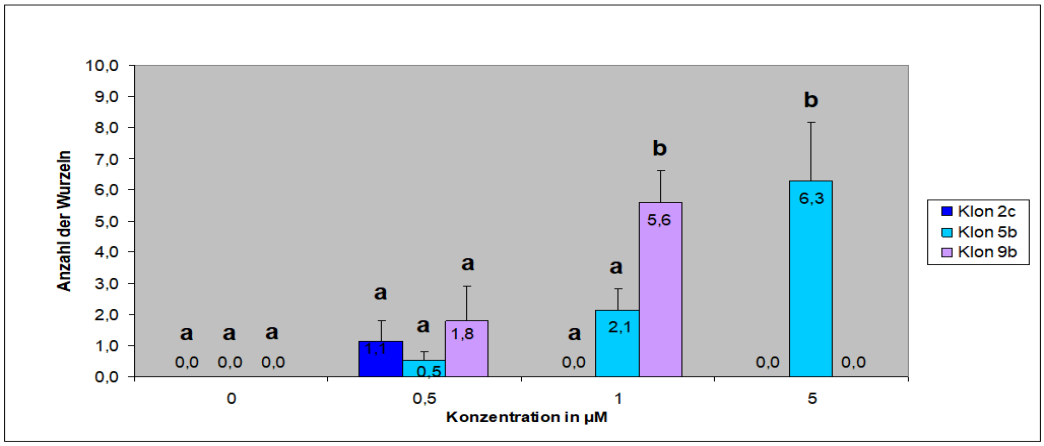


Abb. 55 : Einfluss von ZEA auf die **Wurzelanzahl.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

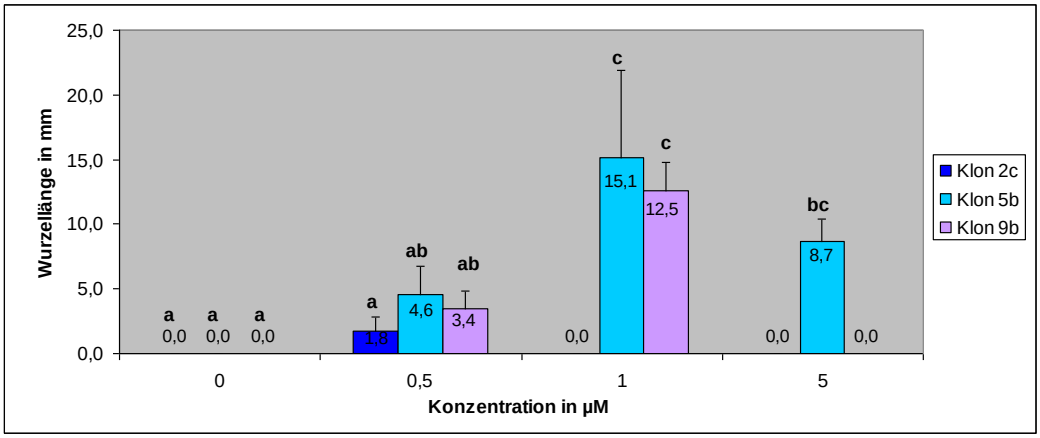


Abb. 56 : Einfluss von ZEA auf die **Wurzellänge.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Einzelwurzeln oder Wurzelaggregate mit charakteristischen weißlich-filzigen Wurzelhaaren konnten wir bei Klon 5b und Klon 9b beobachten (Abb. 57).

Abb. 57: links Einzelwurzel, **rechts** Wurzelaggregate

Als positives, erwünschtes Vermehrungsmerkmal wurde die kräftige Clusterbildung von neu gebildeten Sprossen angesehen. In dieser Hinsicht ergab unsere Auswertung, dass vor allem Klon 9b bei 1 µM als auch 5 µM ZEA eine ausgeprägte Büschelbildung aufwies (Abb. 58).

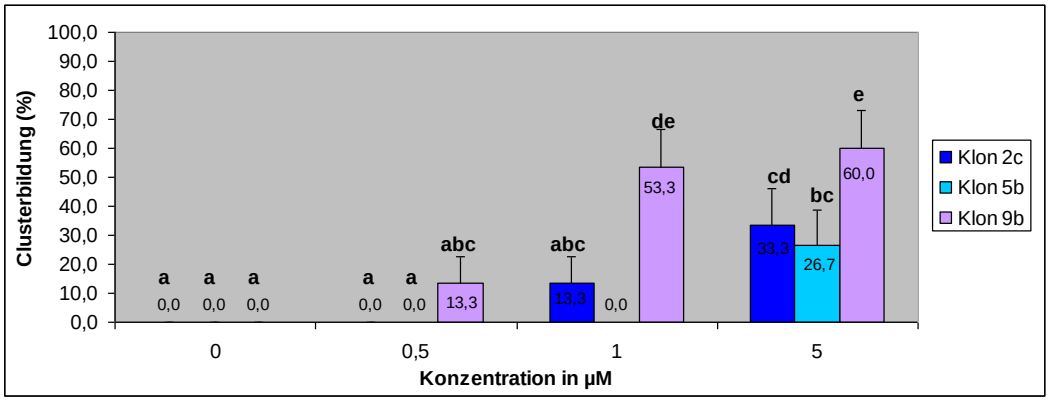


Abb. 58 : Einfluss von ZEA auf die **Clusterbildung.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen erwies sich bei allen drei Klonen als relativ hoch und als weitgehend unabhängig von der Konzentration an ZEA. Während die Hyperhydratisierung bei den Klonen 5b und 9b zwischen 20 und etwa 50 % lag, waren bis zu knapp 90 % der Sprosse von Klon 2c von dieser Anomalie betroffen (Abb. 59).

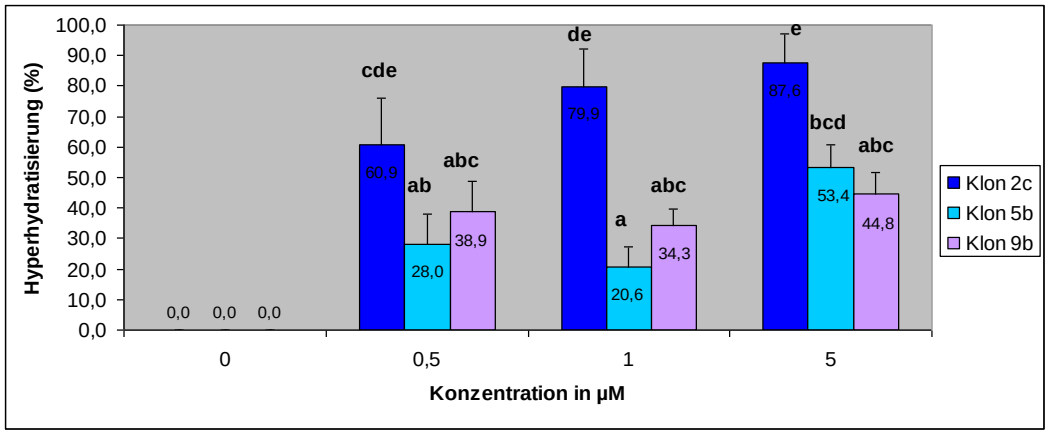


Abb. 59: Einfluss von ZEA auf die **Hyperhydratisierung.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

In allen Kulturen konnte die Bildung von Kallusgewebe beobachtet werden: Bei jeder der getesteten Konzentrationen an ZEA traten kugelförmige Gewebewucherungen am basalen Ende der Explantate auf. Bereits bei Zusatz von 0,5 µM des Wuchsstoffes zeigte sich an etwa 40 % der Explantate Kallusbildung,

bei 5 µM ZEA waren etwa 80 % der Ausgangsnodien betroffen. Wie aus Abbildung 60 ersichtlich korrelierte die ZEA-Konzentration mit dem Durchmesser des basalen Kallusaggregates, alle drei untersuchten Klone zeigten dabei ein ähnliches Verhalten.

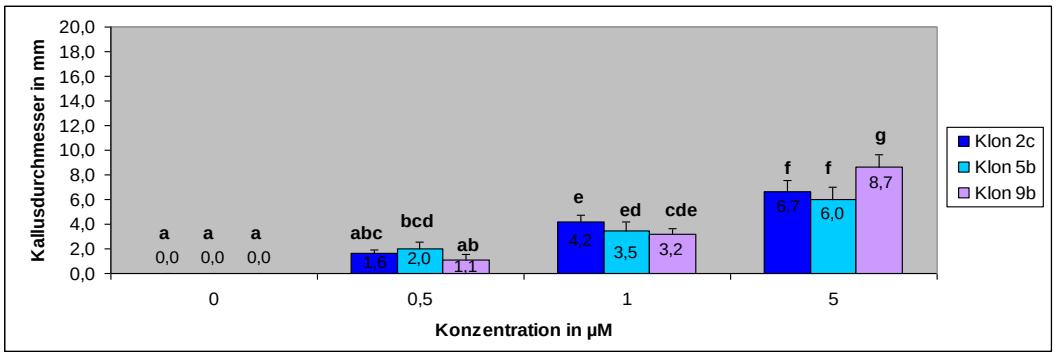


Abb. 60 : Einfluss von ZEA auf den **Kallusdurchmesser**.
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

3.4.3. BAP und ZEA im Vergleich

Insgesamt zeigte sich aus den durchgeführten Versuchen, dass mit dem Wuchsstoff ZEA in vieler Hinsicht wesentlich bessere Resultate als mit BAP erzielbar waren. Wir mussten grundsätzlich feststellen, dass die auf BAP-hältigen Nährmedien kultivierten Nodienexplantate deutlich häufiger zum Absterben neigten. Dadurch standen in der Folge nicht genug Ausgangsexplantate für eine aussagekräftige statistische Auswertung zur Verfügung bzw. konnte die Standardstichprobengröße (n=15) nicht eingehalten werden. Im Gegensatz zu ZEA stellte sich BAP bei allen drei untersuchten Klonen als ungeeignet heraus, Sprossvermehrung und Wurzelbildung anzuregen.

