



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Mikrovermehrung von *Lancea tibetica* Hook F. et.  
Thoms.

verfasst von

Sahr Osmen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Univ.- Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp



## **Danksagung**

Mein allergrößter Dank gilt meiner Mutter dafür, dass sie mir in jederlei Hinsicht ein Studium ermöglicht hat, und mich unermüdlich unterstützt hat.

Ich möchte mich bei Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Kopp für die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken.

Weiters geht ein großer Dank an Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die persönliche Betreuung.

Bei Mag. Florian Gössnitzer möchte ich mich für die Einschulung zu Beginn der praktischen Arbeit und die vielen Tipps bedanken.

Meiner Kollegin Chan Nhu Nguyen gebührt Dank für die große Kollegialität, Hilfsbereitschaft und Ermutigung während der Arbeit.

Nicht zuletzt geht ein Dankeschön an meine Geschwister und all meine Freunde und Kollegen für jegliche Hilfe und seelische Unterstützung.



## Abkürzungen

2iP	2-Isopentenylaminopurin
BAP	Benzylaminopurin
IAA	3-Indolyllessigsäure
IBA	3-Indolylbuttersäure
Kin	Kinetin, 6- Furfurylaminopurin
MS	Basismedium nach Murashige und Skoog (1962)
MS 3	MS Medium mit 1 $\mu$ M Kinetin
MS 4	MS Medium mit halber Konzentration an Makroelementen und 1 $\mu$ M Kinetin
MS 5	MS Medium mit geviertelter Konzentration an Makroelementen und 1 $\mu$ M Kinetin
NAA	Naphthyllessigsäure
TTM	Traditionelle Tibetische Medizin
Zea	Zeatin



Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung und Problemstellung .....	1
2. Material und Methoden .....	4
2.1. Pflanzenmaterial.....	4
2.2. Nährmedien .....	4
2.3. Kulturbedingungen .....	6
2.4. Kulturauswertung .....	6
3. Ergebnisse.....	8
3.1. Einfluss der Cytokinine auf die Vermehrung .....	8
3.2. Einfluss der Ionenstärke auf die Vermehrung .....	22
3.3. Einfluss des Explantates auf die Vermehrung .....	28
3.4. Einfluss des Genotyps auf die Vermehrung.....	36
3.5. Voruntersuchungen zum Einfluss von Auxinen auf die Bewurzelung .....	43
4. Diskussion .....	49
5. Zusammenfassung.....	60
6. Literaturverzeichnis .....	63
Curriculum Vitae .....	68



## 1. Einleitung und Problemstellung

*Lancea tibetica* Hook f. et Thoms (Abb. 1) ist eine in den europäischen Breitengraden weitgehend unbekannte Pflanze, die in der Traditionellen Tibetischen Medizin (TTM) eingesetzt wird (Kletter und Kriechbaum 2001). Dementsprechend ist sie in Tibet und dessen Nachbarländern, nämlich Bhutan, China, Indien und der Mongolei (Mongolian Red List, 2011) beheimatet. Seit kurzem gehören die zwei einzigen Arten der Gattung, *L. tibetica* und *L. hirsuta* (Su et al., 1999) der Familie der Mazaceae an (Reveal, 2011), davor wurden sie zu den Scrophulariaceae (Kletter und Kriechbaum 2001) gezählt.

Die Rosettenpflanze wächst auf 3000-4800 m Höhe, ihre Habitate sind einerseits feuchte Gebiete wie Flussufer und Sümpfe, aber auch trockene Böden, jedenfalls benötigt sie viel Licht für das Wachstum (Kletter und Kriechbaum 2001). Einsatz in der Ethnomedizin findet *Lancea tibetica* als Krautdroge (Li et al., 2008), unter anderem gegen Influenza, Lungenentzündung, Durchfall und Pharyngitis (Su et al., 1999).

Zu weiteren Informationen bezüglich traditioneller Anwendung und Botanik sei an dieser Stelle auf die Arbeit von Nguyen (Nguyen, Diplomarbeit) verwiesen.



Abbildung 1: *Lancea tibetica* Hook f. et Thoms

(Quelle: [http://www.efloras.org/object\\_page.aspx?object\\_id=52751&flora\\_id=2](http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=52751&flora_id=2)

abgerufen am: 14.5.2014)

Die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe von *Lancea tibetica* sind vor allem Phenylpropanoide und Phenylpropanoidglykoside sowie Lignane, außerdem enthält sie Flavonoide, Terpenoide und Steroide (Song et al., 2011). Im Rahmen von phytochemischen Untersuchungen, bei denen die gesamte Pflanze herangezogen wurde, konnte 1999 von Su et al. das Lignan Tibeticosid entdeckt und dessen Struktur aufgeklärt werden (Su et al., 1999).

In den bisher durchgeführten pharmakologischen Studien standen vor allem die antitumorale und die Radikalfängerwirkung der Inhaltsstoffe im Mittelpunkt. So konnten Li et al. (1997) eine starke antitumorale Wirkung des Phenylpropanoids Verbascosid feststellen.

Miao et al. (2003) untersuchten die Radikalfängerwirkung der beiden Inhaltsstoffe Sylvatesmin und Lantibesid. Dabei handelt es sich um zwei Lignane mit sehr ähnlichen Strukturen, Lantibesid unterscheidet sich von Sylvatesmin nur durch eine zusätzliche Glykosylierung. Die Arbeitsgruppe um Miao studierte die Reaktion zwischen den beiden Lignanen und  $\text{OH}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ , und  $\text{SO}_4^{2-}$ -Radikalen und kam dabei zum Schluss, dass Sylvatesmin den effizienteren Radikalfänger darstellt. Sie führten dies auf den fehlenden Glycosylrest zurück und stellten außerdem fest, dass die Anwesenheit der phenolischen  $\text{OH}^-$ -Gruppen ebenfalls für die Wirkung unerlässlich ist. Die antitumorale Aktivität von Sylvestamin an einer humanen Hepatomzelllinie, der Hela Zelllinie sowie an B16- Zellen wurde von Su et al (1999) demonstriert.

Diese vielversprechenden Ergebnisse werden *L. tibetica* in Zukunft möglicherweise noch interessanter für die pharmakologische und pharmazeutische Forschung machen, was zu einem Anstieg der Nachfrage führen würde.

In den Heilsystemen ihrer Ursprungsländer wird die Pflanze aufgrund ihrer zahlreichen Indikationen intensiv genutzt. In der Mongolischen Roten Liste von 2011 wird sie jedenfalls als „Critically Endangered“ eingestuft, was bedeutet, dass sie vom Aussterben bedroht ist (Mongolian Red List, 2011). Dies wird sowohl auf klimatische als auch auf menschliche Einflüsse zurückgeführt, denn zum einen verliert sie unter anderem durch anhaltende Dürre zunehmend ihre Lebensräume, zum anderen wird sie von den Einheimischen unkontrolliert gesammelt (Mongolian Red List, 2011). Diesem Verlust der natürlichen Bestände gilt es nun entgegenzuwirken.

Im Rahmen eines Aufenthaltes von Dr. Davaakhu Gaamaa (National University of Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolei) am Department für Pharmakognosie der Universität Wien wurden 2013 in vitro-Kulturen aus Samen etabliert und erste Versuche zur Optimierung des Nährmediums durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit sowie in den parallel durchgeführten Untersuchungen von Nguyen (Nguyen, Diplomarbeit) sollten die Cytokinine Kinetin (Kin) 2-Isopentenylaminopurin (2iP), Benzylaminopurin (BAP) und Naphthylelessigsäure (NAA), auf ihre Eignung für die Anlage von Nodien- bzw. Sprosskulturen mit möglichst hoher Vermehrungsrate getestet werden. Außerdem sollten der Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums und des Explantattyps untersucht sowie erste Versuche zur Bewurzelung von mikrovermehrten Sprossen durchgeführt werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Pflanzenmaterial**

Für die vorliegende und die zeitgleich von Nguyen (Diplomarbeit in Vorbereitung) durchgeführte Arbeit standen 10 Klone von *Lancea tibetica* zur Verfügung. Hierfür waren in der Region Huvsugul Aimag in der Mongolei Samen von Dr. Davaakhu Gaamaa (Department of Biology, National University of Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolei) gesammelt worden. Die Samen wurden nach Oberflächensterilisation und anschließender steriler Keimung etabliert. Als Basismedium diente jenes nach Murashige und Skoog (1962). Dieses wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der Cytokinine BAP und Kinetin kombiniert. Das MS Medium mit 1  $\mu$ M Kinetin (MS 3) hatte bislang die besten Ergebnisse für die Mikrovermehrung von *Lancea tibetica* geliefert und galt zu Beginn der vorliegenden Arbeit als Standard-Vermehrungsmedium.

Für die weiteren Versuche zur Optimierung der Nährmedien und Ermittlung der für die Mikrovermehrung am besten geeigneten Klone, wurden in der vorliegenden Arbeit die Klone 9c, 11b und 11a eingesetzt, während Nguyen ihre Versuche mit den Klonen 2c, 9b und 7b durchführte (Nguyen, Diplomarbeit).

### **2.2. Nährmedien**

Das MS Medium mit voller Ionenstärke wurde als Basismedium gewählt, welchem wir, abgesehen von den wuchsstofffreien Medien, die als Kontrollmedien dienten, verschiedene Konzentrationen der Cytokinine Kinetin und 2iP sowie des Auxins IAA zusetzten.

Zur Herstellung wurden die Makro- und Mikroelemente sowie die Vitamine, welche in Form von Stammlösungen bei 4°C gelagert wurden, mit Saccharose und myo-Inosit in einem Erlenmeyerkolben mit bidestilliertem Wasser vermischt. Anschließend setzten wir die Wuchsstoffe in verschiedenen Konzentrationen zu, dafür wurden 1mM Wuchsstoff-Stammlösungen frisch hergestellt.

Tabelle 1 gibt eine genaue Übersicht über die eingesetzten Wuchsstoffe und Konzentrationen.

Als Gelbildner wurde Gelrite® der Firma Roth verwendet. Schließlich wurde der pH Wert aller Medien mit KOH bzw. HCl auf 5,70 ( $\pm$  0,1) eingestellt, in die Kulturgefäße abgefüllt und 20 min lang bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Für die Versuche zu Ionenstärke und Explantattyp, die mit den Klonen 11a und 11b durchgeführt wurden, kamen die gleichen Arbeitsschritte zur Anwendung. Dem Basismedium wurden die Makroelemente jedoch in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Das MS 3 Medium enthielt die vollen Makroelementkonzentrationen, bei MS 4 waren diese halbiert, und bei Medium MS 5 wurde die Ionenstärke auf ein Viertel reduziert (Tabelle 2). Allen Medien wurde 1  $\mu$ M Kinetin zugesetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der eingesetzten Nährmedien und verwendeter Explantattyp

Wachsstoff	Chemische Bezeichnung	Medium	Konz. ( $\mu$ M)	Explantat
KIN	Kinetin (6-Furfurylaminopurin)	1	0	Nodien
		2	0,5	
		3	1	
		4	5	
2iP	2-Isopentenylaminopurin	5	0	
		6	0,5	
		7	1	
		8	5	
IAA	$\beta$ - Indolylessigsäure	9	0	Sprosse- bzw. Sprossspitzen
		10	1	
		11	5	

Tabelle 2: Nährmedien für Versuche zu Ionenstärke und Explantattyp

Medium	Ionenstärke	Wachsstoff- u. Konzentration
MS 3	MS	1 $\mu$ M Kinetin
MS 4	$\frac{1}{2}$ MS	1 $\mu$ M Kinetin
MS 5	$\frac{1}{4}$ MS	1 $\mu$ M Kinetin

### 2.3. Kulturbedingungen

Als Kulturgefäße dienten Hipp<sup>®</sup>- Babynahrungsgläser mit einer Höhe von 95 mm und einem Durchmesser von 60 mm. Darin wurden 40 ml Nährmedium abgefüllt, als Verschluss kamen Magenta B-Caps<sup>®</sup> der Firma Sigma zum Einsatz. Für die Testung der Cytokinine legten wir unter sterilen Arbeitsbedingungen Nodienkulturen an, für die Testung der Auxine kamen Sprossspitzen zum Einsatz. Pro Nährmedium wurden 5 Gläser verwendet, in die jeweils 3 Explantate inokuliert wurden. Dies ergab eine Stichprobengröße von 15 pro Medium und Klone. Die Kultivierung erfolgte bei  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , die Kulturdauer betrug 7 Wochen. Leuchtstoffröhren der Marke Sylvania Gro-lux<sup>®</sup> lieferten Licht mit einer Intensität von  $40\ \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , die Photoperiode betrug 16h.

### 2.4. Kulturauswertung

Zur Auswertung der Kulturen wurde ermittelt, aus wie vielen Explantaten sich sogenannte Cluster bildeten. Bei diesen Clustern handelte es sich um Aggregate (Abbildung 2a), aus mehreren, verschieden langen Sprossen (Abbildung 2b). Diese wurden gezählt und auf Millimeterpapier abgemessen. Bestanden die Aggregate aus sehr kurzen Sprossen, so zählten wir die Cluster, die Sprosse wurden aber nicht weiter ausgewertet. Die Angabe des „Clusteranteils in %“ bezog sich auf die Gesamtzahl der eingesetzten Explantate pro Versuchsreihe. Außerdem wurde gezählt, wie viele Nodien sich aus jedem Explantat gebildet hatten, Sprossspitzen galten dabei auch als Nodien.



Abbildung 2: Clusterbildung bei *L.tibetica* Klon **11a** auf Medium mit  $1\ \mu\text{M}$  2iP a): einzelner Cluster, b): einzelne Sprosse des Clusters)

Für die Beurteilung der Bewurzelung ermittelten wir Anzahl und Länge der erhaltenen Hauptwurzeln, Seitenwurzeln wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen.

Desweiteren erhoben wir auch das Ausmaß an Kallusbildung und Hyperhydratisierung (Abbildung 3): Die Durchmesser der Kalli wurden in mm angegeben, bei der Hyperhydratisierung wurde der prozentuelle Anteil ermittelt. Die Prozentangaben bezogen sich dabei immer auf die Gesamtzahl der eingesetzten Explantate pro Nährmedium.

Faszierte Sprosse (Abbildung 3 a)) traten nur vereinzelt auf und wurden daher nicht ausgewertet.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Statistica der Firma StatSoft Inc. in der Version 6.1. herangezogen, mit dem wir Mittelwerte und Standardfehler berechneten. Für die Varianzanalyse kam Duncan's Multiple Range Test zum Einsatz. Dabei führten wir für die Auswertung der aus den Cytokinin- (Kap. 3.1., S.8) und Auxinkulturen (Kap 3.5., S. 44) erhaltenen Daten eine einfaktorielle Varianzanalyse durch, für alle anderen Ergebnisse setzten wir eine mehrfaktorielle Varianzanalyse ein.

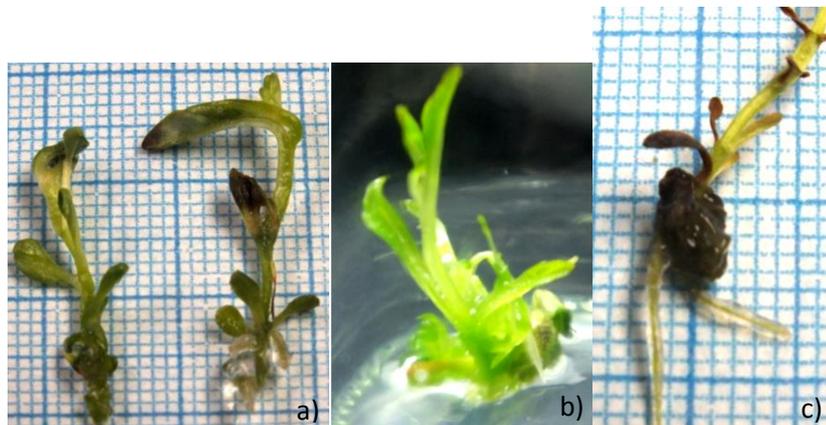


Abbildung 3: Beispiel für a) fascierte b) hyperhydratisierte Sprosse und c) Spross mit anhaftendem Kallus

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Einfluss der Cytokinine auf die Vermehrung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin zu ermitteln, welches Cytokinin in welcher Konzentration für die Vermehrung von *L. tibetica* geeignet ist, möglichst ohne Hyperhydratisierung und Kallusbildung zu verursachen. Außerdem sollte untersucht werden, inwiefern sich die einzelnen Klone diesbezüglich voneinander unterscheiden.

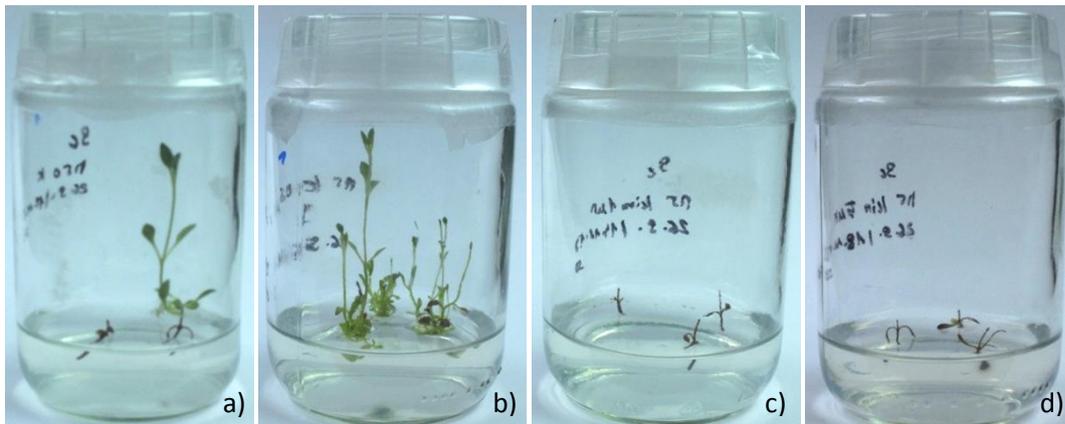


Abbildung 4: Kulturen des Klon 9c mit a) 0  $\mu\text{M}$  b) 0,5  $\mu\text{M}$  c) 1  $\mu\text{M}$  d) 5  $\mu\text{M}$  Kinetin nach 5 Wochen

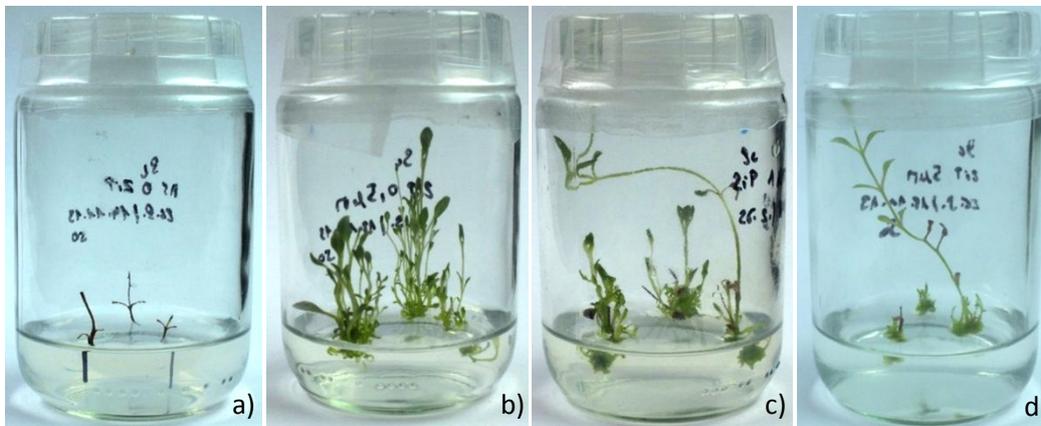


Abbildung 5: Kulturen des Klon 9c mit a) 0  $\mu\text{M}$  b) 0,5  $\mu\text{M}$  c) 1  $\mu\text{M}$  d) 5  $\mu\text{M}$  2iP nach 5 Wochen