Die folgende Abbildung 61 (S. 44) verdeutlicht den Unterschied des Einflusses von ZEA und BAP auf die Anzahl an Sprossen pro Explantat bei den drei Klonen. Hier zeigte sich ZEA besonders bei den Klonen 5b und 9b als deutlich besser geeignet.

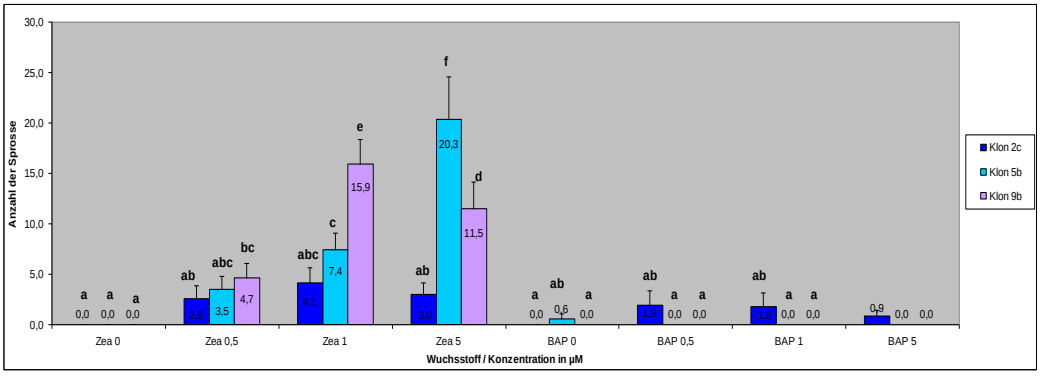


Abb. 61 : Einfluss von ZEA und BAP im Vergleich auf die **Sprossanzahl**. Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die nachfolgenden Abbildungen 62 sowie 63 (S. 45) und 64 (S. 45) lassen erkennen, dass nur die auf Nährmedien ZEA regenerierten Sprosse für die Weitervermehrung geeignet waren, da sie sich bezüglich Sprosslänge, Nodien- und Wurzelbildung gut entwickelten. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Bildung von Sprossen, Nodien und Wurzeln schon bei geringer Konzentration an ZEA stattfand.

Das Cytokinin BAP wirkte sich hingegen in allen Konzentrationen nur in sehr geringem Maße auf Sprosslänge (Abb. 62) und Nodienbildung (Abb. 63, S. 45) aus. Es konnte keine Wurzelbildung in den BAP-hältigen Nährböden beobachtet werden (Abb. 64, S. 45).

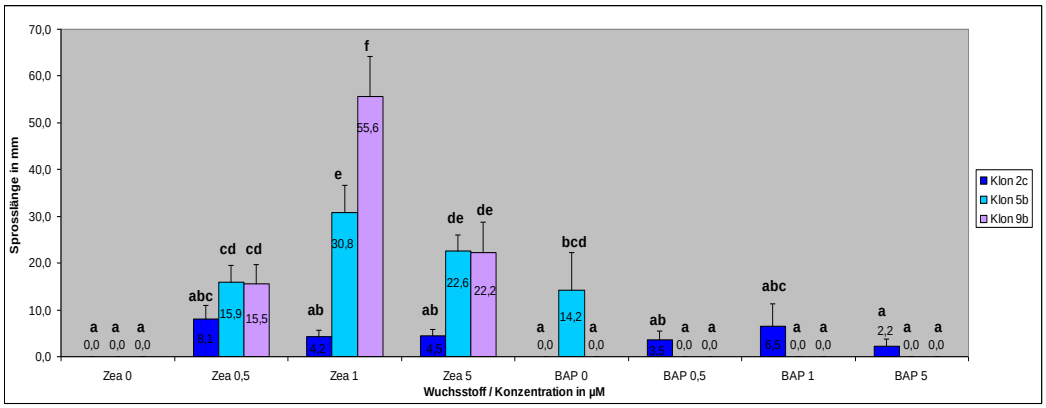


Abb. 62 : ZEA und BAP im Vergleich der **Sprosslänge** in jeweiligen Konzentrationen. Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

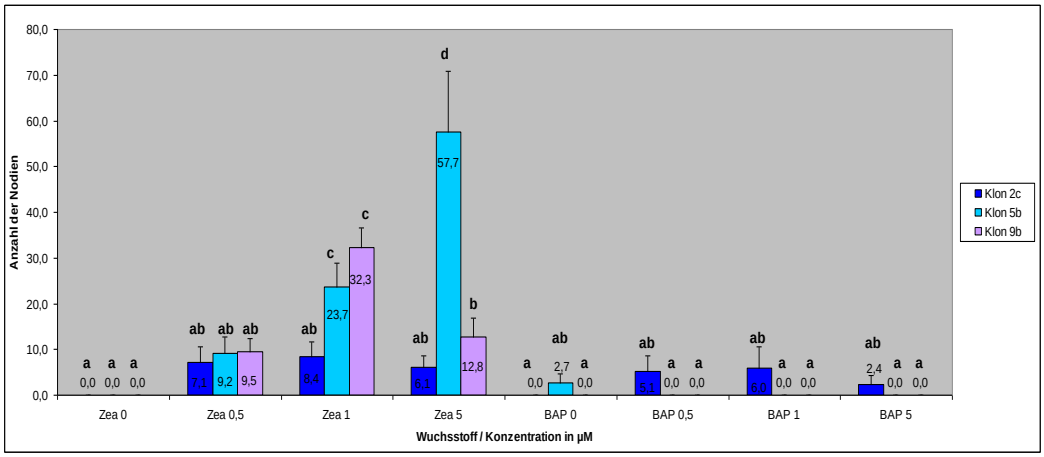


Abb. 63: ZEA und BAP im Vergleich der **Nodienanzahl** in den jeweiligen Konzentrationen. Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

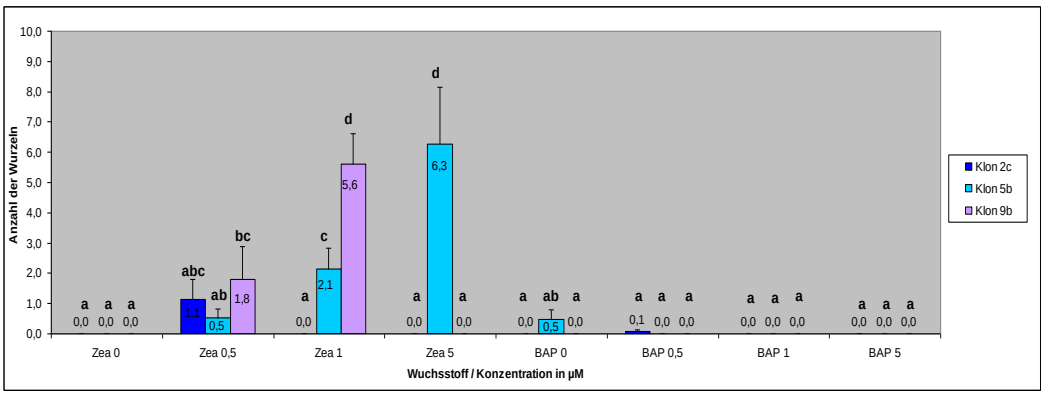


Abb. 64 : ZEA und BAP im Vergleich der **Wurzelanzahl** in den jeweiligen Konzentrationen. Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

3. 5. Vorversuch zur Bewurzelung von Sprossen mit ß-Indolylbuttersäure (IBA)

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden auch erste Versuche zur Wurzelbildung an in vitro-vermehrten Sprossen von *Lancea tibetica* durchgeführt. Zur in vitro-Bewurzelung können die Auxine IAA, IBA oder NAA eingesetzt werden (Pierik, 1987). Die Eignung von IAA war von Osmen (2015) untersucht worden, in unser Arbeit setzten wir den Wuchsstoff IBA ein, der in Konzentrationen von 1 µM und 5 µM an Sprossspitzen der Klone 2c, 5b und 9b getestet wurde. Jeweils drei Explantate wurden pro Kulturglas inokuliert, und wir beimpften 5 Gläser pro Konzentration an IBA. Am Ende der Kulturdauer von 7 Wochen kamen wir zum Ergebnis, dass das Auxin IBA für die Sprossbewurzelung von *Lancea tibetica* nicht geeignet scheint.

In zwei der drei eingesetzten Klone wurde Sprosswachstum, jedoch nur sehr selten eine Wurzelbildung festgestellt. Alle Explantate des Klons 9b verfärbten sich im Laufe der Kultivierung und starben ohne Wurzel- und Kallusbildung schliesslich ab (Abb. 65).

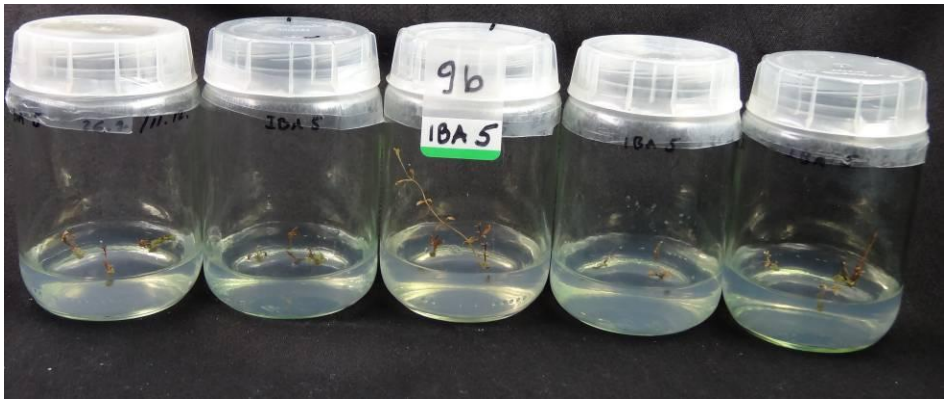


Abb. 65: Sprossspitzenexplantate von Klon 9b auf Nährmedium mit 5 µM IBA nach 7 Wochen Kulturdauer

Anders als bei den Versuchen mit den Cytokininen BAP und ZEA, wo Nodienexplantate auf hormonfreien Nährmedien kein Wachstum gezeigt hatten, war bei dem Versuch mit IBA in den Kontrollkulturen ohne Wuchsstoff die Bildung einiger langer Einzelsprosse ohne Seitentriebe zu beobachten. Statistisch gesehen lag so bei Klon 2c die Sprossanzahl in der Kontrolle höher als auf den auxinhältigen Nährmedien, obwohl Auxine generell die Sprosselongation fördern (Abb. 66, S. 47).

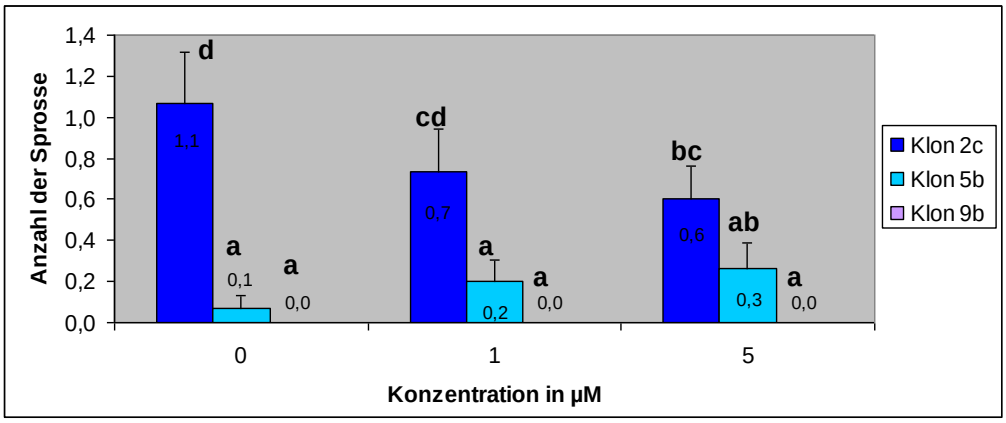


Abb. 66 : Einfluss von IBA auf die **Sprossanzahl.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die meisten Ausgangssprosse des Klons 5b zeigten bereits ab der 2. bis zur 7. Kulturwoche schnelles Längenwachstum (Abb. 67), charakterisiert durch die deutlich erhöhte Sprosselongation. Dies entsprach der funktionellen Eigenschaft des Auxins IBA nämlich das zelluläre Streckungswachstum der Pflanzen zu fördern. Eine multiple Sprossbildung konnte durch das eingesetzte IBA nicht angeregt werden.

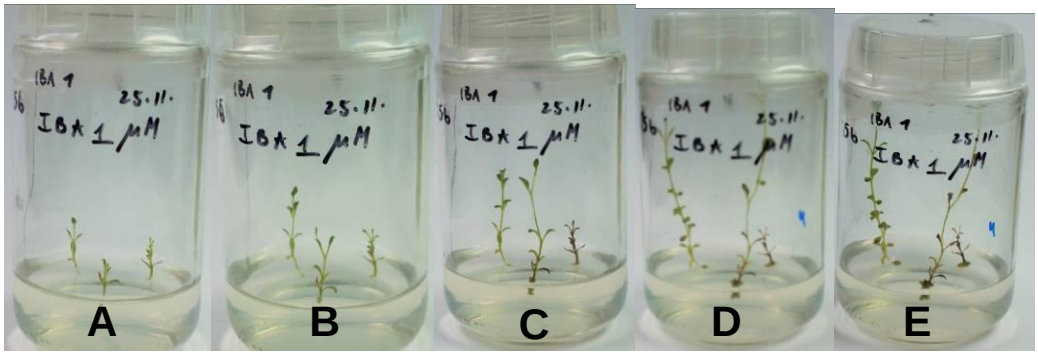


Abb. 67: Entwicklung der Sprossspitzenexplantate von Klon 5b auf Nährmedium mit 1 µM IBA; **A:** 1 Woche**, B:** 2 Wochen**, C:** 3 Wochen**, D:** 6 Wochen**, E:** 7 Wochen Kulturdauer

Das Sprosswachstum der Explantate von Klon 2c war unter Einfluss von IBA generell stärker ausgeprägt als jenes von Klon 5b, wobei allerdings keine signifikante Differenz der Ergebnisse zwischen den einzelnen IBA-Konzentrationen innerhalb einer Klonlinie beobachtet werden konnte. Die Sprosse von Klon 2c auf Nährböden mit 1 µM IBA waren signifikant länger als die von allen Versuchsansätzen des Klons 5b (Abb. 68, S. 48). Eine Konzentration von 5 µM IBA führte bei beiden Klonen zu einer Abnahme der Sprosslänge, die allerdings nicht statistisch signifikant war.

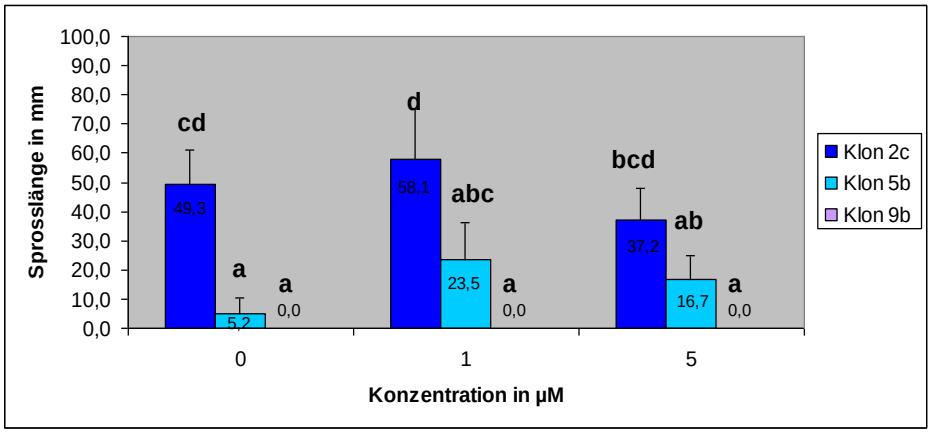


Abb. 68 : Einfluss von IBA auf die **Sprosslänge.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Der Einsatz von IBA führte zur Ausbildung von auffällig langen Internodien, wie aus Abbildung 69 ersichtlich ist.

Abb. 69: Sprosse von Klon 2c mit langen Internodien nach Kultivierung auf Medium mit 1 µM IBA.

Die folgende Abbildung 70 (S. 49) zeigt, dass die höchste Nodienanzahl bei Klon 2c auf Kontrollmedium ohne Auxin erreicht wurde, die Abnahme der Nodienanzahl auf Medium mit 1 und 5 µM IBA war statistisch nicht signifikant. Die Explantate von Klon 5b bildeten sowohl in der Kontrolle als auch auf den Auxinmedien deutlich weniger Nodien aus.