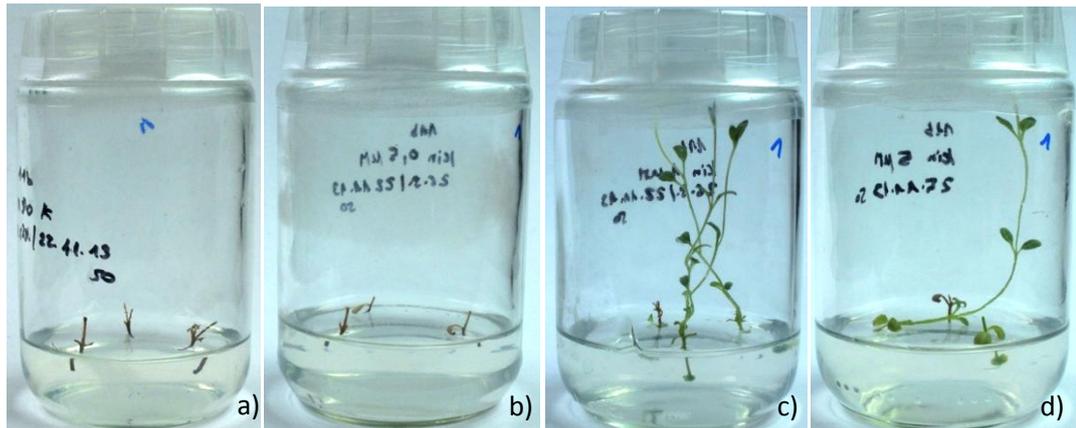


Abbildung 6: Kulturen des Klon **11b** mit a) 0  $\mu\text{M}$  b) 0,5  $\mu\text{M}$  c) 1  $\mu\text{M}$  d) 5  $\mu\text{M}$  Kinetin nach 5 Wochen

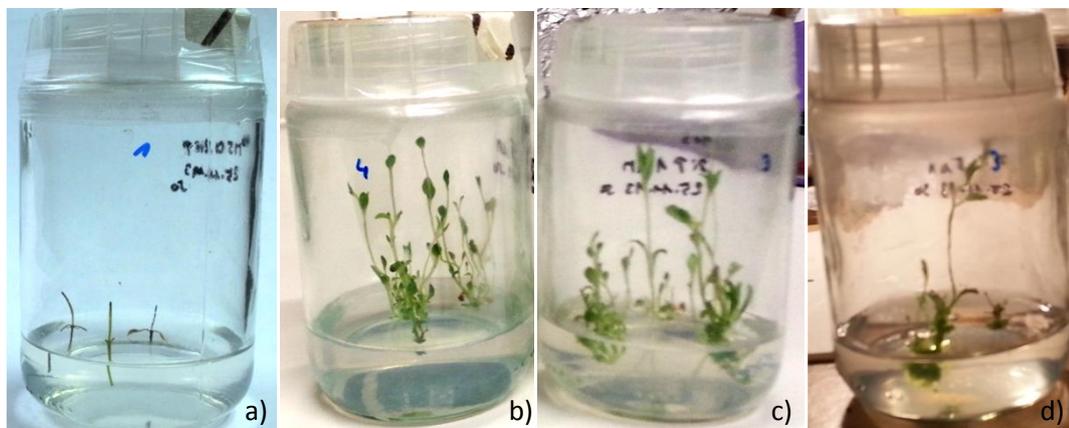


Abbildung 7: Kulturen des Klon **11b** mit a) 0  $\mu\text{M}$  b) 0,5  $\mu\text{M}$  c) 1  $\mu\text{M}$  d) 5  $\mu\text{M}$  2iP nach 5 Wochen

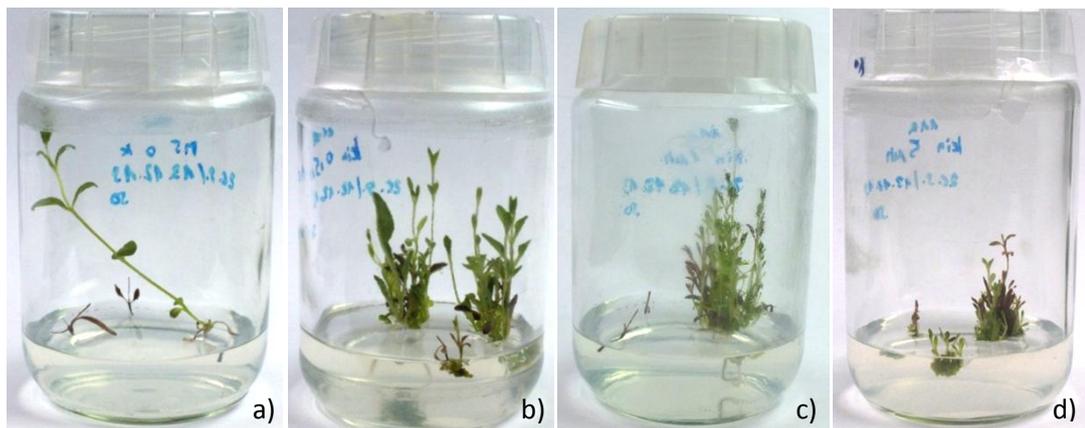


Abbildung 8: Kulturen des Klon **11a** mit a) 0  $\mu\text{M}$  b) 0,5  $\mu\text{M}$  c) 1  $\mu\text{M}$  d) 5  $\mu\text{M}$  Kinetin nach 5 Wochen

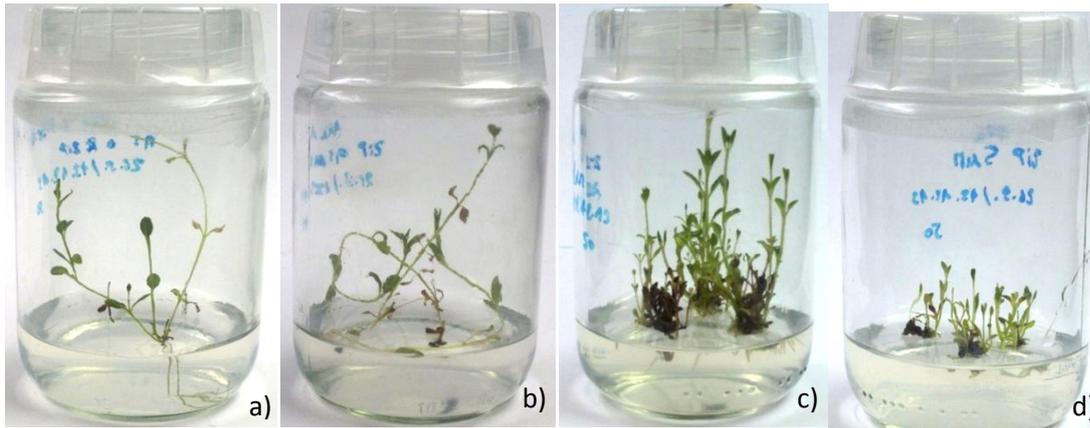


Abbildung 9: Kulturen des Klon **11a** mit a) 0  $\mu\text{M}$  b) 0,5  $\mu\text{M}$  c) 1  $\mu\text{M}$  d) 5  $\mu\text{M}$  2iP nach 5 Wochen

Rein optisch betrachtet (Abbildungen 4-9, S. 8-10) reagierten die Klone sehr individuell auf die eingesetzten Wuchsstoffe, auch Nguyen beobachtete Unterschiede zwischen den von ihr eingesetzten Klonen (Nguyen, Diplomarbeit). Allen Klonen gemeinsam war jedoch, dass das Wachstum in den ersten Wochen kaum bis nur sehr langsam voranging, ab der 5.-6. Woche die Vermehrung aber deutlich schneller erfolgte.

Dies konnte vor allem auf den 2iP-hältigen Medien bei Klon 9c beobachtet werden: Dort konnten mit allen 3 eingesetzten 2iP- Konzentrationen auch relativ hohe Clusteranteile ermittelt werden. So wurde mit 1  $\mu\text{M}$  2iP ein 100 %iger Anteil ermittelt, was bedeutet dass sich aus allen eingesetzten Explantaten dieses Klons Cluster bildeten (Diagramm 1, S. 11).

Bei Klon 11b konnte 2iP nur in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  die Bildung von Cluster bewirken. Der Anteil war mit 33,3 % bei beiden Konzentrationen gleich groß.

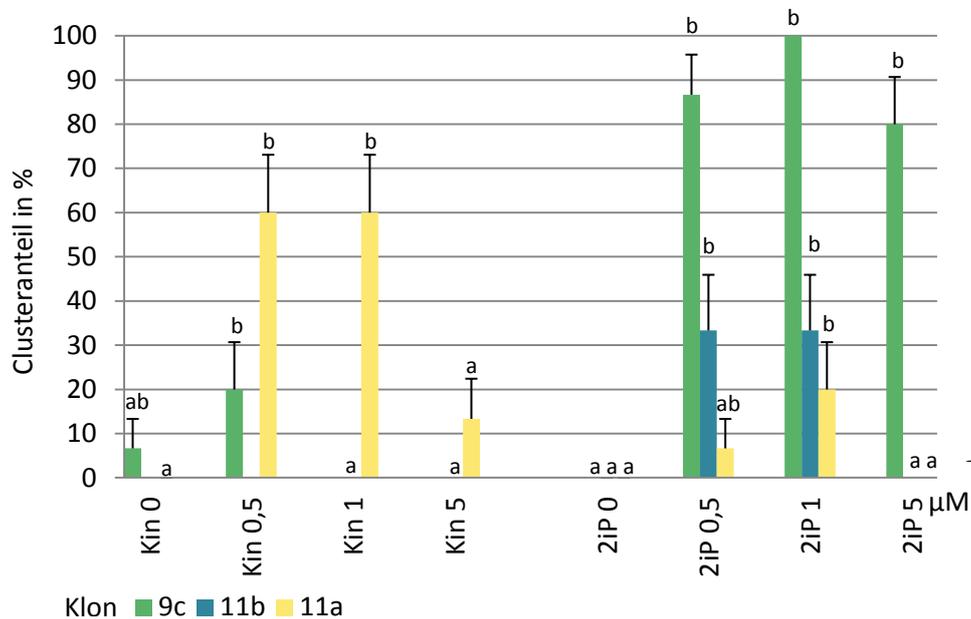
Auch bei Klon 11a entstanden nur auf den Nährmedien mit 0,5 $\mu\text{M}$  (6,7 %) und 1  $\mu\text{M}$  (20 %) 2iP Cluster.

An den Explantaten des Klons 9c bildeten sich nur mit 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin Cluster aus (20 %). Außerdem wuchsen auf den wuchsstofffreien Kontrollmedien dieses Klons Cluster (6,7 %).

Kinetin konnte bei Klon 11b keine Clusterbildung bewirken.

Die Explantate des Klons 11a konnten in allen eingesetzten Kinetinkonzentrationen Sprossaggregate bilden. Auf Medien mit 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Kinetin bildeten 60 % der

inokulierten Explantate Cluster aus. 5  $\mu\text{M}$  Kinetin führte zu einem kleineren Anteil an Sprossaggregaten (13,3 %), der sich signifikant von den mit 0,5 und 1  $\mu\text{M}$  erhaltenen Clusteranteilen unterschied.



**Diagramm 1:** Einfluss der Wachstumsstoffkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) auf den Clusteranteil in %, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Der Clusteranteil stand im Zusammenhang mit der durchschnittlichen Sprosszahl (Diagramm 2, S. 12). Alle 3 Klone wiesen die größten Sprosszahlen auf jenen Medien auf, die auch die höchsten Clusteranteile hervorriefen.

Die meisten Sprosse waren auf den 2iP haltigen Medien des Klon 9c zu beobachten, die Sprosszahl war umso höher je niedriger die 2iP Konzentration im Medium war. Es lag ein signifikanter Unterschied zwischen den auf Medium mit 5  $\mu\text{M}$  2iP (7 Sprosse) und den mit 1  $\mu\text{M}$  (14 Sprosse) und 0,5  $\mu\text{M}$  (16 Sprosse) gewonnenen Sprosszahlen vor.

Klon 11b bildete in den 1  $\mu\text{M}$  2iP hältigen Nährmedien die meisten Sprosse aus (6 Sprosse), mit 0,5  $\mu\text{M}$  wurden 5 Sprosse pro Explantat gebildet. Die mit 5  $\mu\text{M}$  2iP registrierte Sprosszahl unterschied sich signifikant von diesen beiden Ergebnissen.

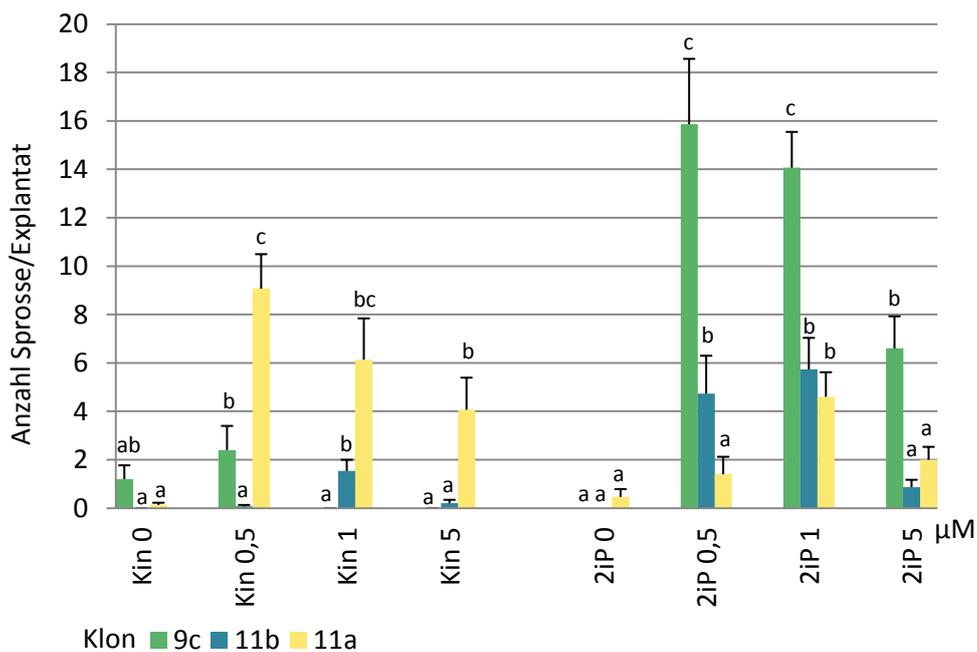
Für Klon 11a wurde die höchste Sprosszahl (5 Sprosse) auf den Medien erreicht, die 1  $\mu\text{M}$  2iP enthielten. Dieser Wert unterschied sich sowohl von der mit 0,5  $\mu\text{M}$  als auch von der mit 5  $\mu\text{M}$  2iP (2 Sprosse) berechneten Sprosszahl signifikant.

Mit Kinetin konnte Klon 11a die meisten Sprosse bilden, und zwar umso mehr, je niedriger die Konzentration des Wachstoffs in den Medien war. Die Sprosszahlen unterschieden sich bei Zusatz von 0,5  $\mu\text{M}$  (9 Sprosse) und 5  $\mu\text{M}$  (4 Sprosse) Kinetin signifikant voneinander.

Bei Klon 9c führte Kinetin nur in den Medien mit 0,5  $\mu\text{M}$  Wachstoffs zu minimalem Sprosswachstum (2 Sprosse).

Bei Klon 11b konnte nur mit 1  $\mu\text{M}$  Kinetin Sprossbildung beobachtet werden bei einer Kinetinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  trat kaum Wachstum auf.

Auf den Kontrollmedien ohne Wachstoffs blieb das Wachstum größtenteils aus und es kam zu bräunlicher Verfärbung und Absterben der Explantate (Abbildung 10, S. 13), nur einzelne Explantate von Klon 11a und Klon 9c konnten ohne Wachstoffs neue Sprosse regenerieren.



**Diagramm 2:** Einfluss der Wachstoffsstoffkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) auf die Anzahl gebildeter Sprosse pro Explantat, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )



Abbildung 10: Kontrollkultur (ohne Wuchsstoff) im Medium nach der a) 1. b) 3. c) 6. Woche am Beispiel des Klon **11a**

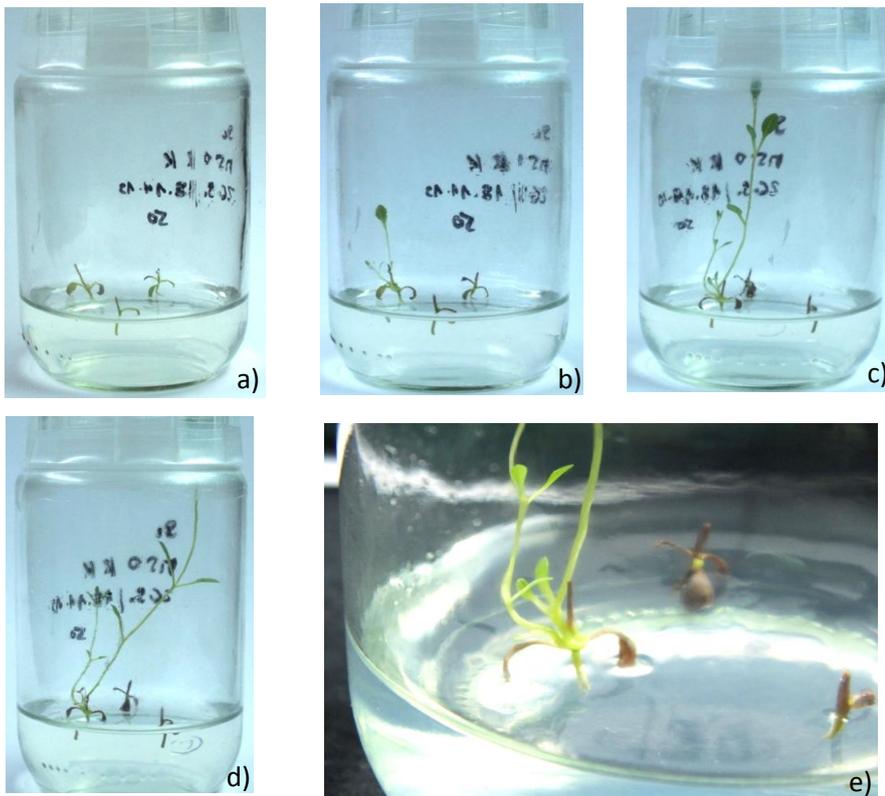
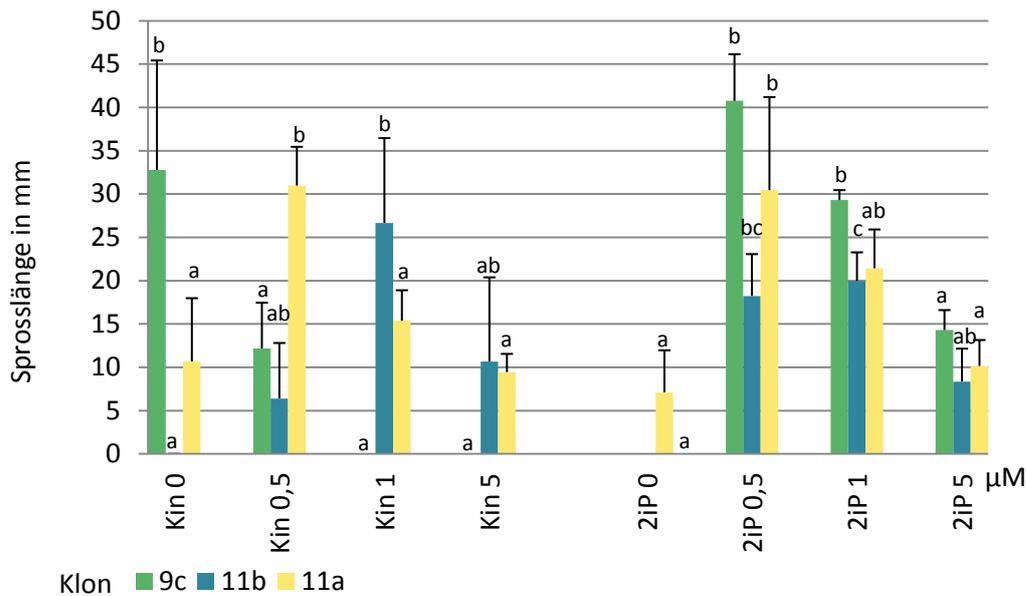


Abbildung 11: Kontrollkulturen ohne Wuchsstoff des Klon **9c** nach a) 1 b) 3 c) 4 und d) 5 Wochen e) Nahaufnahme der Achselknospe

Aus Explantaten, die keine Ausbildung von Clustern aufwiesen, regenerierten teilweise 1 bis 2 einzelne Sprosse. Diese Sprosse waren durch ein rasches Wachstum gekennzeichnet und wiesen eine hohe Sprosselongation auf (Abbildung 11).



**Diagramm 3:** Einfluss der Wachstoffsstoffkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) auf die durchschnittliche Sprosslänge in mm. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

Auf dem Kontrollmedium ohne Wachstoffsstoffe bildete Klon 9c (Abbildung 11 d), S. 13) Sprosse mit einer durchschnittlichen Länge von 32,8 mm (Diagramm 3). Dieser Wert unterschied sich signifikant von der Sprosslänge, die auf dem Medium mit 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin erhalten wurde (12,2 mm).

Aus den Nodienexplantaten von Klon 11b wuchsen bei allen 3 eingesetzten Kinetinkonzentrationen keine Cluster sondern einzelne Sprosse. Mit 1  $\mu\text{M}$  Kinetin entstanden mit durchschnittlich 26,7 mm die längsten Sprosse, auf Medien mit 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin wuchsen die kürzesten Sprosse des Klon 11b: Sie waren durchschnittlich 6,4 mm lang.

Die längsten Sprosse des Klon 11a bildeten sich auf dem Medium mit 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin: Die Sprosse wiesen eine durchschnittlichen Länge von 31 mm auf und unterschieden sich signifikant von den mit 1  $\mu\text{M}$  (15,4 mm) und den mit 5  $\mu\text{M}$  Kinetin (9,4 mm) erreichten Sprosslängen. Auch die aus Wachstoffsstofffreiem Kontrollmedium erhaltene Sprosslänge (10,7 mm) unterschied sich signifikant von dem mit 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin erhaltenen Ergebnis.

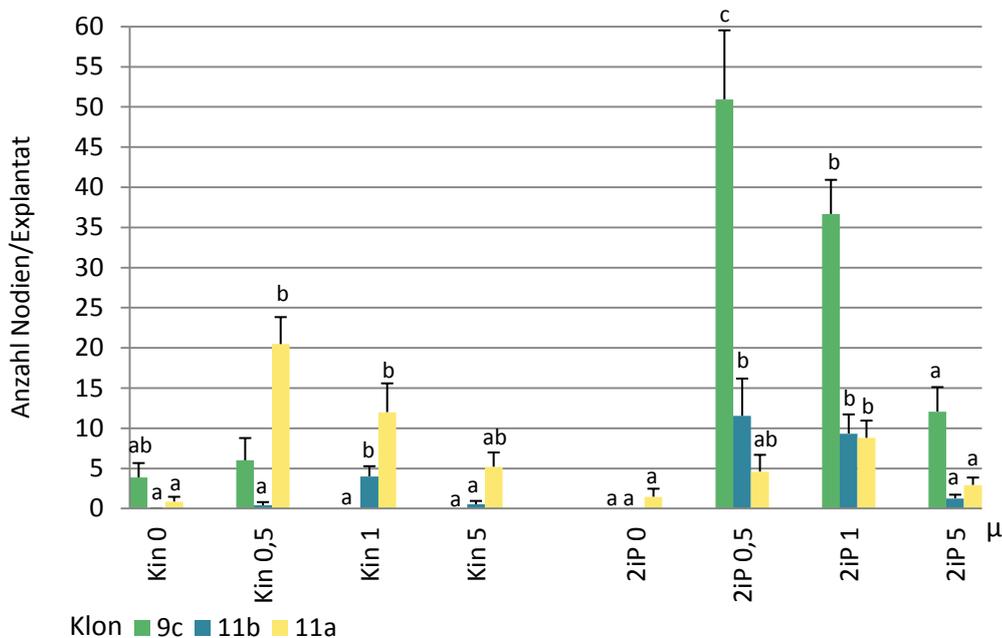
Mit 2iP wuchsen aus den Explantaten des Klons 11a umso längere Sprosse, je niedriger der Wachstoffsstoff im Nährmedium konzentriert war. Die mit 0,5  $\mu\text{M}$

(30,4 mm) und die mit 5  $\mu\text{M}$  (10,2 mm) eruierten durchschnittlichen Sprosslängen unterschieden sich signifikant voneinander. Auch bei diesem Klon wiesen die Sprosse auf dem Kontrollmedium ohne Wuchsstoff keine Clusterbildung auf sondern es wurde die Regenerierung einzelner langer Sprosse (7,1 mm) aus den Explantaten beobachtet.

Am Ende der Kulturperiode wurden für Klon 9c nicht nur die meisten, sondern auch die längsten Sprosse des Versuchs eruiert. Die Sprosslängen nahmen auch hier mit abnehmender 2iP- Konzentration im Medium zu. Mit 0,5  $\mu\text{M}$  2iP bildeten sich durchschnittlich 40,8 mm lange Sprosse, mit 1  $\mu\text{M}$  2iP 29,3 mm lange. Beide Werte unterschieden sich signifikant von der mit 5  $\mu\text{M}$  2iP erhaltenen Sprosslänge (14,3 mm).

Bei Klon 11b unterschieden sich nur die Sprosslängen auf 1  $\mu\text{M}$  (20 mm) und 5  $\mu\text{M}$  (8,4 mm) 2iP-haltigen Nährmedien signifikant voneinander. Auf den Nährmedien mit 0,5  $\mu\text{M}$  2iP erhielten wir Sprosse mit einer durchschnittlichen Länge von 18,2 mm.

Die größte Anzahl an Nodien pro Explantat wurde in den 2iP-Kulturen des Klon 9c beobachtet (Diagramm 4).



**Diagramm 4:** Einfluss der Wuchsstoffkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) auf die gebildeten Nodien pro Explantat, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Die Anzahl der Nodien fiel bei Klon 9c umso höher aus, je niedriger konzentriert das Cytokinin im Nährmedium war. Mit 0,5  $\mu\text{M}$  2iP wurden 51, mit 1  $\mu\text{M}$  2iP 37 und mit 5  $\mu\text{M}$  12 Nodien pro Explantat erreicht. Die Nodienzahlen des Klon 9c unterschieden sich bei allen 3 eingesetzten 2iP-Konzentrationen signifikant voneinander.

Klon 11b bildete mit 2iP um ein Vielfaches weniger Nodien als Klon 9c, aber auch hier entstanden bei der niedrigsten Konzentration an Wuchsstoff (0,5  $\mu\text{M}$ ) die meisten Nodien (12), gefolgt von der Nodienzahl auf den Medien mit 1  $\mu\text{M}$  (9 Nodien) und 5  $\mu\text{M}$  (1 Nodium) 2iP. Zwischen der mit 5  $\mu\text{M}$  2iP und der mit 0,5 oder 1  $\mu\text{M}$  2iP gebildeten Anzahl an Nodien pro Explantat des Klons 11b lag Signifikanz vor.

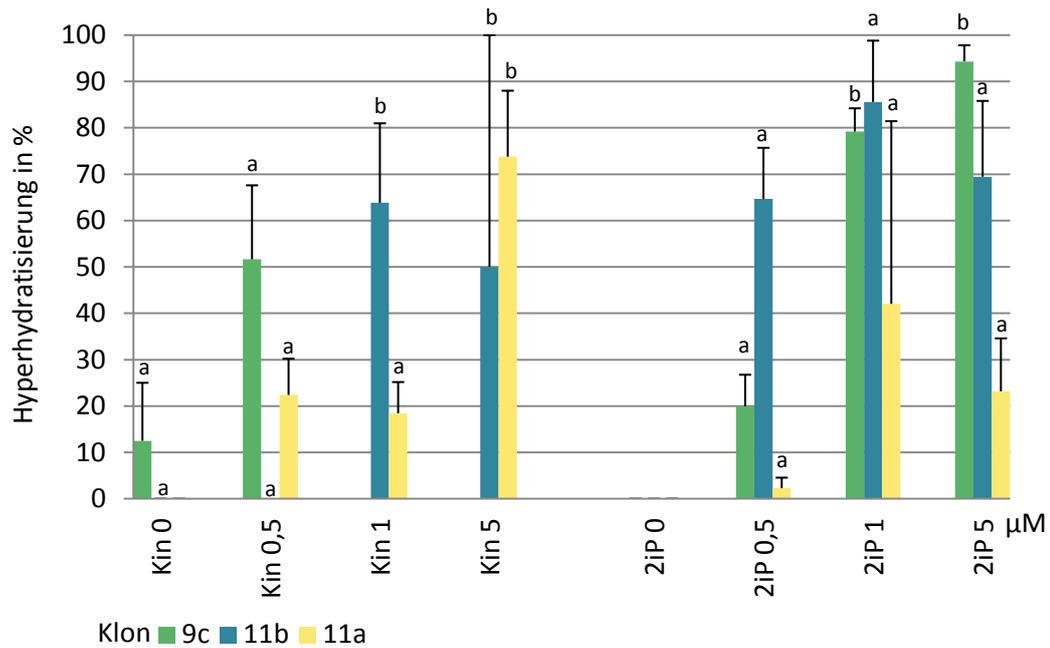
Klon 11a zeigte mit 1  $\mu\text{M}$  2iP die meisten Nodien (9), die kleinste Anzahl (3 Nodien) wurde mit 5  $\mu\text{M}$  erhalten, zwischen diesen beiden Werten lag ein signifikanter Unterschied vor.

Bei Klon 11b konnte beobachtet werden, dass, obwohl die Sprosslängen auf 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Molaren Kinetin-Medien höher waren als bei Klon 11a (Diagramm 3, S.14), die Anzahl der Nodien bei Klon 11a überwog. Dies zeigt, dass bei einer höheren Sprosselongation in den Kulturen nicht immer auch mehr Nodien gebildet wurden. Kurze Sprosse waren manchmal gestaucht, wiesen also kürzere Internodien auf (Abbildung 12).



Abbildung 12: Beispiele für unterschiedlich langen Internodien bei vergleichbarer Nodienanzahl

Neben der Sprossbildung wurde auch das Ausmaß an Hyperhydratisierung und Kallusbildung untersucht.



**Diagramm 5:** Einfluss der Wachstumsstoffkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) auf die Hyperhydratisierung in %, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Bei Klon 11a kam es beim Einsatz von  $0,5 \mu\text{M}$  Kinetin zu einem höheren Anteil an Hyperhydratisierung (22,4 %) als mit  $1 \mu\text{M}$  Kinetin (18,4 %; Diagramm 5). In den Kulturen mit  $5 \mu\text{M}$  Kinetin waren die Sprosse zu 73,8% hyperhydratisiert.

Die mit  $1 \mu\text{M}$  Kinetin erhaltenen Sprosse des Klons 11b waren zu 63,8 % hyperhydratisiert, von den in  $5 \mu\text{M}$  Kinetinhältigen Nährmedien regenerierten Sprosse waren 50 % hyperhydratisiert.

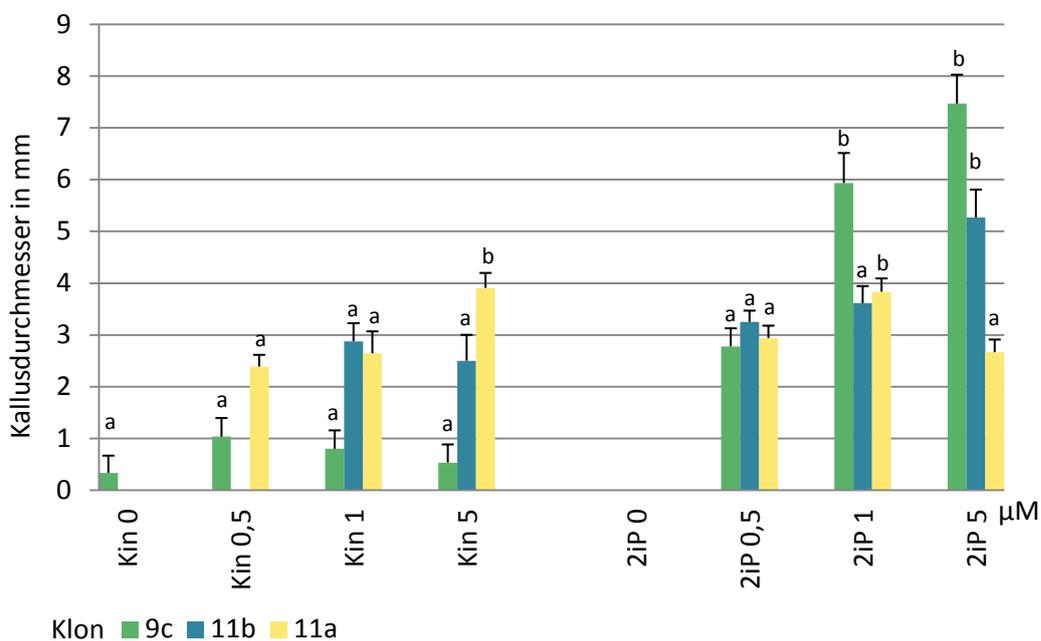
Klon 9c wies bei Einsatz von  $0,5 \mu\text{M}$  Kinetin einen knapp über 50 %igen Anteil an hyperhydratisierten Sprossen auf.

Mit 2iP wies Klon 9c eine umso höhere Hyperhydratisierungsrate auf, je mehr Wachstumsstoff eingesetzt wurde. Die Kulturen mit  $1 \mu\text{M}$  und  $5 \mu\text{M}$  2iP wiesen relativ hohe Anteile an hyperhydratisierten Sprossen auf, sie machten im Medium mit  $1 \mu\text{M}$  2iP 79,2 % und bei Zusatz von  $5 \mu\text{M}$  2iP 94,3 % der Gesamtsprosszahl aus. Die mit  $0,5 \mu\text{M}$  2iP erhaltenen Sprosse des Klon 9c waren zu 20 % hyperhydratisiert.

Bei Klon 11b kam es in den Kulturen mit  $1 \mu\text{M}$  2iP zu der höchsten Hyperhydratisierungsrate (85,5 %), gefolgt von 69,4 % hyperhydratisierter Sprosse in den  $5 \mu\text{M}$  2iP- hältigen Nährmedien. Die mit  $0,5 \mu\text{M}$  gewonnenen Sprosse waren zu 64,6 % hyperhydratisiert.

Bei Klon 11a traten die vergleichsweise niedrigsten Hyperhydratisierungsraten auf Medien mit 2iP auf. Mit nur 2,3 % hyperhydratisierten Sprossen war der geringste Prozentsatz bei Verwendung von 0,5  $\mu\text{M}$  2iP festzustellen. Den höchsten Anteil an Hyperhydratisierung wiesen die Sprosse dieses Klons auf dem Medium mit 1  $\mu\text{M}$  2iP auf (42%).

Die Kallusbildung ist umso größer ausgefallen, je höher die Konzentration des Cytokinins im Nährmedium war (Diagramm 6).



**Diagramm 6:** Einfluss der Wachstoffsstoffkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) auf den durchschnittlichen Kallusdurchmesser in mm, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

In den Kinetinhaltigen Kulturen kam es bei Klon 9c auch in jenen Kulturen zu Kallusbildung, in denen keine Sprossbildung erfolgte (Abb. 13 b) und c), S. 19).

Bei Klon 11b wurden in den Kulturen mit 1  $\mu\text{M}$  (2,9 mm) und 5  $\mu\text{M}$  (2,5 mm) Kinetin ähnlich große Durchmesser ermittelt.

Die Kulturen des Klon 11a wiesen einen umso größeren Kallusdurchmesser auf, je höher die Konzentration des Kinetins in den Nährmedien war. Mit 5  $\mu\text{M}$  Kinetin betrug der durchschnittliche Kallusdurchmesser 3,9 mm.

Klon 9c wies in den Kulturen mit 5  $\mu\text{M}$  2iP den größten Kallusdurchmesser des gesamten Versuchs auf und zwar betrug dieser 7,5 mm. In den Kulturen mit 1  $\mu\text{M}$  2iP betrug der Durchmesser durchschnittlich 5,9 mm, mit 0,5  $\mu\text{M}$  2iP betrug der Kallusdurchmesser 2,8 mm.

An den Explantaten des Klons 11b die in den 2iP haltigen Nährmedien kultiviert wurden, fanden wir einen umso kleineren Kallusdurchmesser, je niedriger konzentriert der Wachstoffsstoff war. So betrug dieser bei 0,5  $\mu\text{M}$  2iP 3,3 mm, mit 1  $\mu\text{M}$  entstanden durchschnittlich 3,6 mm große Kalli, und mit 5  $\mu\text{M}$  2iP wurde ein Kallusdurchmesser von 5,3 mm gemessen.

In den Kulturen des Klons 11a die 0,5  $\mu\text{M}$  2iP enthielten lag der durchschnittliche Kallusdurchmesser bei 2,9 mm. Die Nährmedien mit 1  $\mu\text{M}$  2iP resultierten in einem durchschnittlichen Kallusdurchmesser von 3,8 mm. In den wachstoffsstofffreien Kulturen kam es nur an vereinzelt Explantaten zu einer Bildung von Kallus.

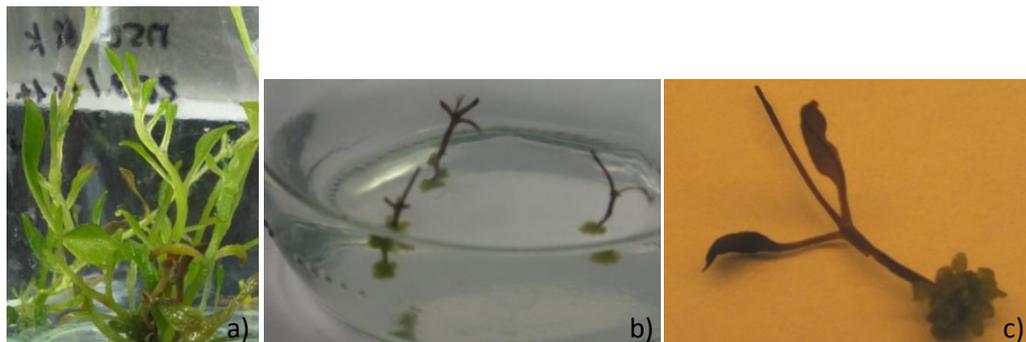


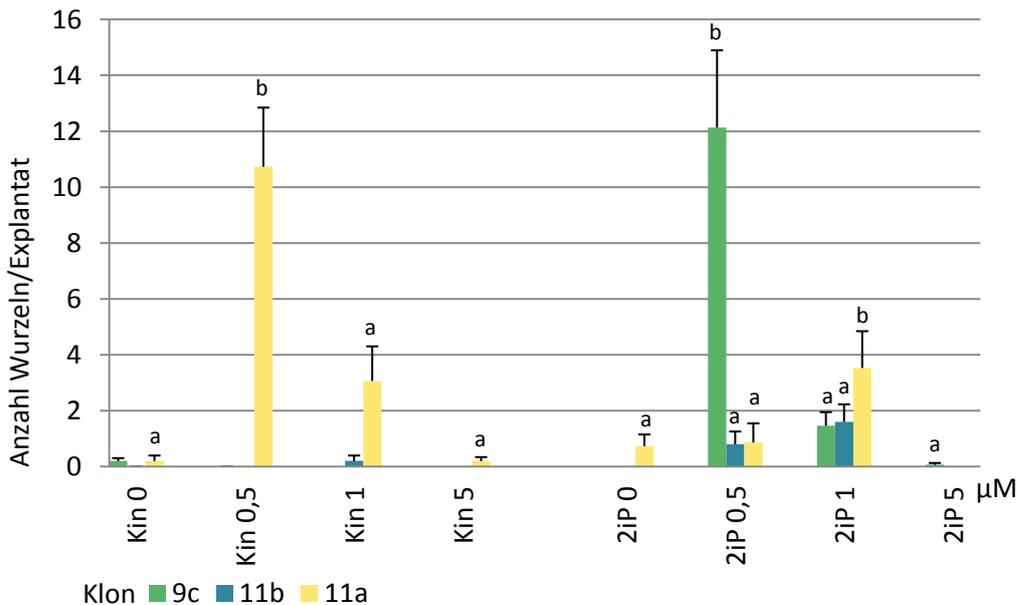
Abbildung 13: Hyperhydratisierte Sprosse a), Kallusbildung ohne Wachstum b) und Kallusbildung an abgestorbenem Explantat c) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 9c

Sowohl in den mit 2iP als auch in den mit Kinetin angereicherten Medien konnte Wurzelwachstum beobachtet werden (Diagramm 7, S. 20). Kinetin bewirkte nur in den Kulturen des Klons 11a erwähnenswerte Wurzelbildung (Abbildung 14, S. 20). Bei Einsatz von 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin wuchsen durchschnittlich 11 Wurzeln pro Explantat. Dieser Wert unterschied sich signifikant von der mit 1  $\mu\text{M}$  erhaltenen Wurzelzahl, hier wurden 3 Wurzeln pro Explantat gezählt.