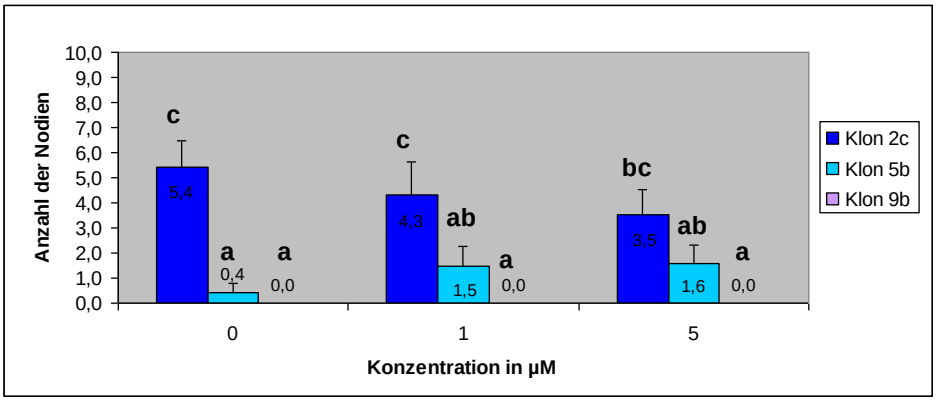


Abb. 70 : Einfluss von IBA auf die **Anzahl der Nodien.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Zum eigentlichen Ziel dieses Vorversuchs, der Bewurzelung von Sprossexplantaten, lässt sich festhalten, dass es bei keinem der getesteten Klonen auf Medien mit 1 oder 5 µM IBA zur Wurzelbildung kam (Abb. 71). Lediglich in den Kontrollkulturen ohne Auxin trat bei den Klonen 2c und 5b vereinzelt die Bildung von nur wenigen Wurzeln auf. Wie bereits erwähnt, konnten wir bei Klon 9b weder Spross- noch Wurzelwachstum feststellen, alle Explantate starben innerhalb der Kulturdauer von 7 Wochen ab.

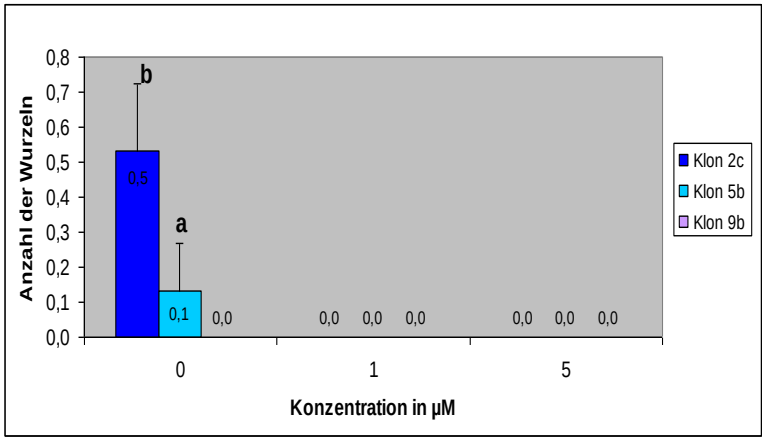
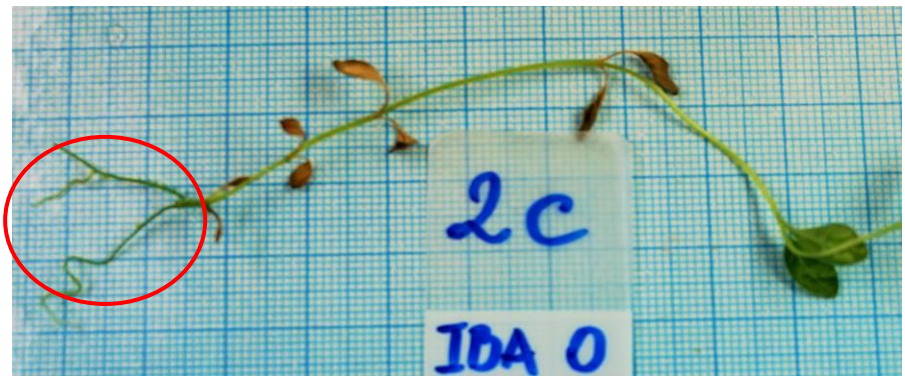


Abb. 71 : Einfluss von IBA auf die **Anzahl der Wurzeln.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Abbildung 72 (S. 50) zeigt den Einfluss von IBA auf die Wurzellänge sowie einen bewurzelten Spross von Klon 2c nach Kultivierung auf Kontrollmedium ohne Auxin.



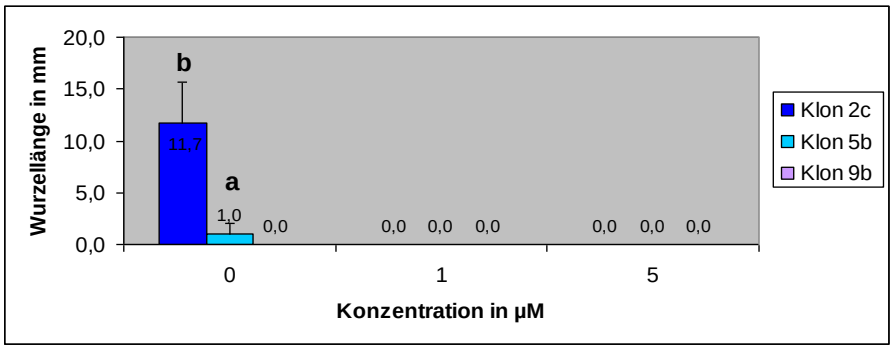


Abb. 72 : Einfluss von IBA auf die **Wurzellänge**. Oben: Auf Kontrollmedium bewurzelter Spross von Klon 2c.
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Bei der Anwendung von IBA wurde zwar keine Bewurzelung, jedoch die Bildung von Kallus induziert (Abb. 73). Die Häufigkeit der Kallusbildung war dabei nicht von der Konzentration an IBA abhängig, jedoch war sie bei Klon 2c signifikant höher ausgeprägt als bei Klon 5b. Auf den Nährmedien ohne Auxin wurde keine Kallusbildung beobachtet.

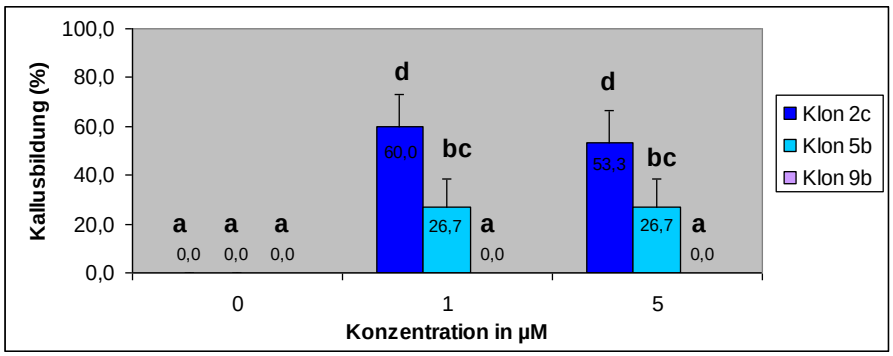


Abb. 73 : Einfluss von IBA auf die **Kallusbildung.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die Mittelwerte der Kallusdurchmesser lagen zwischen 2,9 und 4,1 mm, ohne dass es jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Medien mit 1 und 5 µM IBA gab (Abb. 74).

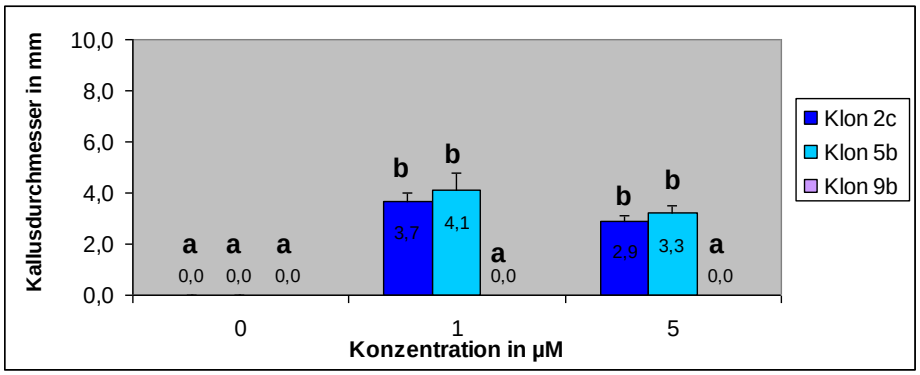


Abb. 74 : Einfluss von IBA auf den **Kallusdurchmesser.**
Ermittlung der Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichen Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Abbildung 75 auf Seite 52 gibt einen zusammenfassenden Überblick über den Vorversuch zur Bewurzelung mit IBA.