Bei den anderen beiden Versuchsklonen konnte Kinetin keine Wurzelbildung bewirken.

Mit 0,5  $\mu\text{M}$  2iP konnten für den Klon 9c etwa 12 Wurzeln pro Explantat nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterschied sich signifikant von der in den Kulturen mit 1  $\mu\text{M}$  2iP gezählten Anzahl an Wurzeln.

Mäßiges Wurzelwachstum wurde bei Klon 11a in den Nährmedien mit 1  $\mu\text{M}$  Kinetin beobachtet, ähnliches galt auch für Klon 11b auf Medien mit 1  $\mu\text{M}$  2iP.



**Diagramm 7:** Einfluss der Wuchsstoffkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) auf die Anzahl gebildeter Wurzeln pro Explantat. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

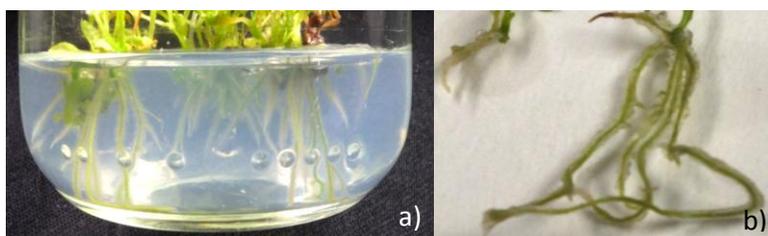
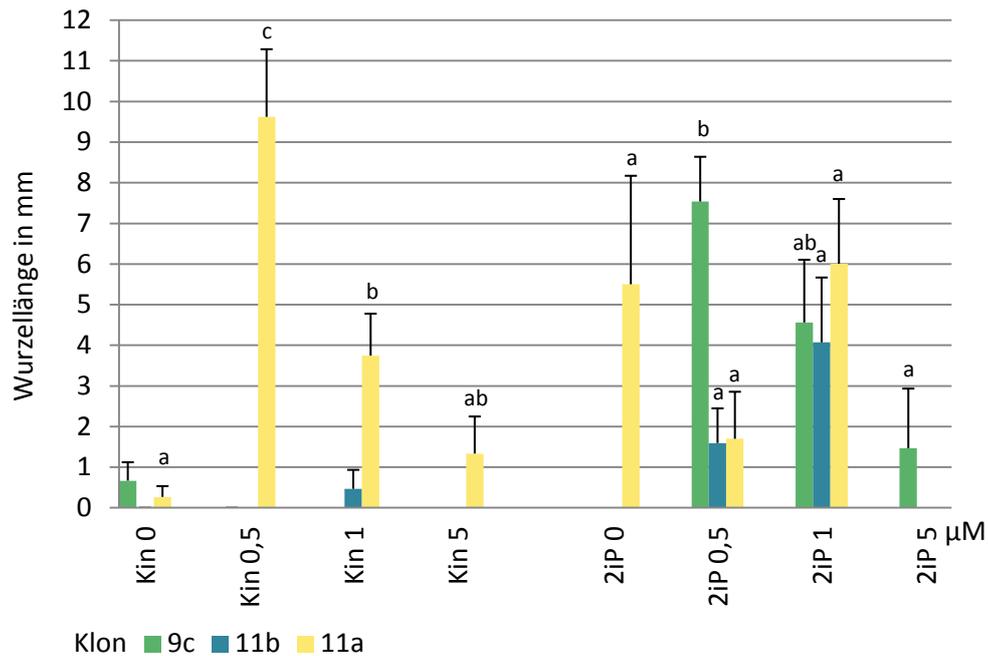


Abbildung 14: Wurzelbildung an Explantaten von *L. tibetica* Klon 11a auf Medium mit 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin

Mit 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin entstanden an Explantaten von Klon 11a nicht nur die meisten, sondern mit durchschnittlich 9,6 mm auch die längsten Wurzeln (Diagramm 8, S. 21).



**Diagramm 8:** Einfluss der Wachstoffsstoffkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) auf die durchschnittliche Wurzellänge in mm, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Der Einsatz von  $1 \mu\text{M}$  Kinetin resultierte in einer Wurzelbildung mit einer Länge von  $3,7 \text{ mm}$ , zwischen diesen beiden Werten lag ein signifikanter Unterschied vor. Bei der höchsten Kinetinkonzentration von  $5 \mu\text{M}$  wurde eine Wurzellänge von  $1,3 \text{ mm}$  gemessen, die sich signifikant von der mit  $0,5 \mu\text{M}$  Kinetin erhaltenen Wurzellänge ( $9,6 \text{ mm}$ ) unterschied.

2iP konnte in einer Konzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  in den Kulturen des Klon 9c die längsten Wurzeln bilden ( $7,5 \text{ mm}$ ). Die Wurzeln wurden mit steigender Cytokininkonzentration kürzer: Bei Zusatz von  $1 \mu\text{M}$  2iP entstanden Wurzeln, die  $4,6 \text{ mm}$  lang waren. Diese Wurzellänge unterschied sich nicht signifikant von der mit  $0,5 \mu\text{M}$  ( $7,5 \text{ mm}$ ) 2iP erhaltenen. Mit  $5 \mu\text{M}$  wuchsen die kürzesten Wurzeln mit durchschnittlich  $1,5 \text{ mm}$  Länge. Zwischen dieser und der der mit  $0,5 \mu\text{M}$  erhaltenen Länge lag Signifikanz vor.

Explantate von Klon 11b bildeten mit  $0,5 \mu\text{M}$  2iP  $1,6 \text{ mm}$  lange und mit  $1 \mu\text{M}$  2iP  $4,1 \text{ mm}$  lange Wurzeln.

Klon 11a bildete in den wachstoffsstofffreien Kontrollmedien zwar wenige, aber dafür längere Wurzeln aus. Sie waren durchschnittlich  $5,5 \text{ mm}$  lang unterschieden sich jedoch nicht signifikant von den mit 2iP erhaltenen Wurzellängen.

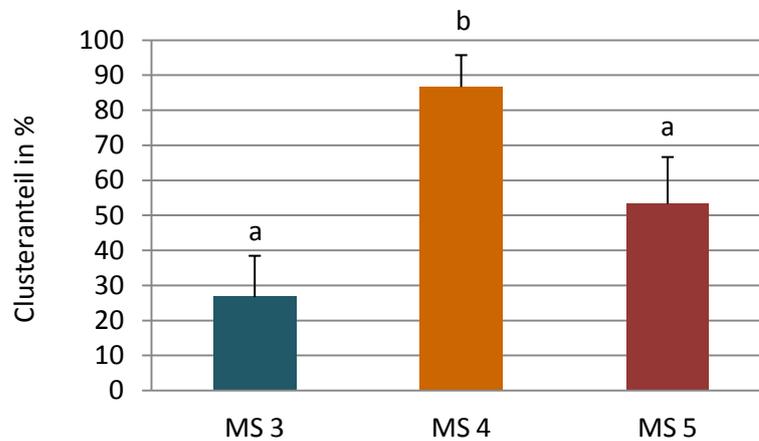
### 3.2. Einfluss der Ionenstärke auf die Vermehrung

Ziel dieses Versuches war es zu ermitteln, welchen Einfluss die Ionenstärke auf das Wachstum von *L. tibetica* hat. Dafür wurde die Konzentration der Makroelemente des Basismediums nach Murashige und Skoog variiert. Dem MS Medium wurden die Makroelemente in voller Konzentration (Medium MS 3) zugesetzt, weiters wurde die Konzentration der Makroelemente auf die Hälfte (Medium MS 4) und auf ein Viertel (Medium MS 5) reduziert. Als Cytokinin diente Kinetin in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , die Versuche wurden mit Klon 11a durchgeführt (Abbildung 15).



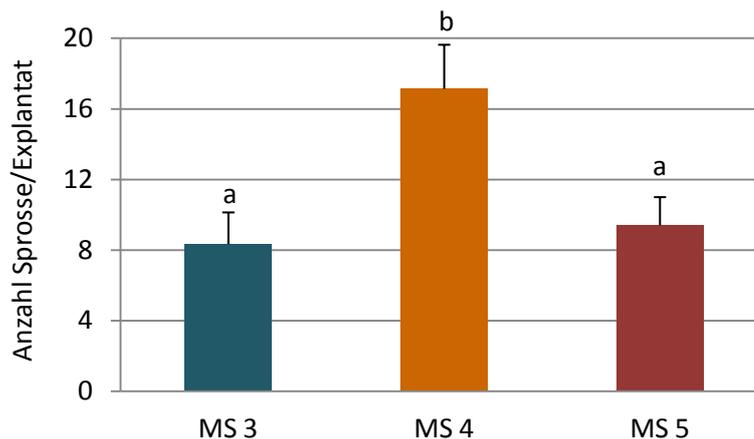
Abbildung 15: Erscheinungsbild der Kulturen von *L. tibetica* Klon **11a** auf Medien unterschiedlicher Ionenstärke: a) MS 3 (Voll-MS), b) MS 4 (1/2 MS), c) MS 5 (1/4 MS) mit 1  $\mu\text{M}$  Kin nach 7 Wochen Kulturdauer

Die meisten Cluster wurden auf dem halbkonzentriertem Medium (MS 4) gebildet. Über 80% aller in diesem Nährmedium inokulierten Explantate bildeten Sprossaggregate und es lag ein signifikanter Unterschied zu den aus den Medien MS 3 und MS 5 erhaltenen Ergebnissen vor (Diagramm 9).



**Diagramm 9:** Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS) mit 1 µM Kin auf den Anteil gebildeter Cluster (%) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11a. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

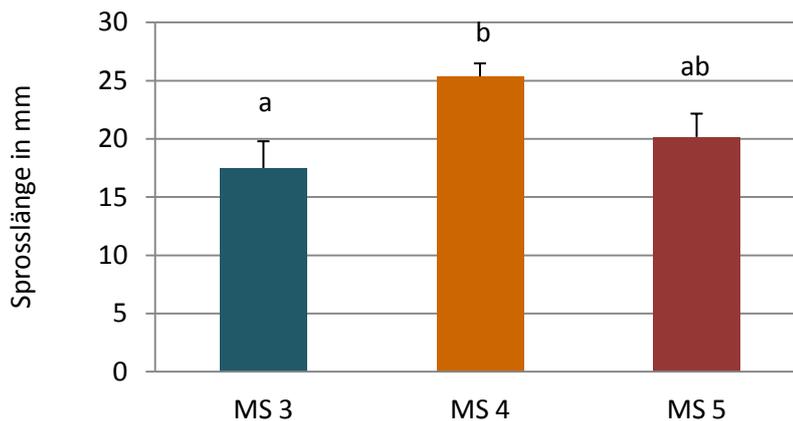
Die größte Sprosszahl war auf Medium MS 4 erreicht worden: Es bildeten sich durchschnittlich 17 Sprosse pro Explantat (Diagramm 10).



**Diagramm 10:** Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS) mit 1 µM Kin auf die Anzahl gebildeter Sprosse pro Explantat in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11a. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Die mit halber Ionenstärke erhaltene Sprosszahl unterschied sich sowohl von der mit Medium MS 3 (8 Sprosse) als auch von der mit Medium MS 5 erhaltenen Sprosszahl (9 Sprosse) signifikant.

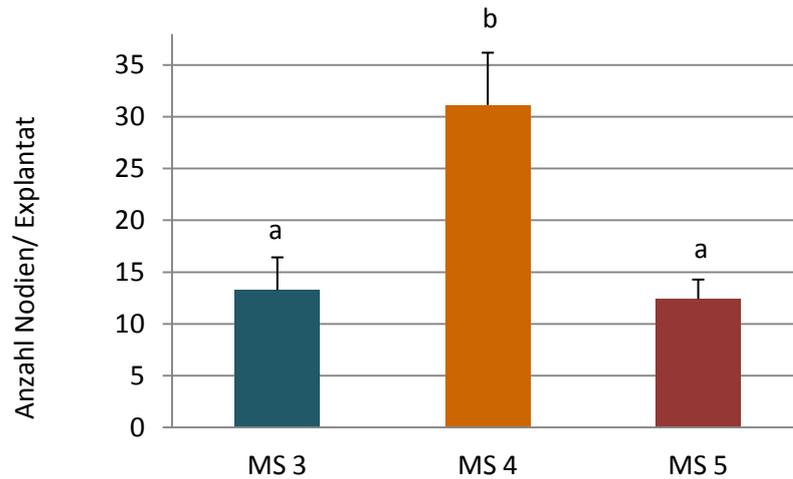
Auf die Sprosselongation wirkte sich die halbe Ionenstärke der Nährmedien ebenfalls am günstigsten aus (Diagramm 11).



**Diagramm 11:** Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4:  $\frac{1}{2}$  MS, MS 5:  $\frac{1}{4}$  MS) mit  $1 \mu\text{M}$  Kin auf die durchschnittliche Sprosslänge (mm) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11 a, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Auf Medium MS 4 wuchsen mit 25,4 mm die längsten Sprosse. Aus dem Medium mit voller Ionenstärke (MS 3) wurden die kürzesten Sprosse gemessen, sie wiesen eine durchschnittliche Sprosslänge von 17,5 mm auf. Die aus den Medien MS 3 und MS 4 generierten Sprosslängen unterschieden sich signifikant voneinander.

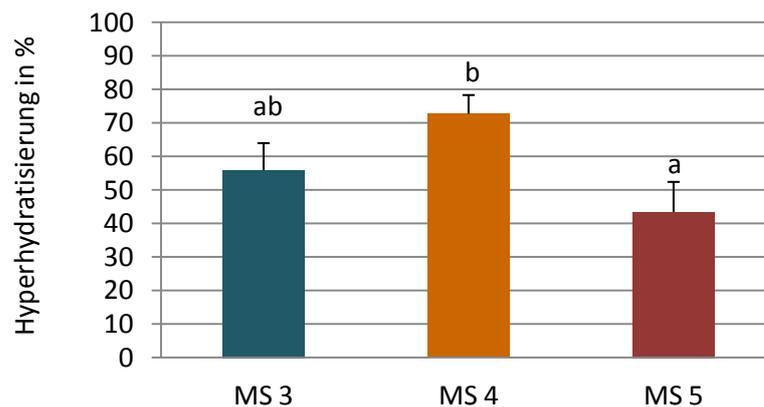
Die meisten Nodien pro Explantat wurden auf den Nährmedien mit halber Ionenstärke gezählt (Diagramm 12, S. 25) Es wurden 31 Nodien pro Explantat auf Medium MS 4 gebildet, dieser Wert unterschied sich sowohl von dem mit voller (13 Nodien) als auch von dem mit geviertelter (12 Nodien) Ionenstärke erhaltenem Ergebnis signifikant.



**Diagramm 12:** Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS) mit 1 µM Kin auf die Anzahl gebildeter Nodien pro Explantat in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11a. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

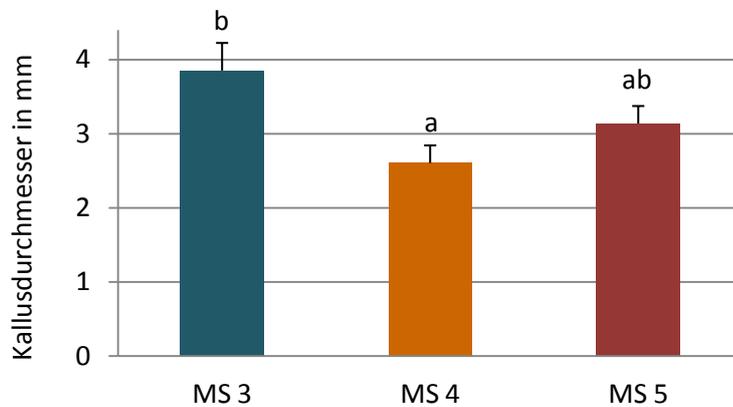
Mit halber Ionenstärke des MS Mediums (MS 4) entstanden zwar die meisten Sprosse, allerdings führte dieses Medium auch zu einem Anteil von 72,8 % an hyperhydratisierten Sprossen (Diagramm 13).

Auf Medium MS 3 lag der Anteil bei 55,9 % und auf Medium MS 5 waren 43,5 % aller gebildeten Sprosse hyperhydratisiert.



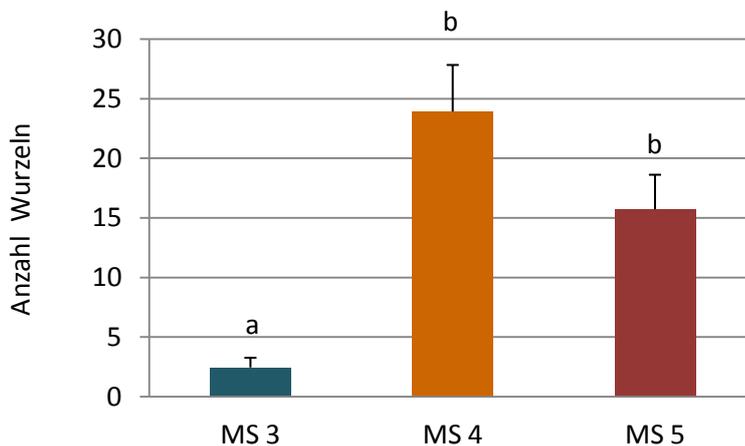
**Diagramm 13:** Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS) mit 1 µM Kin auf die Hyperhydratisierung (%) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11a. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Die Bildung des größten Kallusdurchmessers von fast 4 mm verursachte das Basismedium MS 3 mit voller Ionenstärke (Diagramm 14). Medium MS 5 führte zu Kallus mit 3,1 mm Durchmesser. Auf Medium MS 4 wurde der kleinste Durchmesser eruiert (2,6 mm).



**Diagramm 14:** Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS) mit 1 µM Kin auf die Bildung von Kallus (durchschnittlichen Kallusdurchmesser) in mm in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11a. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Für die Beurteilung der Bewurzelung wurde in diesem Versuch die insgesamt erhaltene Wurzelzahl in jedem Nährmedium ausgewertet (Diagramm 15).



**Diagramm 15:** Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS) mit 1 µM Kin auf Anzahl der gebildeten Wurzeln in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11a. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Mit halber Konzentration an Makroelementen wurden die meisten Wurzeln gebildet, es entstanden fast 24 Wurzeln (Abb. 16 und Diagramm 15, S. 26):

Die mit Medium MS 4 erhaltenen Wurzelzahlen unterschieden sich signifikant von den auf Medium MS 3 gemessenen Werten (2,5 Wurzeln). Auf Medium MS 5 entstanden 16 Wurzeln.

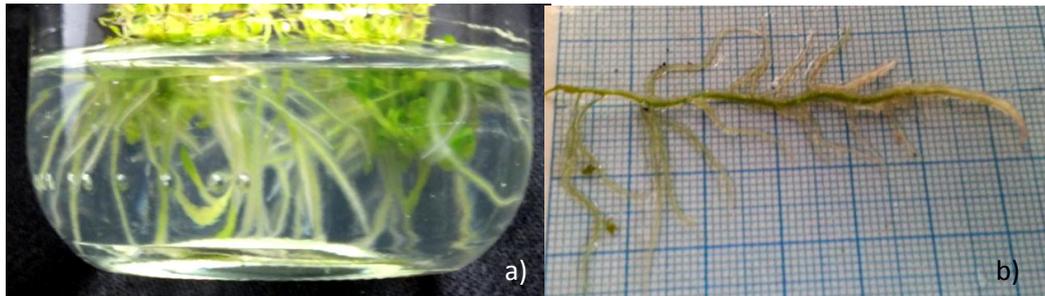
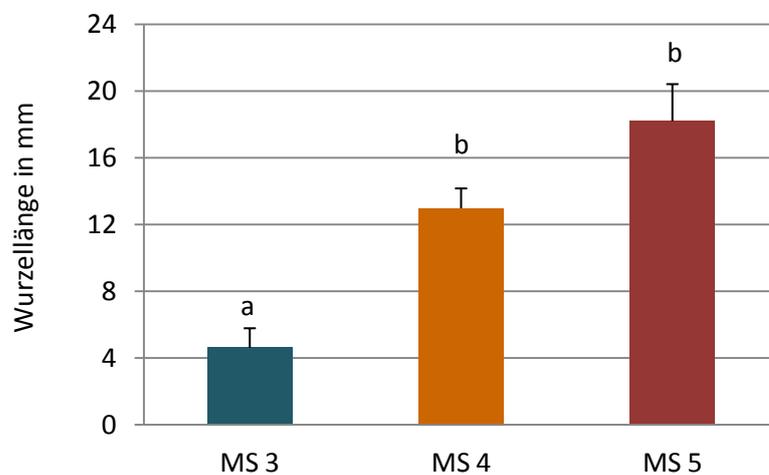


Abbildung 16: Wurzelbildung an Explantaten von *L. tibetica* Klon **11a** auf Medium MS 4 (a) und MS 5 (b) mit 1  $\mu$ M Kinetin

Die längsten Wurzeln entstanden bei der niedrigsten Konzentration an Makroelementen (Medium MS 5) (Diagramm 16).



**Diagramm 16:** Einfluss der Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4:  $\frac{1}{2}$  MS, MS 5:  $\frac{1}{4}$  MS) mit 1  $\mu$ M Kin auf die durchschnittliche Wurzellänge (mm) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11a. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Mit Medium MS 5 entstanden durchschnittlich 18,2 mm lange Wurzeln, aus Medium MS 4 wurden im Durchschnitt 13 mm lange Wurzeln gemessen.

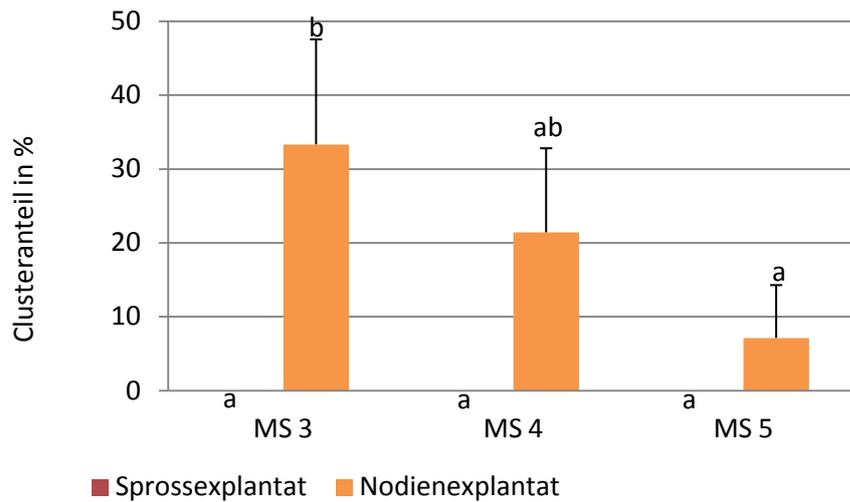
Die kürzesten Wurzeln wurden bei voller Ionenstärke gebildet, sie wiesen eine durchschnittliche Länge von 4,6 mm auf. Diese unterschied sich sowohl von der aus Medium MS 4 als auch von der aus Medium MS 5 berechneten durchschnittlichen Wurzellänge signifikant.

### **3.3. Einfluss des Explantattyps auf die Vermehrung**

In Rahmen dieser Diplomarbeit stellte sich auch die Frage, wie sich unterschiedliche Explantate der *Lancea tibetica* im Wachstum verhalten. Daher wurden sowohl Nodien-, als auch Sprosskulturen angelegt und am Ende der Kulturperiode wurden die für die beiden Explantattypen erhaltenen Daten bezüglich verschiedener Kriterien verglichen. Als Nährmedien kamen auch hier das MS Medium in voller (MS 3), halber (MS 4) und geviertelter (MS 5) Ionenstärke zum Einsatz. So konnte außerdem beobachtet werden, welchen Einfluss die Ionenstärke auf die Vermehrung der Spross- und Nodienexplantate hatte. Alle Medien wurden mit 1  $\mu$ M Kinetin verstetzt. Dieser Versuch wurde mit Klon 11b durchgeführt, da von diesem sowohl genügend Nodien als auch genügend Sprosse bzw. Sprossspitzen zur Verfügung standen.

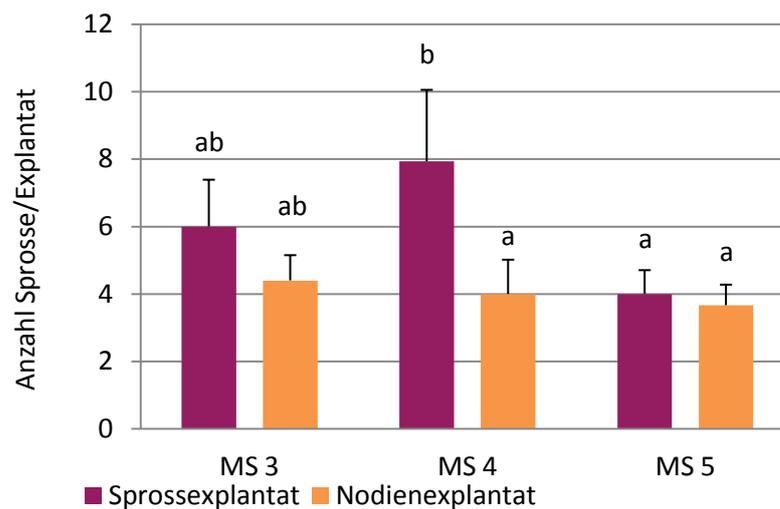
Bezüglich der Clusterbildung wurde beobachtet, dass sich aus den Sprosexplantaten keine Sprossaggregate gebildet hatten (Diagramm 17, S. 29).

Der Anteil der aus den Nodienexplantaten gebildeten Cluster war umso größer, je höher die Ionenkonzentration im Medium war. Er betrug auf Medium MS 3 33,3 % auf Medium MS 4 21,4 % und auf Medium MS 5 7,1 %. Zwischen den für Medium MS 3 und den den für Medium MS 5 erhaltenen Clusteranteilen wurde Signifikanz beobachtet.



**Diagramm 17:** Einfluss von Explantattyp (Spross- bzw. Nodienexplantat) und Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4:  $\frac{1}{2}$  MS, MS 5:  $\frac{1}{4}$  MS) mit  $1 \mu\text{M}$  Kinetin auf den Anteil gebildeter Cluster (%) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11b. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

Die Anzahl an gebildeter Sprosse pro Explantat war bei allen 3 eingesetzten Makroelementkonzentrationen in den Sprosskulturen höher als in den Nodienkulturen (Diagramm 18).



**Diagramm 18:** Einfluss von Explantattyp (Spross- bzw. Nodienexplantat) und Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: Voll-MS, MS 4:  $\frac{1}{2}$  MS, MS 5:  $\frac{1}{4}$  MS) mit  $1 \mu\text{M}$  Kinetin auf die Anzahl gebildeter Sprosse pro Explantat in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11b. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p=0,05$ )

Aus den Sprosexplantaten regenerierten auf Medium MS 4 die meisten Sprosse (8 Sprosse, aus Nodienexplantaten wurden halb so viele neue Sprosse gebildet.

Es lag nur auf halbkonzentriertem Medium Signifikanz zwischen Nodien-, und Sprosexplantaten vor.

Bezüglich der Ionenstärke beobachteten wir zwischen dem MS 4- und dem MS 5-Medium der Sprosexplantate einen signifikanten Unterschied.

Obwohl sich in den Nodienkulturen Cluster gebildet hatten, lieferten die Sprosskulturen in Summe mehr Sprosse. Dies lag daran, dass viele der in diesem Versuch gebildeten Cluster, wie Abbildung 17 zeigt, aus sehr kurzen, teilweise bräunlich verfärbten Sprossen bestanden, die für eine Weitervermehrung nicht geeignet sind. Die Cluster wurden zwar in die Berechnung des Clusteranteils miteinbezogen, die Sprosse aus denen sie bestanden, wurden aber in der Auswertung der erhaltenen Sprosszahl nicht berücksichtigt.

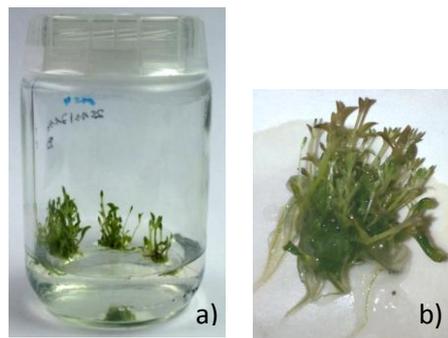
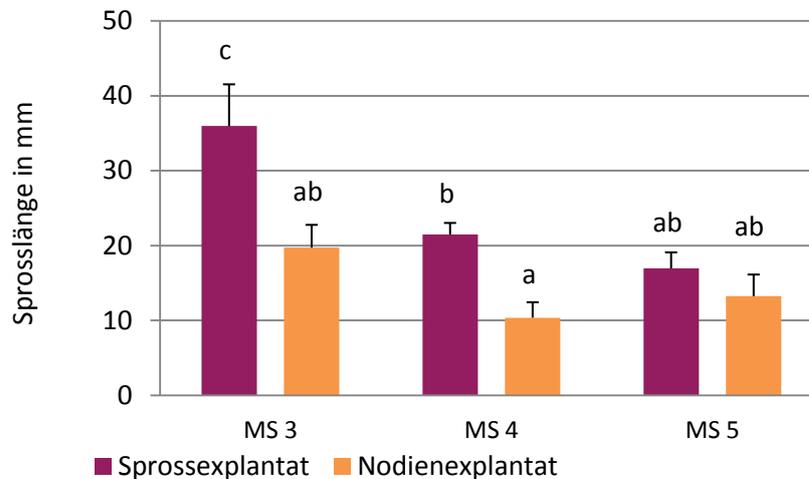


Abbildung 17: Clusterbildung in Nodienkulturen von *L. tibetica* Klon **11b** a) mit teilweise bräunlich verfärbten Sprossen b)

Bei allen 3 eingesetzten Ionenstärken wurden aus den Sprosexplantaten höhere Sprosslängen erreicht als aus den Nodienexplantaten (Diagramm 19, S. 31).

Zwischen den aus den beiden Explantattypen erhaltenen Sprosslängen lagen in den Medien MS 3 und MS 4 signifikante Unterschiede vor. Die aus den Sprosexplantaten regenerierten Sprosse waren umso länger je höher die Konzentration der Makroelemente in den Nährmedien war. Die höchste durchschnittliche Sprosslänge lieferten die Sprosexplantate auf Medium MS 3, sie betrug 36 mm. Signifikanz lag außerdem zwischen den Nährmedien der

Sprosskulturen vor und zwar zwischen dem Nährmedium mit voller (MS 3) und dem mit halber (MS 4) Ionenstärke.

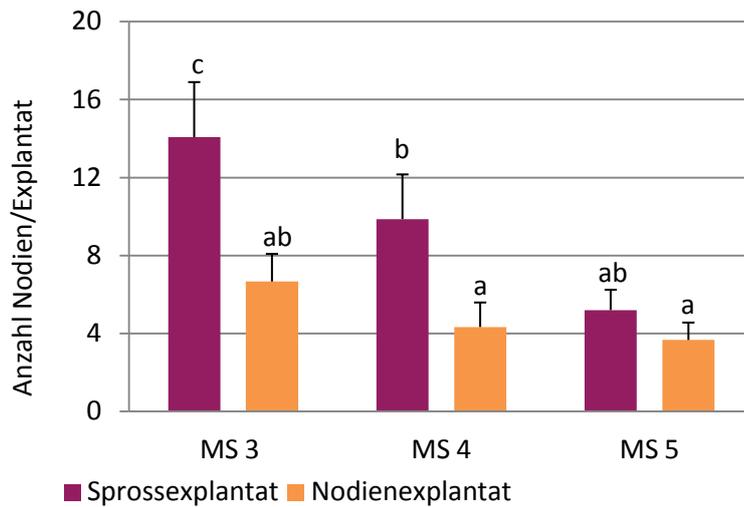


**Diagramm 19:** Einfluss von Explantattyp (Spross-, bzw. Nodienexplantat) und Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS) mit 1 µM Kinetin auf die durchschnittliche Sprosslänge (mm) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11b. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p= 0,05)

Aus den Sprossexplantaten konnten auch mehr Nodien erhalten werden als aus den Nodienexplantaten (Diagramm 20, S. 31).

Die meisten Nodien pro Explantat lieferten die im MS 3 Medium inokulierten Sprosse (14 Nodien). Sowohl in den Spross-, als auch in den Nodienkulturen sank die durchschnittliche Anzahl an Nodien mit abnehmender Konzentration an Makroelementen in den Nährmedien. Auf den Medien MS 3 und MS 4 lag ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Explantattypen vor.

Was die Nährmedien betrifft, so lag zwischen Medium MS 3 und den anderen beiden Medien der Sprossexplantate ein signifikanter Unterschied vor.



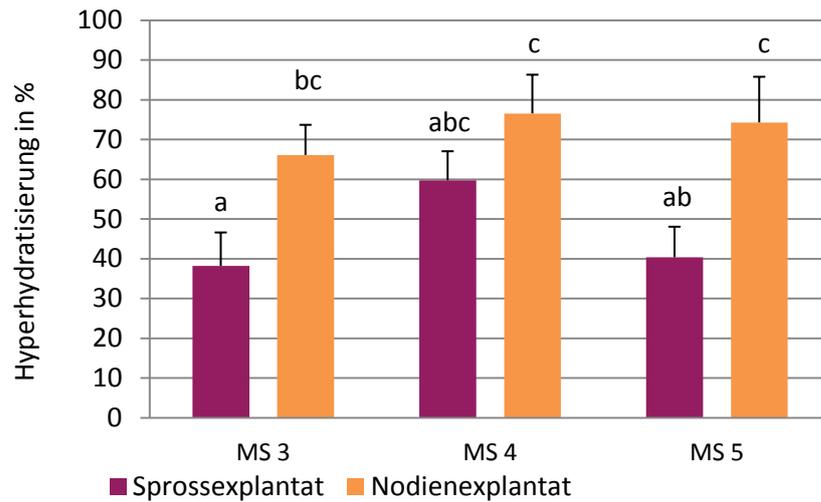
**Diagramm 20:** Einfluss von Explantattyp (Spross-, bzw. Nodienexplantat) und Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4:  $\frac{1}{2}$  MS, MS 5:  $\frac{1}{4}$  MS) mit 1  $\mu$ M Kinetin auf die Anzahl gebildeter Nodien pro Explantat in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11b. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen war in allen 3 eingesetzten Ionenstärken in den Nodienkulturen höher als in den Sprosskulturen (Diagramm 21, S. 33).

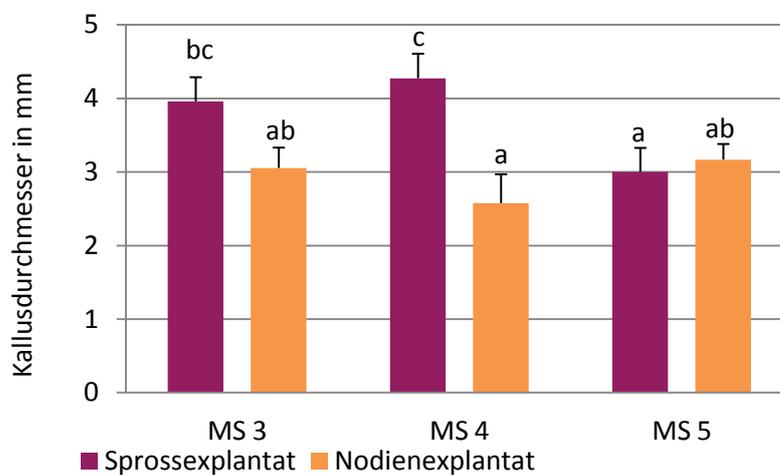
Die meisten hyperhydratisierten Sprosse des Versuchs ermittelten wir auf Medium MS 4 (76,6 %) und die kleinste Anzahl (38,2 %) in den Sprosskulturen auf Medium MS 3.

Der größte Kallusdurchmesser dieses Versuchs trat in den Sprosskulturen auf Medium mit halber Ionenstärke (MS 4) auf, er betrug dort 4,3 mm (Diagramm 22, S. 33).

Auch bei voller Konzentration an Makroelementen wurde der größere Kallusdurchmesser aus den Sprosexplantaten ermittelt. Auf Medium MS 5 erreichten die Kalli beider Explantattypen annähernd gleiche Durchmesser.



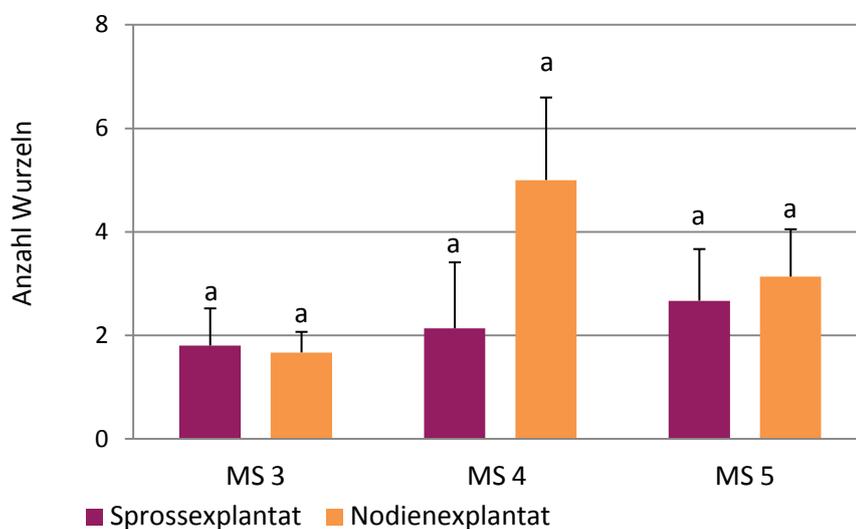
**Diagramm 21:** Einfluss von Explantattyp (Spross-, bzw. Nodienexplantat) und Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4:  $\frac{1}{2}$  MS, MS 5:  $\frac{1}{4}$  MS) mit 1  $\mu$ M Kinetin auf die Hyperhydratisierung (%) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11b. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )



**Diagramm 22:** Einfluss von Explantattyp (Spross-, bzw. Nodienexplantat) und Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4:  $\frac{1}{2}$  MS, MS 5:  $\frac{1}{4}$  MS) mit 1  $\mu$ M Kinetin auf den durchschnittlichen Kallusdurchmesser (mm) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11b. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Bezüglich der Wurzelbildung wurde wie in Kapitel 3.2. (Seite 22) die insgesamt generierte Anzahl an gebildeten Wurzeln in jedem Nährmedium ermittelt. Es lag auf allen 3 eingesetzten Medien kein signifikanter Unterschied zwischen den Explantattypen vor (Diagramm 23).

Die meisten Wurzeln (5) entstanden bei halber Ionenstärke aus den Nodienkulturen (Abbildung 18, S. 35). Auch auf Medium MS 5 konnten in den Nodienkulturen etwas mehr Wurzeln gebildet werden als in den Sprosskulturen. Bei voller Ionenstärke bildeten Nodien- und Sprosskulturen fast gleich viele Wurzeln aus.