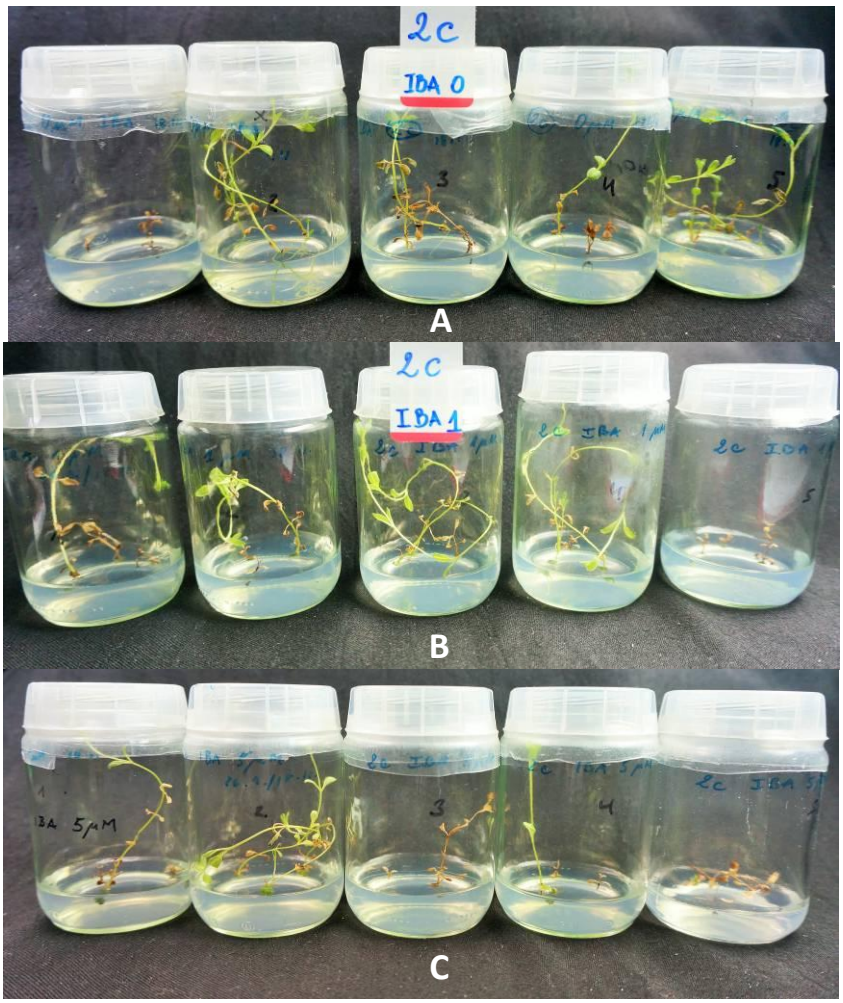


Abb. 75: Alle Versuchsreihen des Klons 2c auf IBA-hältigen Nährmedien.
A: Kontrolle ohne Wuchsstoffe, **B**: 1 µM IBA, **C**: 5 µM IBA

4. Diskussion

Die Pflanze *Lancea tibetica* zählt aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungen zu den wichtigen Heilpflanzen in der traditionellen Volksmedizin Tibets (Liu et al., 2015). Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der in vitro-Kultivierung der Pflanze ausgehend von Sprosskulturen dreier Klonlinien, die von Dr. D. Gaamaa (Department of Biology, National University of Mongolia) ursprünglich aus Samen etabliert worden waren. Im Zuge der Ausarbeitung eines Protokolls für die Mikrovermehrung von *L. tibetica* untersuchten wir den Einfluss von Explantattyp, Ionenstärke des Mediums und Kultivierungstemperatur sowie der Cytokinine BAP und Zeatin auf diverse Wachstumsparameter in vitro. Ausserdem wurde die Eignung des Auxins IBA für die Bewurzelung von in vitro-vermehrten Sprossen getestet. In einer parallel durchgeführten Arbeit kamen andere Klonlinien sowie die Wuchsstoffe 2iP und IAA zum Einsatz (Osmen, 2015).

In einem ersten Experiment untersuchten wir den Einfluss von Explantattyp (Spross- oder Nodienexplantat) und Ionenstärke des Nährmediums auf die Vermehrung. Dazu kam das Basismedium nach Murashige und Skoog (1962) zum Einsatz. Nachdem dieses Nährmedium eine vergleichsweise hohe Ionenstärke aufweist, welche für Wachstum und Entwicklung in vitro nicht immer optimal ist (Pierik, 1987), wandten wir es in 3 Variationen an (volle, halbierte und geviertelte Konzentration der Makroelemente), als Wuchsstoff verwendeten wir Kinetin in einer Konzentration von 1 µM. Nicht nur ein Nodiensegment, eine Sprossspitze oder ein ganzes Sprossexplantat besitzen das Potential zu Wachstum und Vermehrung in vitro, sondern auch ein isoliertes Stück von Blatt, Wurzel oder Rhizom beispielsweise lässt sich auf geeignetem Wuchsstoff-hältigen Nährmedium zu einer vollständigen Pflanze regenerieren (Behar et al., 2014, Sharma et al., 2010). In unseren Versuchen konnten wir einen eindeutigen Trend feststellen, dass nämlich die Etablierung von Sprossexplantaten, im Gegensatz zum Nodientyp, in deutlich höheren Zuwachsraten an neu gebildeten Sprossen resultierte, solange die Ionenstärke des Mediums ausreichend hoch war. Auch hinsichtlich der Nodienbildung und des Längenwachstums der Sprosse und Wurzeln lieferten Sprossexplantate wesentlich bessere Resultate als der Einsatz von Nodien. Die richtige Ionenstärke im Nährmedium scheint jedoch nicht das alleinige Kriterium für eine erfolgreiche Vermehrung zu sein. Die Sprossspitzentechnik dient dazu, Knospen, die sich meistens in den Sprossspitzen befinden, zu Seitensprossen auszutreiben. Der Erfolg ist allerdings von der Apikaldominanz abhängig: Wenn diese zu stark ausgeprägt ist, wird die Hauptachse unverzweigt weiterwachsen und es werden lediglich lange Einzelsprossen entstehen. Daher wird durch Zufuhr von

Cytokininen versucht, die apikale Dominanz zu brechen (Heß, 1992). Zum Beispiel erhielten Ayenew et al. (2012) mit Sprossspitzen von *Zingiber officinale* auf kinetinhältigem Basismedium die höchste Sprossanzahl (7 pro Explantat) und das höchste Längenwachstum, während bei Einsatz von BAP nur eine große Anzahl an Blättern gebildet wurde. Auch Mosleh und Khetam (2010) berichteten über den Einsatz einer Kombination von BAP und IAA bei der Kultivierung von Sprossspitzen und Nodien von *Gardenia jasminoides*. Wenn sich die Apikaldominanz mit Cytokininen nicht aufheben lässt, steht auch die sogenannte Nodientechnik zur Verfügung. Hier wird durch Entfernung der Sprossspitzen die Apikaldominanz gebrochen und die Achselknospen zur Ausbildung von Seitensprossen angeregt (Heß, 1992).

Nicht nur für Nodien- oder Sprosskulturen spielt die Ionenstärke des Nährmediums eine wichtige Rolle. Auch zur Etablierung von Kalluskulturen von *Atriplex halimus* wurden unterschiedliche Konzentrationen an Makroelementen ohne Einsatz von Phytohormonen getestet (Ouarda, 2005). Auf allen Medien (volle, halbe, 1/5 und 1/10 Konzentration an Makroelementen) bildete sich Kallusgewebe, wobei sich Medium mit halbkonzentrierten Makroelementen am besten eignete. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Faria (2005). Auch hier wurden beim Versuch, die Ionenstärke zu modifizieren, unterschiedliche Auswirkungen beobachtet. Bei *Catasetum fimbriatum* bewirkte halbkonzentriertes MS-Medium das größte Streckungswachstum von Spross und Wurzeln, während Medium mit einem Viertel der Konzentration an Makroelementen in der geringsten Wurzelbildung resultierte. Bei *Cyrtopodium paranaensis* führte halbkonzentriertes MS-Medium ebenfalls zu den längsten Sprossen, Wurzelanzahl und -länge waren jedoch auf Viertel-MS Medium optimal. In unseren Untersuchungen kamen wir zum Ergebnis, dass das kinetinhältige Medium MS 4 (halbe Ionenstärke) im Vergleich zu den beiden anderen Medien MS 3 (Voll-MS) und MS 5 (viertelreduzierte Ionenstärke) nur zu einer geringfügig besseren Bildung von Sprossen und Wurzeln führte. Bei einem Klon waren die beiden Medien MS 3 und MS 4 gleich gut wirksam. Hinsichtlich der Bewurzelung konnte auf Medium MS 5 mit der geringsten Salzkonzentration zwar keine starke Wurzelbildung erzielt werden, es induzierte jedoch das stärkste Längenwachstum der Wurzeln. Insofern entsprachen unsere Resultate zum Beispiel den Ergebnissen von Yaowapha et al. (2013), die ebenfalls berichteten, dass die Bewurzelungsraten von *Smilax corbularia* auf halb- und viertelkonzentriertem MS-Medium vergleichbar hoch waren. Interessant war dabei auch die Erkenntnis, dass BAP sowohl in vollem als auch in halbkonzentriertem MS-Medium zu wesentlich höheren Vermehrungsraten führte als Kinetin.