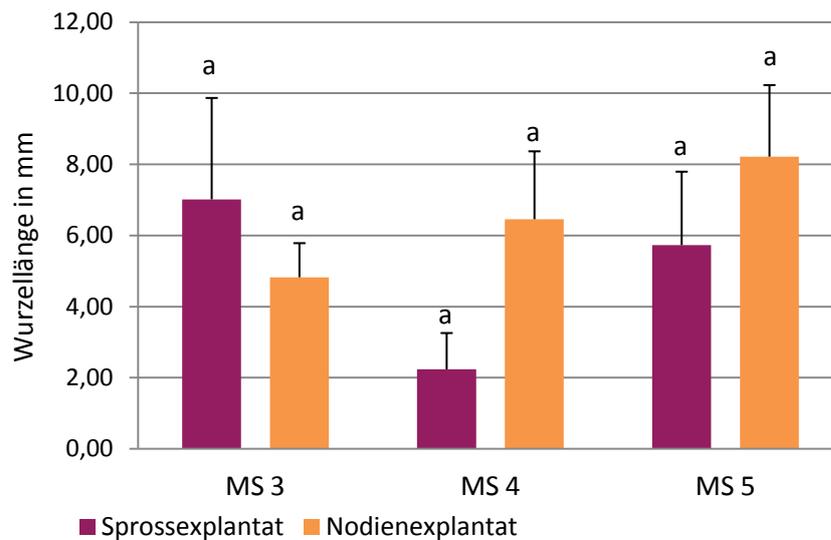
**Diagramm 23:** Einfluss von Explantattyp (Spross-, bzw. Nodienexplantat) und Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS) mit 1 µM Kinetin auf die Anzahl der gebildeten Wurzeln pro Explantat in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11b. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Die längsten Wurzeln wurden mit Nodienexplantaten auf Medium MS 5 gewonnen (8,2 mm, Diagramm 24). In den Sprosskulturen des gleichen Mediums kamen die Wurzeln auf 5,7 mm Länge.

Die Nodienkulturen lieferten umso längere Wurzeln, je niedriger konzentriert die Makroelemente in den Medien vorlagen.

Bezüglich der Wurzellänge lag kein signifikanter Unterschied zwischen Spross- und Nodienexplantaten vor.

Bei den Sprosskulturen war der Zusammenhang zwischen Wurzellänge und Ionenstärke im Medium nicht so eindeutig, die längsten Wurzeln aus Sprosexplantaten wurden auf Medium MS 3 (7 mm) gefunden, während auf halbkonzentriertem Medium die kürzesten Wurzeln (2,2 mm) entstanden, und auf dem Medium mit der niedrigsten Konzentration an Makroelementen die zweitlängsten Wurzeln (5,7 mm) wuchsen.



**Diagramm 24:** Einfluss von Explantattyp (Spross-, bzw. Nodienexplantat) und Ionenstärke des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4:  $\frac{1}{2}$  MS, MS 5:  $\frac{1}{4}$  MS) mit 1  $\mu$ M Kinetin auf die durchschnittliche Wurzellänge (mm) in Kulturen von *L. tibetica* Klon 11b. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )



Abbildung 18: Wurzelbildung in einer Nodienkultur von *L. tibetica* Klon **11b** auf Medium MS 5 mit 1  $\mu$ M Kinetin

### 3.4. Einfluss des Genotyps auf die Vermehrung

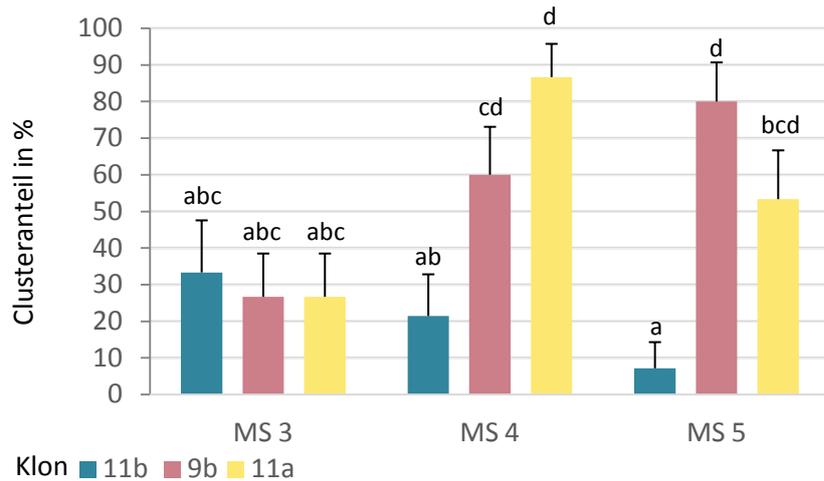
Die während dieser Diplomarbeit eingesetzten Klone aus *Lancea tibetica* waren jeweils aus einem eigenen Samen etabliert worden, somit stellte jeder Klon einen eigenen Genotyp dar. Optisch betrachtet machten sich teilweise große Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen während der Kultivierung bemerkbar. Deshalb soll in diesem Kapitel statistisch analysiert werden, ob und inwiefern Signifikanzen im Bezug auf die verschiedenen Kriterien vorlagen. Dazu wurden bereits erhobene Daten dreier Klone bei voller, halber und geviertelter Ionenstärke verglichen. Da das Hauptaugenmerk auf dem Verhalten der Versuchsklone lag, wird im Folgenden nicht auf die Unterschiede der verschiedenen Ionenstärken eingegangen.

Es wurden zwei Versuchsklone der vorliegenden Arbeit (Klone 11a und 11b) und Klon 9b von Nguyen (Diplomarbeit in Vorbereitung) miteinander verglichen. Herangezogen wurden hierfür die Daten der Nodienkulturen aus dem Versuch zum Einfluss der Ionenstärke (Kapitel 3.2., S. 22) und die Daten der Nodienkulturen aus dem Versuch zum Einfluss des Explantattyps (Kapitel 3.3., S. 28). Die entsprechenden Daten für Klon 9b wurden freundlicherweise von Nguyen (Diplomarbeit in Vorbereitung) zur Verfügung gestellt.

Der Clusteranteil war bei voller Ionenstärke bei allen drei Klonen (Medium MS 3) sehr ähnlich, es lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten vor (Diagramm 25, S. 37).

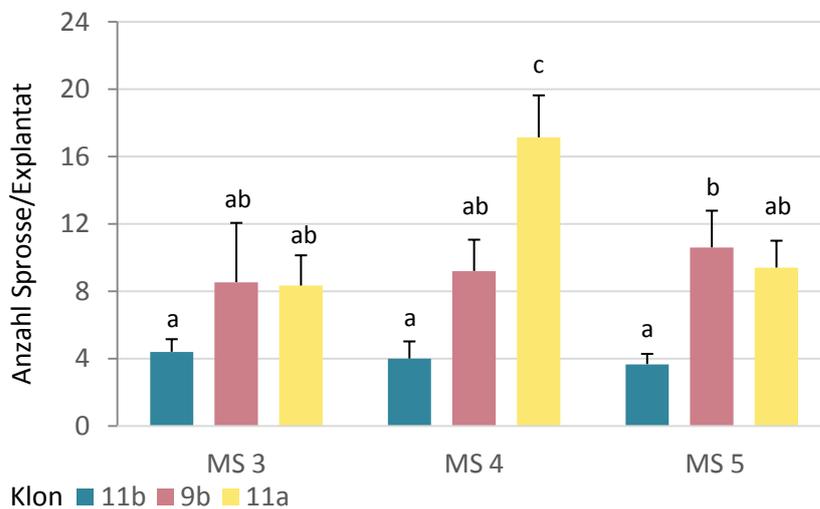
Auf halbkonzentriertem Medium MS 4 hatten die Explantate des Klons 11b zu 21,4 % Cluster gebildet. Dieser Wert unterschied sich signifikant vom Prozentsatz der Klone 9b (60 %) und 11a (86,7 %).

Auf dem Medium MS 5 (auf ein Viertel reduzierte Konzentration an Makroelementen) wiesen die Explantate des Klons 9b die meisten Cluster auf (80 %). Es lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Clusteranteilen des Klons 9b und 11b (7,1 %) sowie des Klons 11b und 11a (53,3 %) vor.



**Diagramm 25:** Vergleich der Clusteranteile (%) bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (11b, 9b, 11a) bei verschiedenen Ionenstärken des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS) mit 1 µM Kinetin. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p = 0,05)

Auf Medium MS 4 wurden bei Klon 11a die meisten Sprosse gebildet (Diagramm 26).

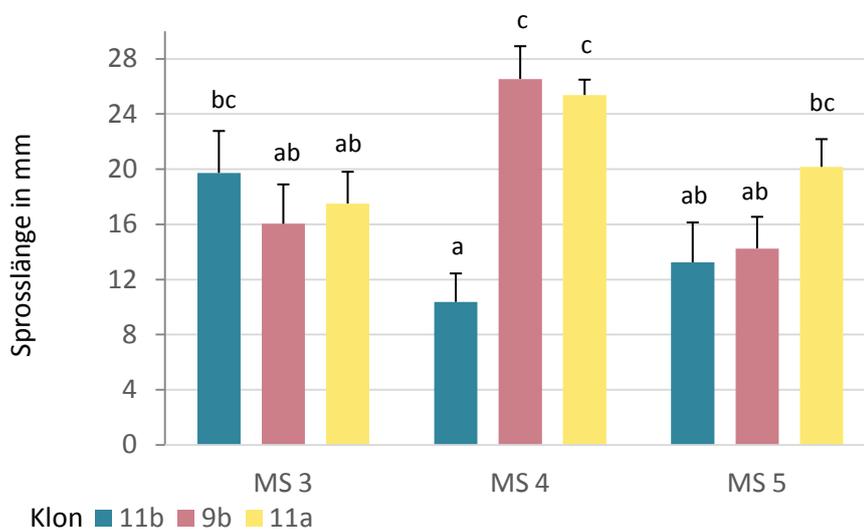


**Diagramm 26:** Vergleich der Anzahl gebildeter Sprosse pro Explantat bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (11b, 9b, 11a) bei verschiedenen Ionenstärken des Nährmediums (MS 3: Voll-MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS, ). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p = 0,05)

Mit 17 Sprossen pro Explantat unterschied sich der Wert im Medium MS 4 signifikant von den Werten der Klone 11b (4 Sprosse) und 9b (9 Sprosse).

Im Medium mit geviertelter Makroelementkonzentration bildete Klon 9b die meisten Sprosse (11). Dieser Wert unterschied sich signifikant von der aus dem Klon 11b erhaltenen durchschnittlichen Sprosszahl (4).

Die höchsten Sprosslängen wurden für die Klone 9b (26,5 mm) und 11a (25,4 mm) aus dem halbkonzentrierten Nährmedium MS 4 ermittelt (Diagramm 27).

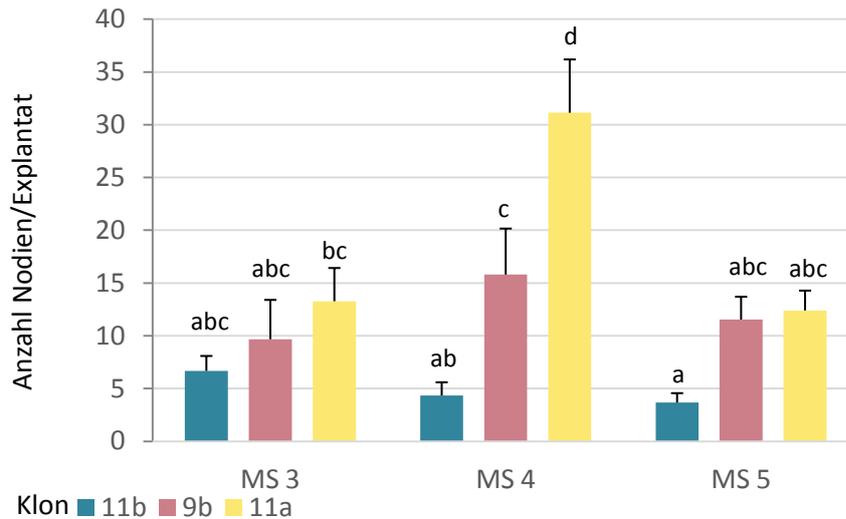


**Diagramm 27:** Vergleich der durchschnittlichen Sprosslänge (mm) bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (11b, 9b, 11a) bei verschiedenen Ionenstärken des Nährmediums (MS 3: Voll-MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Beide Werte unterschieden sich signifikant von der für Klon 11b berechneten durchschnittlichen Sprosslänge (10,4 mm) des MS 4 Mediums.

Sowohl auf Medium MS 3 als auch auf Medium MS 5 lag bezüglich der Sprosslängen keine Signifikanz zwischen den 3 Klonen vor.

Die meisten Nodien wurden mit Klon 11a (31 Nodien) auf Medium MS 4 (mit halber Ionenstärke) gebildet (Diagramm 28).



**Diagramm 28:** Vergleich der Anzahl gebildeter Nodien pro Explantat bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (11b, 9b, 11a) bei verschiedenen Ionenstärken des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Klon 9b bildete auf den halbkonzentrierten Nährmedien durchschnittlich 16 Nodien und aus den Explantaten des Klon 11b regenerierten 4 Nodien. Es lag ein signifikanter Unterschied zwischen allen 3 Klonen vor.

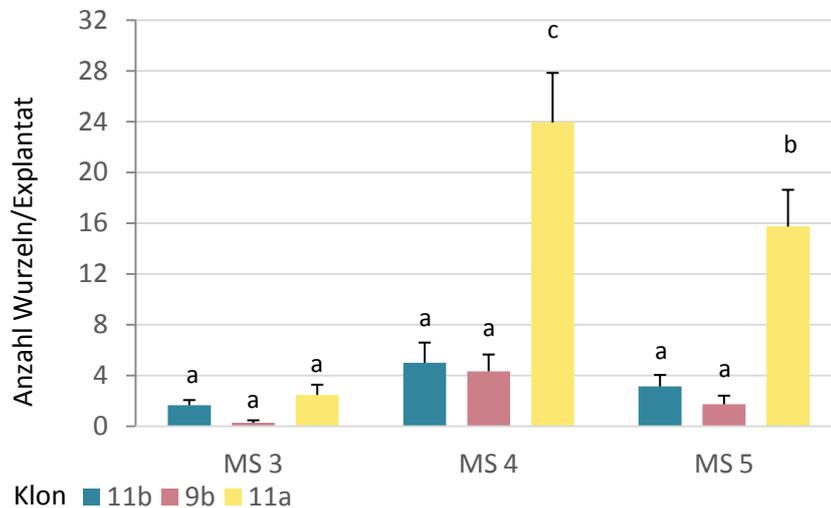
In den Nährmedien mit voller (MS 3) und auf ein Viertel (MS 5) reduzierter Konzentration an Makroelementen wurde keine Signifikanz zwischen den Klonen beobachtet.

Vergleicht man die Daten bezüglich der Anzahl an Wurzeln pro Explantat, so stellt man fest, dass signifikante Unterschiede nur zwischen den Medien MS 4 und MS 5 vorlagen (Diagramm 29, S. 40).

Nur bei Klon 11a konnte mit 24 Wurzeln/Explantat auf dem Medium MS 4 die Bildung einer größeren Anzahl an Wurzeln beobachtet werden die sich signifikant von den für die Klone 11b (5 Wurzeln) und 9b (4 Wurzeln) berechneten Daten unterschied.

Mit geviertelter Ionenstärke wurde die zweitgrößte Anzahl an Wurzeln (16), bei Klon 11a erhalten. Auch bei der niedrigsten Makroelementkonzentration wurde Signifikanz zwischen dem Klon 11a und den beiden anderen Klonen beobachtet.

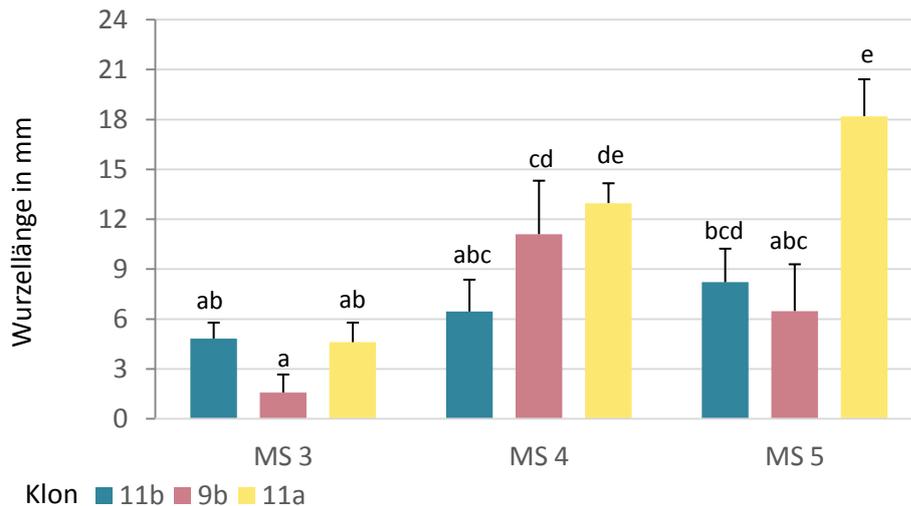
Diese, Klon 11b (3 Wurzeln/Explantat) und Klon 9b (2 Wurzeln/Explantat), unterschieden sich in ihrer durchschnittlichen Anzahl an Wurzeln nicht signifikant voneinander.



**Diagramm 29:** Vergleich der Anzahl gebildeter Wurzeln pro Explantat bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (11b, 9b, 11a) bei verschiedenen Ionenstärken des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

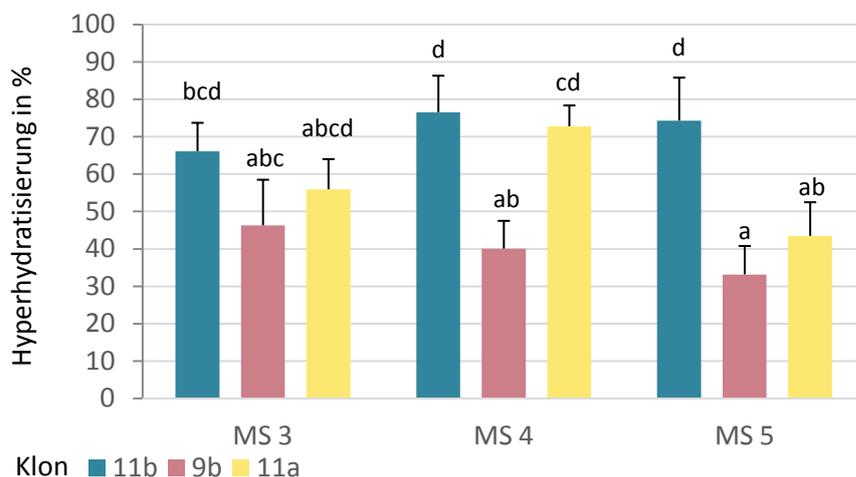
Klon 11a bildete bei geviertelter Ionenstärke (MS 5) die längsten Wurzeln (18,2 mm), gefolgt von Klon 11b (8,2 mm) und Klon 9b (6,5 mm). Die Klone 9b und 11a sowie die Klone 11b und 11a unterschieden sich in ihren Ergebnissen signifikant voneinander.

Auch auf Medium MS 4 wurden die längsten Wurzeln in den Kulturen des Klons 11a gebildet. Sie wiesen eine durchschnittliche Länge von 13 mm auf, die sich von der Wurzellänge des Klons 11b (6,5 mm) signifikant unterschied.



**Diagramm 30:** Vergleich der durchschnittlichen Wurzellänge (mm) bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (11b, 9b, 11a) bei verschiedenen Ionenstärken des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Betrachtet man den Anteil an hyperhydratisierten Sprossen, so wies Klon 11b auf den Nährmedien der vollen Ionenstärke mit 66,1 % einen etwas höheren Anteil auf als Klon 11a (55,9 %, Diagramm 31).