Bezüglich der Fragestellung, ob die Konzentration an Makroelementen mit der Hyperhydratisierung im Zusammenhang steht, machten wir die Feststellung, dass bei Klon 9b die Hyperhydratisierungsrate auf allen drei getesteten Nährmedien mit durchschnittlich etwa 40 % gleich hoch war. Bei Klon 11a war auf Medium MS 4 deutlich öfter (etwa 73 %) Hyperhydratisierung festzustellen als auf den beiden anderen Medien. Da nur dieser Klon betroffen war, konnte mit unserem Versuch nicht eindeutig belegt werden, dass bei *L. tibetica* eine hohe Ionenstärke in verstärkter Hyperhydratisierung resultiert. Wie später noch weiter ausgeführt zeigte sich jedenfalls, dass die von uns untersuchten Genotypen unterschiedliches Wachstumsverhalten in vitro aufwiesen. Auch Patchounkova (2002) konnte bei *Picrorhiza kurroa* keinen Zusammenhang zwischen Ionenstärke und Ausmaß der Hyperhydratisierung feststellen.

In der pflanzlichen Biotechnologie sind Cytokinine von großer Bedeutung, bei vielen Pflanzenarten lässt sich eine effiziente Mikrovermehrung nur über den Einsatz geeigneter Cytokinine durchführen. Grundsätzlich war dies auch bei *L. tibetica* der Fall. Gegensätzlich dazu zeigten Ko et al. (2010) , dass sich *Cephalotus follicularis* am besten mit einem hormonfreien Medium mit 1/5 oder 1/10-reduzierter Ionenstärke vermehren liess. In unseren Untersuchungen war auf Medien ohne Cytokinin keine Sprossbildung an Nodienexplantaten zu beobachten, und der Einsatz von BAP führte lediglich zu minimalem Wachstum bei einer der drei Klonlinien. Sharma et al. (2000) stellten bei *Malus domestica* fest, dass bei zu niedriger oder zu hoher Konzentration an BAP keine Proliferationsphase der Kulturen eintrat. Mit optimiertem Zusatz an BAP erreichten Gonbad et al. (2014) eine erhöhte Nodienbildung in Kulturen von *Camellia sinensis*, welche bei höheren Konzentrationen des Cytokinins zurückging; auch Sprossnekrosen und –fasciation traten als Folge auf. Es ist vorstellbar, dass BAP in einem von uns nicht untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 1 und 5 µM ein besseres Wachstum bei *L. tibetica* bewirkt, da Spross- und Nodienanzahl des Klons 2c bei 0,5 und 1 µM BAP höher waren als auf hormonfreiem Kontrollmedium, jedoch bei 5 µM BAP ein schlechteres Wachstum zu beobachten war. Möglicherweise könnte auch die Kombination mit einem Auxin sinnvoll sein: Wie der Literatur zu entnehmen ist, zeigte BAP in Kombination mit NAA positive Auswirkungen auf die Mikrovermehrung von *Dioscorea rotundata* (Ezeibekwe et al., 2009), und der Einsatz von BAP gemeinsam mit IAA führte zu erhöhten Vermehrungsraten bei *Telfairia occidentalis* (Adesoye et al., 2012). Auch bei *Scoparia dulcis* führte nur die Kombination von BAP und Kinetin mit IAA zur Regenerierung von Sprossen (Premkumar et al., 2011).

Das zweite von uns untersuchte Cytokinin war Zeatin (ZEA). In einer Studie an *Labisia pumila* zeigte sich ZEA im Vergleich zu BAP und Kin als effizienter bezüglich Sprosslänge, Blattanzahl pro Explantat und auch Blattgröße (Hartinie und Jualang, 2007). Auch in unseren Versuchen liessen sich mit ZEA gute Ergebnisse erzielen, neu gebildete Sprossen wiesen bei 1 µM ZEA das größte Längenwachstum auf. Bei einer Konzentration von 5 µM ging die Sprosselongation zurück, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Elongations-hemmende Wirkung von Cytokininen zurückzuführen war. Bei Einsatz von 0,5 µM ZEA war die Bildung von Sprossen, Nodien und Wurzeln nur schwach ausgeprägt, dennoch konnten bessere Ergebnisse erzielt werden als mit BAP. Auch das Cytokinin 2-iP, wie ZEA ein natürlich vorkommender Vertreter, mit dem Osmen ihre Vermehrungsversuche durchführte, zeigte bessere Resultate als das synthetisch hergestellte KIN (Osmen, 2015). Mit zunehmender ZEA-Konzentration nahm der Kallusdurchmesser bei allen drei von uns untersuchten Klonen zu, die Häufigkeit der Hyperhydratisierung schien jedoch nicht von der Konzentrationen des Cytokinins abzuhängen.

Morphologische und physiologische Funktionsstörungen wie Hyperhydratisierung treten oft unter Kulturbedingungen auf, die für hohe Vermehrungsraten optimiert sind (Hazarika, 2006). Hyperhydratisierte Sprosse weisen einen verringerten Protein- und Chlorophyllgehalt (Phan und Letouze,1983; Frank et al., 2004), einen erhöhten Wassergehalt (Bottcher, 1988) und eine veränderte Ionenzusammen-setzung (Kevers und Gaspar, 1986) auf. Einige Arbeitsgruppen zeigten auf, dass Hyperhydratisierung vom Gehalt der Mikronährstoffe abhängt und durch hormonelles Ungleichgewicht im Medium verursacht wird (Doneso, 1987; Kataeva et al., 1991). Hyperhydratisierung kann zum irreversiblen Verlust der Regenerationsfähigkeit des Pflanzengewebes sowie zu schädlichen Veränderungen und letztendlich zum Absterben führen (Ivanova et al., 2008). Dementsprechend kommt es bei hyperhydratisierten Pflänzchen während der Akklimatisierung oft zu erhöhten Ausfällen (Yu et al., 2011). Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass Cytokininen meist in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise das Auftreten von Hyperhydratisierung begünstigen können (Leshem et al.,1988; Kataeva et al.,1991; Williams und Taji, 1991; Ivanova et al., 2006). In unseren Untersuchungen kam es bei Klon 2c besonders häufig zu hyperhydratisierten Sprossen, allerdings zeigte dieser Klon generell unbefriedigendes Wachstumsverhalten. Kulturen der beiden Klone 5b und 9b zeichneten sich dagegen durch hohe Spross- und Nodienanzahlen aus, sodass auch bei 40 - 50 % Hyperhydratisierung immer noch genügend gesunde Sprosse zur Verfügung standen, die man zur weiteren Subkultivierung verwenden konnte.

Die Temperatur zeigt einen hohen Einfluss auf die Morphologie von Pflanzen in Gewächshäusern (Moe, 1990; Baytorun et al., 1999; Kaufmann et al., 2000; Patil et al., 2001; Palonen, 2006; Xiong et al., 2011). Dies trifft auch für in vitro-Kulturen zu. Zum Beispiel zeigte Pinker (2002), dass eine Erhöhung der Temperatur von 21°C auf 24° bzw. 27°C bei Kulturen der zwei untersuchten Species *Tilia cordata* und *Prunus glandulosa* zwar toleriert wurde, jedoch nicht zu einer verbesserten Vermehrung führte; bei *Prunus glandulosa* wurden sogar niedrigere Vermehrungsraten festgestellt. Horn (1992) und Abdel-Rahman (2003) schlugen eine Einteilung in thermoneutrale (10-27°C), thermopositive (16-25°C) und thermonegative (10-15°C) Pflanzensorten hinsichtlich ihrer Reaktionen auf die Umgebungstemperatur vor. Zum Beispiel wurden von Horn (1992) Rosen in einem Temperaturbereich von 12° bis 24°C in vitro kultiviert. Als thermopositive Reaktion galt eine erfolgreiche Vermehrung bei 24°C, hingegen ließen sich die thermonegativen Sorten bei 12°C am besten mikrovermehren. *Lancea tibetica* wächst in hohen Gebirgslagen, dies führt zur Annahme, dass bei der in vitro-Kultivierung niedrigere Temperaturen von Vorteil sein könnten. Tatsächlich zeigten unsere bei 20°C gehaltenen Kulturen ein besseres Wachstum als die bei 25°C inkubierten Kulturen. Dies äusserte sich in längeren Wurzeln und Sprossen und vor allem in signifikant weniger auftretender Hyperhydratisierung.

Zur Bewurzelung von (in vitro-gebildeten) Sprossen werden häufig Auxine wie IAA, IBA, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) oder 1-Naphthylessigsäure (NAA) verwendet. Diese unterscheiden sich in ihrer physiologischen Aktivität und in dem Ausmaß, wie sie in den Pflanzengeweben angereichert und metabolisiert werden (Saad und Elshahed, 2012). Das natürlich vorkommende Auxin IAA, welches auch von Osmen zur Induktion der Wurzelbildung an Sprossen von *Lancea tibetica* eingesetzt wurde (Osmen, 2015), hat eine vergleichsweise schwache Wirkung. Trotzdem lässt sich IAA bei vielen Pflanzenarten erfolgreich zur Bewurzelung einsetzen. Teilweise wirkt es besser als andere, stärkere Auxine, so liessen sich beispielsweise Sprosse von *Vernonia amygdalina* mit IAA effizienter bewurzeln als mit IBA oder NAA (Khalafalla et al., 2007). Bei zu hoher Konzentration zeigten die in vitro-Kulturen jedoch schwaches Wachstum, Verbräunungen der Blätter und starke Kallusbildung an der Sprossbasis. Im Rahmen unserer Arbeit durchgeführte Versuche zur Bewurzelung von *L. tibetica* mit IBA konnten wir keine Erfolge erzielen. Ähnlich zu unserem Versuchsergebnis gelang Inacio et al. (2011) die in vitro-Bewurzelung von *Cochlospermum regium* mit IBA nicht, während sich eine Bewurzelung ex vitro mit einer akzeptablen Überlebensrate bewerkstelligen liess. Als weitere zielführende Option zur effektiven Induktion der Wurzelbildung bietet

sich die Möglichkeit einer Auxin-Vorbehandlung an. Mit Hilfe dieser sogenannten Pulsbehandlung konnte zum Beispiel bei *Fagus sylvatica* erfolgreich bewurzelt werden (Naujoks, 2000). Dazu wurden Sprosse in ein wurzelinduzierendes Medium mit IBA transferriert, nach einer Woche unter Lichtausschluss erfolgten die Überführung der Sprosse auf hormonfreies Kulturmedium und Inkubation über mehrere Wochen zur Wurzelbildung und –elongation. Dieses zweistufige Verfahren erlaubt prinzipiell die Applikation von hohen Auxinkonzentrationen zur Wurzelinitiierung und ermöglicht die Vermeidung der Auxin-typischen Hemmung der Wurzelelongation (Huang et al., 2000).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich das Cytokinin Zeatin in einem Konzentrationsbereich von 1-5 µM gut für die in vitro-Vermehrung von *Lancea tibetica* eignet. Je nach Ausgangsexplantat (Sprosse oder Nodien) bewährte sich voll- oder halbkonzentriertes MS-Medium, das Ausmass an Hyperhydratisierung war allerdings durchwegs relativ hoch. Das Auxin IBA scheint für die Bewurzelung von in vitro-regenerierten Sprossen nicht geeignet zu sein, diesbezüglich sind noch weiterführende Untersuchungen notwendig.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der in vitro-Kultivierung von *Lancea tibetica*, einer in der traditionellen Medizin Tibets und Chinas verwendeten Arzneipflanze, die in ihrem Bestand gefährdet ist. Es wurden die Eignung der Cytokinine BAP und ZEA zur Vermehrung der Pflanze, als auch der Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums, der Art des Explantats sowie der Kultivierungstemperatur untersucht. Ausserdem wurde ein Vorversuch zur Bewurzelung von mikrovermehrten Sprossen mit dem Auxin IBA durchgeführt. Die Auswertung der Versuche an ausgewählten Klonlinien erfolgte anhand des Wachstums (Anzahl an neugebildeten Sprossen, Nodien und Wurzeln sowie Spross- und Wurzellänge) und des Auftretens unerwünschter Erscheinungen (Hyperhydratisierung, Kallusbildung). Es zeigten sich grundsätzlich große genotypische Unterschiede zwischen den eingesetzten Klonen.

Zur Etablierung von Kulturen waren Sprossexplantate auf halb- oder vollkonzentriertem MS-Medium bezüglich Sprossvermehrung, Nodienbildung sowie Längenwachstum von Sprossen und Wurzeln signifikant besser geeignet als Nodienexplantate. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Ionenstärke des Mediums und Häufigkeit der Hyperhydratisierung von Sprossen festgestellt werden. Bei geviertelter Ionenkonzentration im Nährmedium ging das Wachstum in Sprosskulturen deutlich zurück. Auf Nährböden mit halber Ionenstärke entwickelten sich Nodienkulturen sehr gut. Die Kultivierungstemperatur zeigte insofern einen Einfluss, als bei 20° C kultivierte Sprossexplantate reduzierte Kallusbildung und Hyperhydratisierung aufwiesen, ohne dass die Anzahl an neugebildeten Sprossen und Nodien beeinflusst wurde. Eine Temperatur von 25° C resultierte in deutlich kleinwüchsigeren Sprossen.

Bezüglich der Cytokinine wurden mit ZEA signifikant bessere Ergebnisse erzielt als mit BAP ermittelt. Bei Einsatz des letztgenannten Wuchsstoffes trat kein Sprosswachstum ein, in den meisten Fällen kam es zum Absterben der Explantate. Der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen erwies sich bei allen 3 untersuchten Klonen als relativ hoch und als weitgehend unabhängig von der Cytokininkonzentration. Die Heterogenität des Wachstumsverhaltens der Klone zeigte sich darin, sich bei Klon 2c unabhängig von der ZEA-Konzentrationen generell nur sehr kurze Sprosse ausbildeten. Bei Klon 5b konnten mit 5 µM ZEA sehr gute Ergebnisse erzielt werden, während bei Klon 9b eine Konzentration von 1 µM optimal war. Bei Einsatz von ZEA kam es bei den beiden letztgenannten Klonen auch zur Ausbildung von Wurzeln, eine gezielte Bewurzelung von Sprossen mit 1 oder 5 µM IBA liess sich jedoch nicht bewerkstelligen, diesbezüglich sind noch weiterführende Untersuchungen notwendig.

6. Summary

The present thesis dealt with the in vitro-cultivation of *Lancea tibetica*, an endangered medicinal plant which is used in traditional Tibetan and Chinese medicine. We investigated the suitability of the cytokinins BAP and ZEA for the multiplication of the plant, as well the influence of ionic strength of the nutrient medium, type of explant and cultivation temperature. Furthermore we performed a preliminary experiment on rooting of micropropagated shoots with the auxin IBA. The evaluation of the experiments with selected clonal lines occurred by means of growth (number of regenerated shoots, nodes and roots, as well as shoot and root length) and the occurrence of undesired aspects (hyperhydration, callus formation). In general, distinct genotyp differences within the investigated clones became apparent.

For the establishment of cultures shoot explants on full or half strength MS medium were superior to nodal explants with respect to shoot multiplication, node formation and elongation of shoots and roots. No significant correlation between ionic strength of the nutrient medium and rate of shoot hyperhydration could be determined. Quartered strength medium resulted in reduced growth of shoot cultures. nodal cultures developed well on half strength MS medium. The cultivation temperature was shown to be relevant in that at 20° C shoot explants were less affected by callusing and hyperhydration, without a reduction in shoot and node formation rates. A temperature of 25° C resulted in distinctly smaller shoots.

With regard to the cytokinins the use of ZEA led to significantly better results than BAP which failed to induce shoot growth and in most cases led to dieback of the explants. The amount of hyperhydrated shoots was relatively high in all 3 investigated clones, and seemed to be independent of the cytokinin concentration. The growth heterogeneity of the clones was evident, as in clone 2c regardless of the ZEA concentration only very short shoots were formed. In clone 5b very good results could be achieved with 5 µM ZEA, while a concentration of 1 µM was optimal for clone 9b. In the latter two clones the use of ZEA also resulted in root formation, but attempts to achieve a directed rooting of shoots with 1 or 5 µM IBA was not successful. In this respect, further investigations should be conducted.

7. Literaturverzeichnis

Abdel-Rahman S. S. A. (2003), Untersuchungen zum Einkapseln von Sprosssegmenten für die Verwendung als künstliche Samen am Beispiel von Chrysanthemen und Rosen, Dissertation, Landwirtschaftlich-gärtnerische Fakultät der Humboldt-Universität, Berlin

Adesoye A.I., Okooboh G.O., Akande S.R., Balogun M.O., Odu B.O. (2012), Effect of phytohormones and genotype on meristem and shoot tip culture of *Telfairia occidentalis* Hook F., J. Appl. Biosci. **49**: 3415-3424

Ayenew B., Tefera W., Kassahun B. (2012), In vitro propagation of Ethiopian ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultivars: Evaluation of explant types and hormone combinations, Afr. J. Biotechnol. **11**: 3911-3918

Baytorun A. N., Topçu S., Abak K., Dasgan Y. (1999), Growth and Production of Tomatoes in Greenhouses at Different Temperature Levels, Gartenbauwiss. **64**: 33-39

Behar N.,Tiwari K. L., Jadhav, S. K. (2014), Effect of Explant Type in Development of in vitro Micropropagation Protocol of an Endangered Medicinal Plant: *Curcuma caesia* Roxb., Biotechnol. **13**: 22-27

Bottcher I., Zeglauer K., Goring H. (1988), Inducting and reversion of vitrification of plants cultured in vitro. Physiol. Plant. **66**: 94-98

Doneso I. (1987), Factors influencing vitrification of carnation and conifers, Acta Hort. **212**: 167-176

Ezeibekwe I.O., Ezenwaka C.L. , Mbagwu F.N., Unamba C.I.N. (2009), Effects of Combination of Different Levels of Auxin (NAA) and Cytokinin (BAP) on in vitro Propagation of *Dioscorea rotundata* L. (White Yam) , J. Mol. Genet. **1**: 18-22

Faria R.-O. (2005), In vitro propagation of Brazillian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations, Acta Sci. Agron. **27**: 1-5

Frank T., Kavers C., Gaspar T., Dommes J., Deby C., Greimess R., Didier S., Duspont G.D. (2004), Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response, Plant Physiol. Biochem. **42**: 519-522

Gonbad R. A., Sinniah U. R., Aziz M. A., Mohamad R. (2014), Influence of cytokinins in combination with GA_3 on shoot multiplication and elongation of Tea clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) , Sci. World J. **2014**: 1-9

Hartinie M., Jualang A. G. (2007), In vitro germination and plantlet establishment of *Labisia pumila* (BI.) F. Vill., Sci. Hort. **115**: 91-97

Hazarika B. N. (2006), Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants, Sci. Hort. **108**: 105-120

Heß D. (1992), Biotechnologie der Pflanzen, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Heß D. (2008), Pflanzenphysiologie, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Horn W. (1992): Micropropagation of Rose (*Rosa* L.), in Bajaj Y. P. S. (Hrsg.), High-Tech and Micropropagation IV, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 320-342.