**Diagramm 31:** Vergleich der Hyperhydratisierung (%) bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (11b, 9b, 11a) bei verschiedenen Ionenstärken des Nährmediums (MS 3: MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

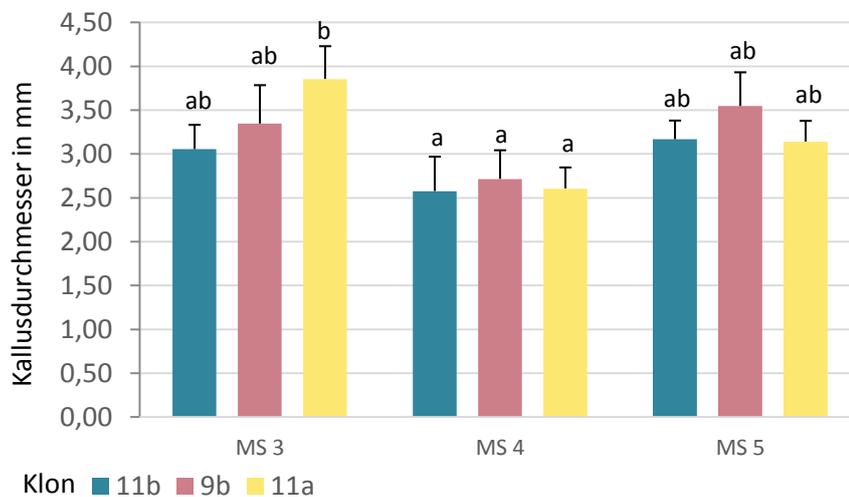
Die niedrigste Hyperhydratisierungsrate auf Medium mit voller Ionenstärke trat bei Klon 9b auf und betrug 46,3 %.

Bei halber Ionenstärke (MS 4) zeigte Klon 11b die meisten hyperhydratisierten Sprosse (76,6 %).

Bei Klon 11a waren auf demselben Medium 72,8 % der Sprosse hyperhydratisiert, den kleinsten Anteil an hyperhydratisierten Sprossen wies Klon 9b auf (40 %).

Auf dem Nährmedium mit geviertelter Ionenstärke (MS 5) wies Klon 11b die höchste Hyperhydratisierungsrate auf (74,3 %). Der Prozentsatz des Klons 9b betrug 33,1 %, der des Klons 11a 43,5 %.

Schließlich soll die Kallusbildung an den Explantaten der 3 Klone besprochen werden: Die Größe der Kalli fiel bei allen drei Klonen sehr ähnlich aus, jedenfalls wurden bei allen 3 eingesetzten Klonen die kleinsten Durchmesser für das Medium MS 4 eruiert. Im MS 3 Medium wies Klon 11a, im MS 5 Medium Klon 9b die kleinsten Durchmesser auf (Diagramm 32).

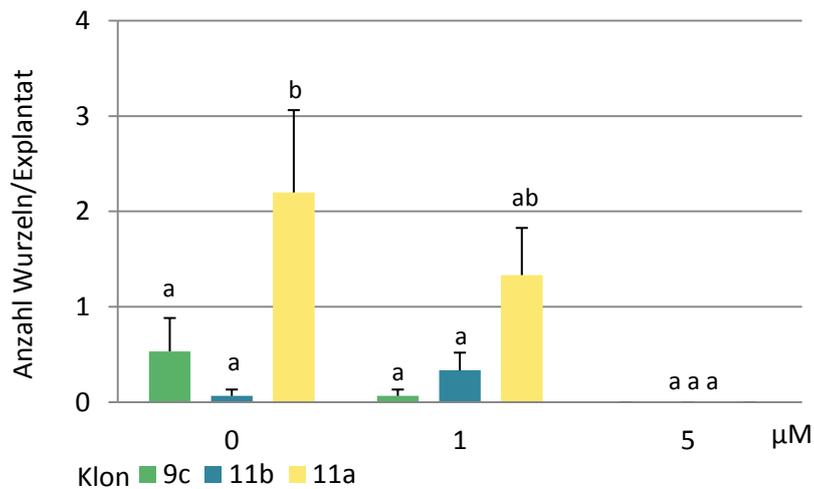


**Diagramm 32:** Vergleich des durchschnittlichen Kallusdurchmessers (mm) bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (11b, 9b, 11a) bei verschiedenen Ionenstärken des Nährmediums (MS 3: Voll-MS, MS 4: ½ MS, MS 5: ¼ MS). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

### 3.5. Voruntersuchungen zum Einfluss von Auxinen auf die Bewurzelung

Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen der Einfluss der Cytokinine Kinetin und 2iP sowie der Ionenstärke des Basismediums und des Explantattyps auf die Vermehrung von *Lancea tibetica*. Da aber die Bewurzelung von Sprossen für eine anschließende Akklimatisierung (Gomes et al., 2010) und die Kultivierung im Glashaus bzw. das Anlegen einer Feldkultur unerlässlich ist, wurden erste Untersuchungen zur Bewurzelung von Sprossexplantaten mit dem Auxin IAA durchgeführt. Dazu wurden Sprossspitzen der Klone 11a, 11b und 9c herangezogen, die wir in Nährmedien mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  oder 5  $\mu\text{M}$  IAA kultivierten (siehe Kapitel 2.3, S. 6).

Wir konnten beobachten, dass sich die Wurzelbildung bei den 3 eingesetzten Versuchsklonen auf den Medien mit 1 oder 5  $\mu\text{M}$  IAA unterschied (Diagramm 33).



**Diagramm 33:** Einfluss verschiedener IAA-Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) auf die Anzahl gebildeter Wurzeln pro Explantat bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (9c, 11a, 11b). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

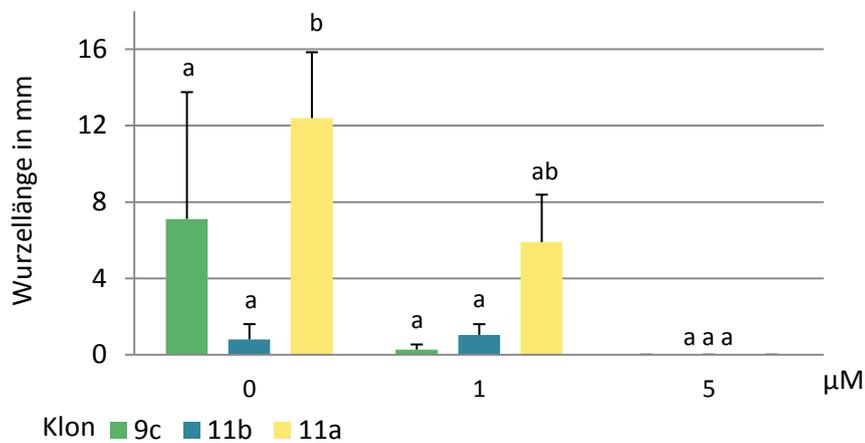
So wurden die meisten Wurzeln pro Explantat von Klon 11a gebildet, während Explantate der Klone 9c und 11b kaum Wurzelbildung zeigten. Sowohl bei Klon 9c als auch bei Klon 11a wuchsen auf dem auxinfreien Medium mehr Wurzeln als auf den Nährmedien mit IAA. Es lag jedoch bei beiden Klonen kein signifikanter

Unterschied zwischen den in auxinfreien und den in auxinhaltigen Kulturen erhaltenen Wurzelzahlen vor.

Bei Verwendung von 5  $\mu\text{M}$  IAA blieb die Wurzelbildung bei allen 3 Klonen aus.

Bezüglich der Wurzellänge lieferte Klon 11a im auxinfreien Medium (Abbildung 19) mit durchschnittlich 12,4 mm den höchsten Wert, mit 1  $\mu\text{M}$  IAA entstanden 5,9 mm lange Wurzeln (Diagramm 34).

Klon 9c bildete ebenfalls auf wachstoffsreichem Medium (7,1 mm) längere Wurzeln als mit 1  $\mu\text{M}$  IAA.



**Diagramm 34:** Einfluss verschiedener IAA-Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) auf die durchschnittliche Wurzellänge (mm) bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (9c, 11a, 11b). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )



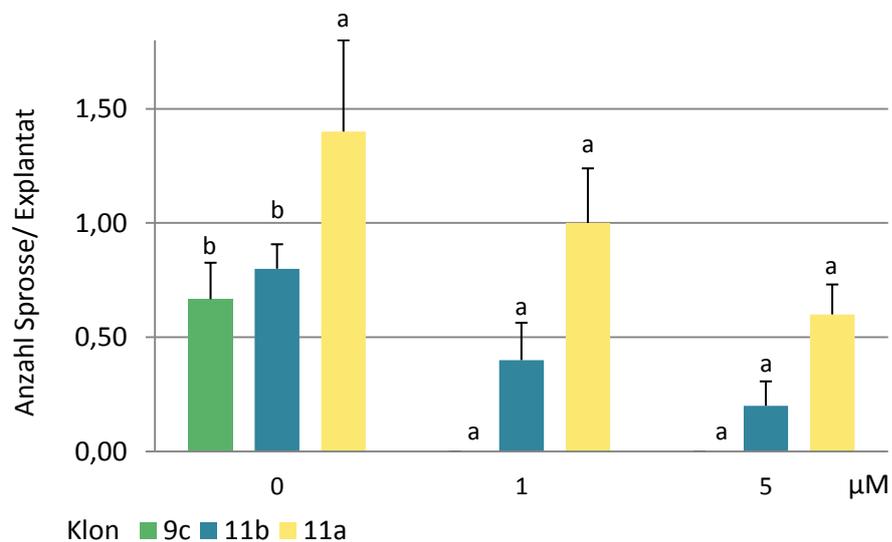
Abbildung 19: Entwicklung des Wurzelsystems in Kulturen von *L. tibetica* Klon **11a** auf Medium ohne Wachstumsstoffe (Kontrolle) nach a) 3 b) 6 und c) 7 Wochen Kulturdauer

Mit 5  $\mu\text{M}$  IAA im Medium wurden an den Explantaten der Klone 11a und 11b keine Wurzeln gebildet, allerdings kam es bei dieser Auxinkonzentration bei beiden Klonen zu Sprosswachstum bzw. Sprossneubildung (Abbildung 10).



Abbildung 10: Sprosswachstum in Kulturen von *L. tibetica* Klon **9c** (a), Klon **11b** (b) und Klon **11a** (c) auf auxinfreiem Medium

Die meisten Sprosse wurden bei beiden Klonen auf auxinfreiem Medium gebildet (Diagramm 35).

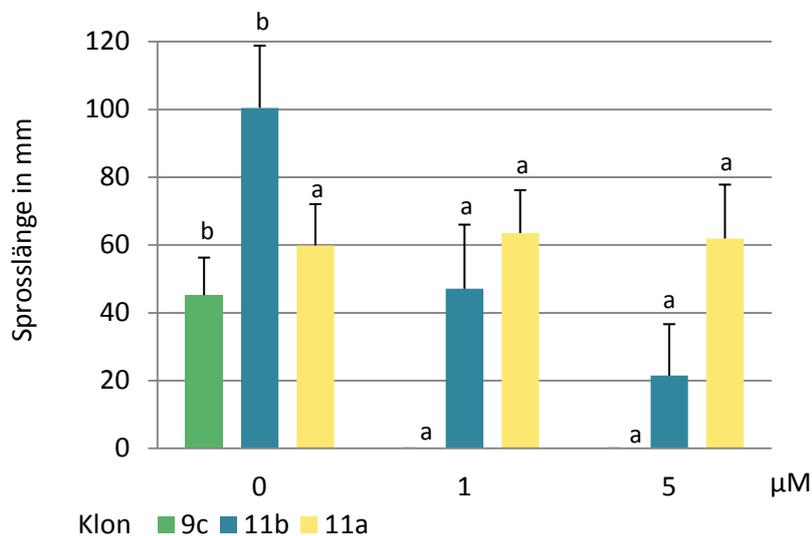


**Diagramm 35:** Einfluss verschiedener IAA-Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) auf die Anzahl gebildeter Sprosse pro Explantat bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (9c, 11a, 11b). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Die zweithöchste Sprosszahl für die Klone 11a und 11b war bei Einsatz von 1  $\mu\text{M}$  IAA zu beobachten, mit 5  $\mu\text{M}$  IAA wurden die wenigsten Sprosse gezählt.

Bei Klon 11b lag zwischen den aus dem auxinfreien Medium und den aus den beiden IAA- hältigen Nährmedien ausgewerteten Sprosszahlen Signifikanz vor.

Im Bezug auf die Elongation der erhaltenen Sprosse regenerierten die längsten Sprosse auf den wachsstofffreien Nährmedien aus den Sprossspitzen des Klons 11b. Sie erreichten 100,5 mm und dieser Wert unterschied sich signifikant von den Sprosslängen, die aus den auxinhaltigen Nährmedien ermittelt wurde (Diagramm 36).



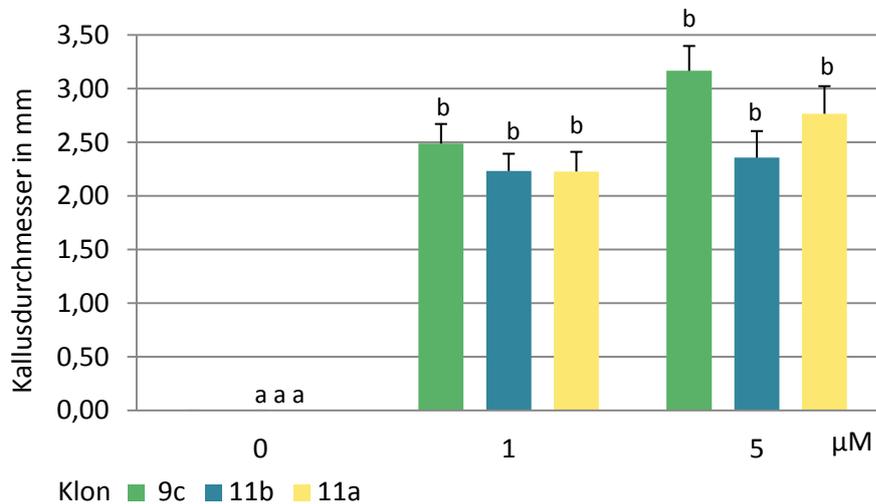
**Diagramm 36:** Einfluss verschiedener IAA-Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) auf die durchschnittliche Sprosslänge (mm) bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (9c, 11a, 11b). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Die bei Klon 11a (Abbildung 21, S. 48) auf allen Nährmedien ermittelten Sprosslängen betragen sowohl bei beiden eingesetzten Auxinkonzentrationen als auch in den auxinfreien Kulturen des Klons 11a knapp 60 mm.

Bei Klon 11b entstanden mit 1  $\mu\text{M}$  IAA 47,1 mm lange und mit 5  $\mu\text{M}$  IAA 21,5 mm lange Sprosse.

An den Explantaten des Klons 9c kam es mit 1  $\mu\text{M}$  IAA zwar zu einer Ausbildung von Wurzeln, eine gleichzeitige Sprosselongation blieb bei dieser Auxinkonzentration aber aus (Abbildung 21 c), S. 48).

Abschließend wurde das Auftreten von Kallus in den Sprosskulturen analysiert.



**Diagramm 37:** Einfluss verschiedener IAA-Konzentrationen auf den durchschnittlichen Kallusdurchmesser (mm) bei 3 Versuchsklonen von *L. tibetica* (9c, 11a, 11b). Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Balken mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,05$ )

Sofern Wachstum auf auxinfreien Medien stattfand, erfolgte dieses ohne Kallusbildung (Diagramm 37). Der größte Kallusdurchmesser ging mit der höchsten Auxinkonzentration einher und wurde in den Kulturen des Klons 9c beobachtet, er betrug 3,2 mm (Abbildung 11 d), S. 48).

Bei Klon 11a erreichte der Kallusdurchmesser mit 1  $\mu\text{M}$  IAA 2,2mm, mit 5  $\mu\text{M}$  IAA entstand Kallus mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2,8 mm (Abbildung 11 a), S.48)

Auch in den Kulturen des Klons 11b entstand der größere Kallus auf den Medien mit 5  $\mu\text{M}$  IAA (2,4 mm).

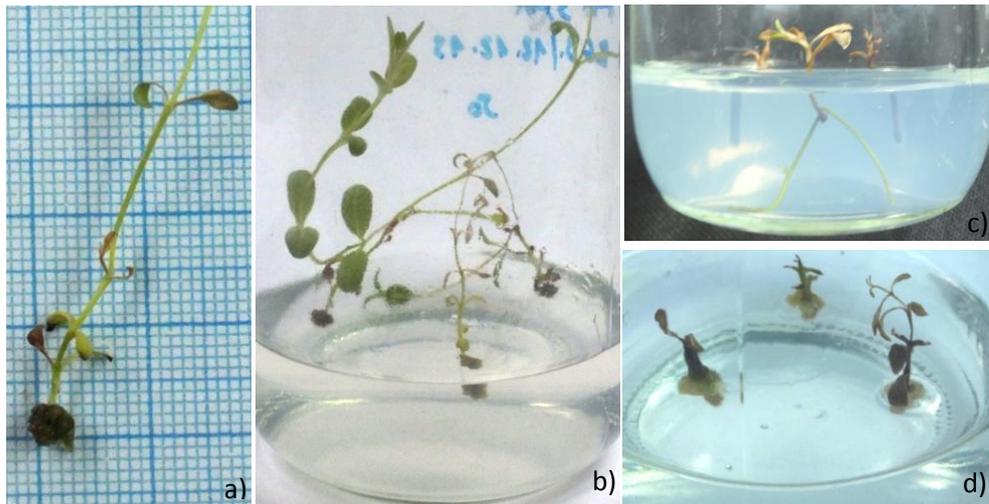


Abbildung 11: Wachstum von Explantaten zweier Klone von *L. tibetica* auf Medium mit 5  $\mu\text{M}$  IAA: a) Spross von Klon **11a** mit anhaftendem Kallus ohne Wurzelbildung nach und b) während der Kultur c) Wurzelbildung bei Klon **9c** ohne Sprosselongation d) abgestorbene Explantate des Klons **9c** mit anhaftendem Kallus

Hyperhydratisierte Sprosse traten in diesem Versuch sowohl bei Klon 9c als auch bei Klon 11a kaum auf. Klon 11b zeigte auf dem wachsstofffreiem Kontrollmedium keine Hyperhydratisierung, während mit 1 $\mu\text{M}$  IAA 10 % der Sprosse hyperhydratisiert waren, mit 5 $\mu\text{M}$  betrug der Anteil annähernd 100 %.

#### 4. Diskussion

*Lancea tibetica* ist eine in der Traditionellen Tibetischen Medizin (TTM) eingesetzte Heilpflanze, die ein breites Anwendungsspektrum hat. Obwohl Kletter et al. (2008) berichten, dass die asiatische Alternativmedizin, und somit unter anderem die TTM, in den letzten Jahrzehnten in Europa immer bekannter wurde, gibt es zu letzterer nur sehr wenige Publikationen (Witt et al., 2009). In China herrscht jedoch reges Interesse an der TTM (Witt et al., 2009), und *L. tibetica* wird dort seit einigen Jahren näher untersucht.

Aufgrund des umfangreichen Einsatzes, der steigenden Nachfrage sowie von klimatischen und anthropogenen Einflüssen haben die natürlichen Bestände von *L. tibetica* abgenommen, daher steht sie auf der Roten Liste der Mongolei (Mongolian Red List, 2011).

Die vorliegende Diplomarbeit befasst sich mit der in vitro-Vermehrung von *L. tibetica*, wobei die drei Klone 9c, 11a und 11b eingesetzt wurden. Für die Vermehrung über Nodien- bzw. Sprosskulturen testeten wir die Cytokinine 2iP und Kinetin in unterschiedlichen Konzentrationen. Neben den Cytokininene wurde auch die Ionenstärke des Basismediums variiert und untersucht, welchen Einfluss die volle, halbe und geviertelte Konzentration an Makroelementen im Nährmedium auf die Vermehrung hat.

Für eine effiziente in vitro Vermehrung von *Lancea tibetica* sollte eine möglichst hohe Sprossvermehrung erreicht werden, ohne dass übermäßige Hyperhydratisierung oder Kallusbildung eintreten: Hyperhydratisierte Sprosse sind ex vitro nicht lebensfähig, und aus Kallusgewebe können unter Umständen Sprosse regenerieren, die aufgrund von somoklonaler Variation vom ursprünglichen Genotyp abweichen.

In der pflanzlichen Biotechnologie werden Nodienkulturen für die Vermehrung über Regenerierung von Axillärsprossen eingesetzt, während Sprossspitzen vor allem für die Bewurzelung verwendet werden. Eines der Ziele dieser Arbeit war nachzuweisen, ob auch bei der Mikrovermehrung von *L. tibetica* der Einsatz von Nodien für die Sprossvermehrung und Sprossspitzen für die Bewurzelung zum Erfolg führt. Dabei sollten auch ersten Versuche zur Bewurzelung mit dem Auxin IAA angestellt werden.