Huang L.-C. , Huang B.-L., Wang C. H., Kuo C.-I., Murashige T. (2000), Developing an improved in vitro propagation system for slow-growing species using *Garcinia mangostana* L. (Mangosteen), In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant **36**: 501-504

Inacio M. C., Bertoni B. W., de Castro Franca S., Soares Pereira A.,M. (2011), In vitro conservation and low cost micropropagation of *Cochlospermum regium* (Mart. Ex. Scharank), J. Med. Plants Res. **5**: 4999-5007

Ivanova M., Novak O., Strnad M., Staden J.v. (2006) Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured in vitro in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents, Plant Growth Regul. **50**: 219-230

Ivanova M., Staden J.v. (2008), Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of *Aloe polyphylla* , Plant Cell Tissue Organ Cult. **92**: 227-231

Khalafalla M. M., Elgaali E. I., Ahmed M. M. (2007), In vitro multiple shoot regeneration from nodal explants of *Vernonia amygdalina* - an important medicinal plant, Afr. Crop Sci. Conf. Proc. **8**: 747-752

Kataeva N.V., Alexanandrova I.G., Butenko R.S., Dragavtcera E.V. (1991), Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. Plant Cell Tissue Organ Cult. **14**: 31-40

Kaufmann P. H., Joly R. J., Hammer P. A. (2000), Influence of day and night temperature differentials on root elongation rate, root hydraulic properties, and shoot water relations in Chrysanthemum, J. Amer. Soc. Hort. Sci. **125**: 383-389

Kevers C., Gaspar T.(1986), Vitrification of carnation in vitro: changes in water content, extra cellular space, air volume and ion levels, Physiol. Veg. **24**: 647-653

Kletter C., Kriechbaum M. (2001), Tibetan Medicinal Plants, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, S. 266-269

Ko C., Lin T., Ho C., Shaw J. (2010), In vitro regeneration of *Cephalotus follicularis*, HortScience **45**: 260-264

Leshem B., Shaley D. P., Izhar S. (1988), Cytokinin as an inducer of vitrification in melon, Ann. Bot. **61**: 255-260

Li T., Hao X.-J., Gu Q.-Q., Zhu W.-M. (2008), Minor furofurano lignans from the Tibetan herb, *Lancea tibetica,* Planta Med. **74**: 1391-1396

Liu C., Liu S.-J., Tang Z.-S., Sun J.-Y. (2015), *Lancea tibetica* as the Tibetan herb: A review of its phytochemistry and pharmacology, Phytochem. Lett. **14**: 270-279

Lou J., Gould J. H. (1999), In vitro shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture, Plant Cell Tissue Organ Cult. **57**: 211-213

Miao J., Wang W., Wu T., Dou D., Zhao H., Yao S., Zheng R. (2004), Studies on the reactions of sylvatesmin and lantbeside with oxidizing free radicals, Rad. Phys. Chem. **69**: 25-29

Moe R. (1990), Effects of day and night temperature alternations and of plant growth regulators on stem elongation and flowering of the long day plant *Campanula iosphylla* Moretti, Sci. Hort. **43**: 291-305

Mosleh M. S., Khetam A. R. (2010), Effect of different concentration of BA and IAA on micropropagation of *Gardenia jasminoides,* Mesop. J. Agr.**38**: 1-14

Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue, Physiol. Plant. **15**: 473-497

Naujoks G. (2000), Erfahrungen bei der in-vitro-Vermehrung, Bewurzlung und Aufzucht von Buchen (*Fagus sylvatica* L.), Bericht, Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Waldsieversdorf

Nyambayar D., Oyuntsetseg B., Tungalag R. (Bearbeiter), Jamsran Ts., Sanchir C., Bachman S., Soninkhishig N., Gombobaatar S., Baillie J., Tsendeekhuu Ts. (Hrsg.) (2011), Regional Red List Series Vol. 9. Plants (Part 1). Zoological Society of London, National University of Mongolia, S. 31

Osmen S. (2015), Mikrovermehrung von *Lancea tibetica* HOOK. f. et THOMS, Diplomarbeit, Univ. Wien

Ouarda H. E. F. (2005), Effect of mineral concentration of culture media without growth substances on the callogenesis of *Atriplex halimus* L., Afr. J. Biotechnol. **4**: 960-962

Palone P. (2006), Vegetative growth, cold acclimation, and dormancy as affected by temperature and photoperiod in six Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars, Eur. J. Hort. Sci. **71**: 1-6

Patchounkova D. (2002), In vitro-Kultivierung von *Picrorhiza kurroa* ROYLE ex BENTH., Diplomarbeit, Univ. Wien

Patil G., Oi R., Gissinger A., Moe R. (2001), Plant morphology is affected by light quality selective plastic films and alternating day and night temperature, Gartenbauwiss. **66**: 53-66

Pierik R. L. M. (1987), In vitro culture of higher plants, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Pinker I. (2002), Influence of temperature on multiplication and shoot development of *Prunus glandulosa* and *Tilia cordata* cultures in vitro, Gartenbauwiss. **67**: 182-189

Phan C. T., Letouze R. (1983), A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and hydroxycinnamate CoA ligase activity. Plant Sci. Lett. **36**: 323-327

Premkumar G., Sankaranarayanan R., Jeeva S., Rajarathinam K. (2011), Cytokinin induced shoot regeneration and flowering of *Scoparia dulcis* L. (Scrophulariaceae) - an ethnomedicinal herb, Asian Pacific J. Trop. Biomed. **1**: 169-172

Rätsch C. (2012), Enzyklopädie der psychoaktiven Pflanzen, AT Verlag, Aarau, S. 564

Saad A., Elshahed A. (2012), Plant Tissue Culture Media, Rec. Adv. Plant in vitro Cult. **2**: 29-39

Sharma M., Modgil M., Sharma D. R. (2000), Successful propagation in vitro of apple rootstock MM 106 and influence of phloroglucinol, Ind. J. Exp. Biol. **38**: 1236-1240

Sharma S., Katoch V., Rathour R., Sharma T. R. (2010), In vitro propagation of endangered temperate Himalayan medicinal herb *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth using leaf explants and nodal segments, J. Plant Biochem. Biotechnol. **19**: 111-114

Song Z. H., Wang Y.-H., Qian Z.-Z., Smillie T. J., Khan I. A. (2011), Quantitative determination of 10 phenylpropanoid and lignan compounds in *Lancea tibetica* by high-performance liquid chromatography with UV detection, Planta Med. **77**: 1562-1566

Su B. N., Yuan C., Jia Z. (1998), A new lignan glucoside from *Lancea tibetica,* Chin. Chem. Lett. **10**: 37-38

Su B. N., Zhu Q., Gao K., Yuan C., Jia Z. (1999), Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Lancea tibetica* and their antitumor activity, Planta Med. **65**: 558-561

Tian Z., Zhang F., Liu H., Gao Q., Chen S. (2016), Development of SSR markers for a Tibetan medicinal plant, *Lancea tibetica* (Phrymaceae), based on RAD sequencing, App. Plant Sci. **4**: apps.1600076. DOI: 10.3732/apps.1600076

Williams R. R., Taji A. M. (1991), Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca* (J.M. Black) in vitro shoot cultures, Plant Cell Tissue Organ Cult. **26**: 1-6

Witt C. M., Berling N., Rinpoche N.T., Cuomo M., Willich S. (2009), Evaluation of medicinal plants as part of Tibetan medicine prospective observational study in Sikkim and Nepal, J. Alt. Compl. Med. **15**: 59-65

Xiong J., Patil G., Moe R., Torre S. (2011), Effects of diurnal temperature alternations and light quality on growth, morphogenesis and carbohydrate content of *Cucumis sativus* L., Sci. Hort. **128**: 54-60

Yaowapha J., Panumart R., Arunporn I. (2013): Effects of medium salt strength and plant growth regulators on shoot multiplication and root induction of *Smilax corbularia*, Pharmacol. Online **3**: 1-7

Zheng R., Wang M., Zhang H. (1985), Study on the chemical constituents of *Lancea tibetica* Hook. F. et Thoms, Acta Bot. Sin. **27**: 402-1406

http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/16662887