Zunächst sollte eruiert werden, ob es zwischen den von uns eingesetzten Klonen Unterschiede gab, denn in der in vitro-Vermehrung haben neben den Wuchsstoffen und deren Konzentration die eingesetzten Genotypen den größten Einfluss auf Wachstum und Entwicklung in den Kulturen (Hesar et al., 2011). Die genotypischen Unterschiede zwischen unseren Versuchsklonen von *L. tibetica* wurden bereits in den ersten Wochen nach dem Etablieren der Kulturen sichtbar: Die einzelnen Klone reagierten sehr heterogen auf die Nährmedien. Der Einfluss des Genotyps auf die Versuchsergebnisse ist in der pflanzlichen Gewebekulturtechnik keine Seltenheit. Gomes et al. (2010) und Song et al. (2014) berichten zum Beispiel von variierenden Ergebnissen in Abhängigkeit von den eingesetzten Genotypen.

Außerdem sprachen die individuellen Klone sehr unterschiedlich auf 2iP und Kinetin an. 2iP zählt zu den aktivsten in der pflanzlichen Biotechnologie eingesetzten Cytokininen (Janarthana und Sumathi, 2011), bei Klon 11a war Kinetin dem 2iP aber überlegen (Diagramm 2, S. 12). Klon 9c wiederum zeigte mit Kinetin kaum Wachstum, mit 0,5 µM 2iP konnten aber etwa 16 Sprosse pro Nodienexplantat regeneriert werden. Bei Klon 11b bewirkte Kinetin die höhere Wachstumsrate, mit 0,5 µM des Cytokinins wurden 9 Sprosse pro Explantat gewonnen. Auch bei Klon 11a konnte man mit 2iP, im Vergleich zu Kinetin, die höheren Vermehrungsraten erzielen.

Bei einer Nodienkultur ist zwar durch das Entfernen der Sprossspitze die Apikaldominanz aufgehoben, und für die Ausbildung von Seitensprossen wären somit Cytokinine grundsätzlich nicht notwendig (Hess, 1992). Dennoch spielen Cytokinine in der Gewebekultur eine entscheidende Rolle (Hesar et al., 2011), denn auch sie heben die Apikaldominanz auf, wodurch Seitensprosse aus den Achselknospen der Explantate regenerieren können (Hess, 1992). Dies konnte sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Faisal et al. (2006) berichten, dass bei Abwesenheit von Wuchsstoffen kein Sprosswachstum in Nodienkulturen von *Mucunia prurens* auftrat. Auch in Wuchsstoff-freien Kulturen von *Camellia sinensis* wurden nur einzelne Sprosse gebildet (Gonbad et al., 2014). Bei *L. tibetica* trat eine sehr ähnliche Situation auf: In den Nodienkulturen auf Medien mit Cytokinin wurden meistens mehrere Sprosse pro Explantat gebildet, und zwar in Form von Sprossaggregaten (sog. Cluster). In

den Kulturen der wuchsstofffreien Kontrollmedien kam es hingegen wie bei Gonbad et al. (2014) zu keinem Wachstum, oder es regenerierten nur sehr wenige einzelne Sprosse aus den Explantaten.

Cytokinine beeinflussen das Wachstum in Abhängigkeit von der Konzentration im Nährmedium auf verschiedene Weise. In manchen Fällen steigt die durchschnittliche Sprosszahl mit steigender Cytokininkonzentration (Janarthana und Sumathi, 2011; Rajeswari und Paliwal, 2008), in anderen bewirkt eine größere Menge des Wuchsstoffes eine Hemmung des Wachstums (Gonbad et al., 2014), oder aber es führt eine mittlere Konzentration zum gewünschten Ziel (Roy et al., 2001). Die einzelnen Klone von *L. tibetica* reagierten sehr unterschiedlich auf die eingesetzten Wuchsstoffkonzentrationen. Bei Klon 11a sank die Sprosszahl mit abnehmender Kinetinkonzentration, während es bei Klon 11b nur mit 1  $\mu\text{M}$  Kinetin zu Vermehrung kam. Klon 9c konnte nur mit 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin neue Sprosse hervorbringen (Diagramm 2, S. 12). Mit 2iP entstanden bei Klon 9c umso mehr Sprosse, je niedriger die Konzentration des Cytokinins war. Klon 11b erreichte mit 1  $\mu\text{M}$  2iP die größte Wachstumsrate, die mit 1  $\mu\text{M}$  und 0,5  $\mu\text{M}$  erreichten Sprosszahlen dieses Klons unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Auch bei Klon 11a brachte die mittlere Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  2iP die meisten Sprosse hervor (Diagramm 2, S.12).

Cytokinine fördern die Sprossbildung, hemmen aber deren Elongation (Gonbad et al., 2014). Dies erklärt möglicherweise, warum sich in unseren Versuchen auf den wuchsstofffreien Medien keine Cluster ausgebildet haben, die Sprosse dafür aber relativ lang geworden sind, wie es zum Beispiel bei Klon 9c beobachtet wurde. Außerdem kann die elongationshemmende Wirkung der Cytokinine der Grund dafür sein, warum die Sprosslänge mit steigender Kinetinkonzentration bei Klon 11a und mit steigender 2iP-Konzentration bei den Klonen 9c und 11a abnahm. Bei Klon 11b traten jedenfalls in den Kulturen mit den höchsten 2iP-Konzentrationen die kürzesten Sprosse auf. Die Sprosslänge korrelierte nicht immer mit der Anzahl an Nodien pro Spross. Ein gutes Beispiel hierfür stellten die Sprosse auf dem Kontrollmedium ohne Wuchsstoff im Kinetin-Versuch mit Klon 9c dar (Diagramm 4, S. 15): Obwohl die durchschnittliche Sprosslänge 32,8 mm betrug, lag die durchschnittliche Nodienzahl bei nur 4 pro Explantat. Die durchschnittliche

Sprosslänge bei Klon 11a auf Medium mit 0,5 µM Kinetin war mit 31 mm zwar nur knapp niedriger als in der wuchsstofffreien Kontrolle, die durchschnittliche Nodienzahl betrug aber 20. Daraus ließ sich schließen, dass ein Teil der entstandenen Sprosse gestaucht war, ein anderer Teil aber lange Internodien aufwies. Bei Klon 9c auf Medien mit 2iP wiederum bestand eine Korrelation zwischen Sprosslänge und Nodienzahl: in diesen Kulturen wurden umso mehr Nodien gebildet, je länger die Sprosse waren.

Für zukünftige Untersuchungen scheint es wichtig zu eruieren, ob *L. tibetica* bei der Mikrovermehrung zur Bildung gestauchter Sprosse neigt, denn wäre dies der Fall, dann sollte die Vermehrung über Sprossspitzen bevorzugt werden (Hess, 1992). Die Sprossspitzentechnik zählt als beste Methode (Hess, 2008) zur klonalen Pflanzenvermehrung. Man nimmt an, dass sich in der Sprossspitze mehr Achselknospen befinden (Hess, 1992), aus denen mehr neue Sprosse regenerieren können. Zu solch einem Ergebnis kamen auch Sharma et al. (2010): In Nodienkulturen von *Picrorhiza kurroa* kam es zu keinerlei Vermehrung, während in den Sprosskulturen Wachstum verzeichnet werden konnte. Fraga et al. (2004) berichten, dass von 4 eingesetzten Explantattypen (Sprossspitzen, Nodien, Fruchtknoten und Blätter) in den Nodien- und Sprossspitzenkulturen die höchste Sprossvermehrung erzielt werden konnte, und dass bei einem der eingesetzten Kultivare die Sprossspitzenkulturen eine etwas bessere Vermehrungsrate erzielten als die Nodienkulturen. In einem der Experimente der vorliegenden Arbeit wurden Nodien- und Sprosexplantate des Klons 11b auf kinetinhaltigen Medien miteinander verglichen, dabei entstanden die meisten und längsten Sprosse pro Explantat in den Sprosskulturen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Duhoky und Rasheed (2010), als sie für die in vitro-Vermehrung von *Gardenia jasminoides* Spross- und Nodienkulturen auf kinetinhaltigen MS-Medien etablierten: Sie konnten mit den Sprossspitzen die größeren Sprosszahlen erreichen. Die Autoren führten dies auf eine synergistische Wirkung der endogen in den Apikalmeristemen der Sprossspitze gebildeten Auxine und der exogen zugeführten Cytokinine, die die Vermehrung der Apikalmeristeme fördern, zurück (Duhoky und Rasheed, 2010). Was die Hyperhydratisierung betrifft, so trat diese im Versuch zum Einfluss des Explantattypes auf die Vermehrung verstärkt bei den Nodienkulturen auf

(Diagramm 21, S. 33). Bei Fraga et al. (2004) wurden wiederum in den Sprosskulturen mehr hyperhydratisierte Sprosse beobachtet als in den Nodienkulturen. Laut den Autoren spielten die eingesetzten Cytokininkonzentrationen eine Rolle bei der Hyperhydratisierung.

Für die Bewurzelung setzten Ayenew et al. (2014) in ihren Versuchen zur Mikrovermehrung von *Zingiber officinale* Sprossspitzen ein. Auch Duhoky und Racheed (2010) waren bei der Bewurzelung von *Gardenia jasminoides* mit Sprossspitzen erfolgreich. Beide Arbeitsgruppen konnten zufriedenstellende Wurzelzahlen und eine erfolgreiche Akklimatisierung erreichen. Bei *L. tibetica* Klon 11a bildeten sich hingegen in Nodienkulturen mehr Wurzeln als in Sprosskulturen (Diagramm 23, S. 34), allerdings unterschieden sich die mit den beiden Explantattypen erreichten Wurzelzahlen nicht signifikant voneinander. Auch bei der Länge der Wurzeln wurden weder bezüglich der Explantate noch bezüglich der Ionenstärke des Nährmediums Signifikanz festgestellt (Diagramm 24, S. 35). Den Ergebnissen dieses Versuchs zufolge scheint für die Bewurzelung von *L. tibetica* daher weder der Explantattyp noch die Konzentration der Makroelemente eine Rolle zu spielen.

Der Einfluss der Ionenstärke der Nährmedien auf die Vermehrung von Sprossen und Wurzeln wird in der Literatur jedenfalls vielfach diskutiert (Anthony, 1992; Jirakiattikul et al., 2013; Roy et al., 2001; Janarthana und Sumathi, 2011). Für *L. tibetica* wurde mit Klon 11a ein Versuch angelegt, in dem der Einfluss der Ionenstärke auf die Vermehrung im Mittelpunkt stand (Kap. 3.2, S. 22). Es wurde das MS-Nährmedium eingesetzt, wobei die Makroelementkonzentration variiert wurde, sie wurde voll-, halb-, und viertelkonzentriert eingesetzt. Weiters enthielten die Nährmedien 1  $\mu\text{M}$  Kinetin, und es wurden Nodienkulturen etabliert. Es stellte sich heraus, dass bei fast allen erhobenen Parametern, nämlich dem Custeranteil, der Sprosszahl pro Explantat, der durchschnittlichen Sprosslänge, der Nodienzahl pro Explantat sowie der Wurzelzahl pro Explantat mit dem halbkonzentrierten Medium (MS 4) die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Es lag in allen Fällen Signifikanz zu den mit voller Ionenkonzentration erhaltenen Ergebnissen vor. Außerdem war auf Medium MS 4 (halbkonzentriertes MS Medium) die geringste

Kallusbildung zu beobachten, allerdings traten die meisten hyperhydratisierten Sprosse auf. Die längsten Wurzeln bildeten sich auf dem Medium mit viertelkonzentrierten Makroelementen. Dass eine niedrige Konzentration an Makroelementen bei vielen Spezies eine bessere Bewurzelungsrate mit sich bringt, wurde bereits in mehreren Publikationen erwähnt. So wurde die Sprossvermehrung von *Humulus lupulus* (Roy et al., 2001) zwar auf Basismedium mit voller Ionenstärke durchgeführt, für die Bewurzelung wurden die Sprosse aber auf Medium mit halber Ionenstärke umgesetzt. Auch Senapati et al. (2013) führten bei *Rauwolfia serpentina* den Bewurzelungsschritt auf Medium mit halber Ionenstärke durch, während die Sprossvermehrung bei voller Konzentration an Makroelementen erfolgte. Jirakiattikul et al. (2013) beschreiben, dass sie die meisten Wurzeln mit einer um ein Viertel reduzierten Konzentration an Salzen im Medium gewannen, die längsten Wurzeln aber bei halber Konzentration an Makroelementen gebildet wurden.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die vorliegende und die parallel von Nguyen (Diplomarbeit in Vorbereitung) durchgeführten Arbeiten die ersten Untersuchungen zur Mikrovermehrung von *L. tibetica* sind, daher sind noch einige Fragen offen, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

Allen voran bedarf es einer genaueren Analyse, warum das Wachstum im ersten Versuch (Kap. 3.1, S. 8) in manchen Gläsern vollkommen ausblieb. Bei den wuchsstofffreien Kontrollen war dies nicht weiter überraschend, denn wie in der Literatur erwähnt bleibt ein Wachstum ohne Cytokinine meist aus (Mahendran und Narmatha, 2014). Allerdings war bei diesem Experiment auch auf einem Teil der wuchsstoffhaltigen Nährmedien keine oder nur sehr geringe Vermehrung zu verzeichnen, vor allem bei Verwendung von Kinetin. Gleiches galt für Benzylaminopurin (BAP), insbesondere bei höheren Konzentrationen (Nguyen, Diplomarbeit). Kinetin und BAP sind synthetisch hergestellte, stark wirksame Cytokinine, während 2iP und Zeatin natürlich vorkommende Phytohormone darstellen. Möglicherweise sind Kinetin und BAP zu stark für die Mikrovermehrung von *L. tibetica*. Eine Hemmung der Ausbildung von adventiven Meristemen durch starke Cytokinine kann letztlich zu einem Ausbleiben des Sprosswachstums führen (Gonbad et al., 2014). Manche Explantate verhielten sich in unseren Versuchen

ähnlich, wie es Cardoso und Habermann (2014) bei *Anthurium andreanum* beschrieben: Es bildete sich Kallus, ohne dass sich Sprosse regenerierten, und es kam zu einer Verfärbung der Explantate, wie wir ebenfalls beobachten konnten (Abbildung 13 b) und c), S. 19). Es bleibt allerdings fraglich, warum gerade mit Kinetin bei 2 Klonen kein Wachstum erreicht werden konnte, denn die Etablierung der Klonlinien war mit Kinetin erfolgt, und die routinemäßige Weitervermehrung wurde ebenfalls auf Medium mit 1 µM Kinetin durchgeführt. Auch Cardoso und Habermann (2014) beschrieben bei einem ihrer 4 Versuchsklone ein ähnliches Wachstumsverhalten. Die Autoren vermuteten, dass das Alter der eingesetzten Ausgangspflanzen eine Rolle spielte, da die von juvenilen Pflanzen entnommenen Explantate eine höhere Regenerierungsrate zeigten als die von ausgewachsenen älteren Pflanzen.

Möglicherweise spielte bei *L. tibetica* die Anzahl der Subkultivierungen vor dem Zeitpunkt des Versuchs eine Rolle. Gonbad et al. (2014) wissen zu berichten, dass ihre mit TDZ erfolgreich kultivierten Teeklone in nachfolgenden Subkultivierungen keine Vermehrung zeigten und die Explantate ebenfalls entweder Kallus bildeten oder nekrotisch wurden. Somit eignete sich Kinetin möglicherweise nur für die Etablierung und die ersten Subkulturen von *L. tibetica*.

Auch bei Mousa und Bakhawain (2014) konnte weder mit Kinetin noch mit BAP ein Wachstum in Nodienkulturen erreicht werden. Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen auch Ayenew et al. (2014) in ihrer Arbeit mit *Zingiber officinale*, in welcher sie BAP und Kinetin einsetzten. Sie stellten fest, dass mit Kinetin zwar grundsätzlich Wachstum einsetzte, die erhaltenen Sprosse im Vergleich zu den mit BAP gewonnenen aber sehr blass und dünn waren. Sie führten dies darauf zurück, dass die verwendeten Kinetinkonzentrationen die Sauerstoffaufnahme aus den Zellen verhinderten.

BAP wurde kurz nach Kinetin entdeckt (Amasino, 2005), es erwies sich bei der Mikrovermehrung verschiedener Pflanzen als dem Kinetin überlegen (Jirakiattikul et al., 2013). Dies konnte auch von Ahmad et al. (2013) bestätigt werden, die von allen getesteten Cytokinin (2iP, Kinetin und BAP) mit BAP die höchste Vermehrungsrate bei *Vitex trifolia* erreichen konnten, sowohl mit BAP alleine als auch in Kombination mit dem Auxin Naphthyllessigsäure (NAA). Auch für *L. tibetica*

kommen Kombinationen von Wuchsstoffen in Frage, in der pflanzlichen Gewebekultur werden oft Kombinationen von einem Cytokinin mit einem Auxin oder Kombinationen von zwei Cytokinin erfolgreich eingesetzt. Ahmad et. al. (2013) führten neben den Versuchsreihen, in denen sie nur Cytokinine in den Nährmedien einsetzten, auch weitere Untersuchungen durch, bei denen die Cytokinine mit einem der Auxine IAA, NAA oder IBA kombiniert wurden. Es konnte dabei festgestellt werden, dass mit allen Wuchsstoff-Kombinationen mehr Sprosse gewonnen werden konnten als mit den Cytokinin alleine. Analog dazu erreichten auch Mahendran und Bai (2013) mit der Kombination aus BAP und NAA eine gute Sprossvermehrung. Mit einem Nährmedium, das Kinetin und BAP enthielt, konnten sie die Vermehrungsrate sogar noch weiter verbessern.

Overbeek et al. publizierten bereits 1941, dass der Einsatz von Kokosnussmilch das Wachstum in Kulturen von *Datura stramonium* förderte (Amasino, 2005). Seitdem findet Kokosnussmilch in der pflanzlichen Biotechnologie Verwendung, so z.B. bei der Mikrovermehrung von *Santalum album* (Janarthana und Sumathi, 2011), wo sie zu 15% im Medium enthalten war und die Sprosselongation förderte. Möglicherweise würde eine Zugabe von Kokosnussmilch zu den Nährmedien bei *L. tibetica* eine Verbesserung des Wachstums mit sich bringen.

Mit 0,5  $\mu\text{M}$  ZiP konnten wir die meisten Sprosse gewinnen, allerdings brachte diese Konzentration auch den höchsten Hyperhydratisierungsanteil mit sich. Auch bei den Versuchen zu Ionenstärke (Kap. 3.2., S. 22) und Explantattyp (Kap. 3.3., S. 28) brachten die halbkonzentrierten MS-Medien zwar die meisten Sprosse hervor, aber von allen drei eingesetzten Nährmedien führte das Medium mit halber Ionenstärke auch zum höchsten Anteil an hyperhydratisierten Sprossen. Bei der Hyperhydratisierung handelt es sich um eine irreversible physiologische Störung in vitro-vermehrter Pflanzen, bei der es zu einer Abnahme an Chlorophyll und Proteinen und einer erhöhten Einlagerung von Wasser ins Gewebe kommt (Hazarika, 2006). Dies resultiert in der charakteristischen durchscheinenden, verdickten und brüchigen Gestalt von hyperhydratisierten Sprossen (Kadota und Niimi, 2003).

Ähnlich wie bei der Hyperhydratisierung konnten wir auch bei der Bildung von Kallusgewebe Zusammenhänge zu höheren Wuchsstoffkonzentrationen

beobachten. Kallus wird meistens an verwundeten Stellen, also z.B an den Schnittstellen der inokulierten Explantate, gebildet (Hess, 2008). Es handelt sich dabei um dedifferenziertes Gewebe, aus dem Adventivsprosse regenerieren können. Da in Kallusgewebe aber häufig somoklonale Variation auftritt (Roy et al., 2001), gilt es, die Bildung möglichst hintan zu halten.

Der Einsatz von 0,5  $\mu\text{M}$  der Cytokinine führte in den meisten durchgeführten Versuchsreihen dieser Arbeit zu den höchsten Vermehrungsraten und zur geringsten Kallusbildung, während bei Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  Wuchsstoff zu den Nährmedien der umgekehrte Fall eintrat. Daher wäre es empfehlenswert, in weiterführenden Arbeiten zur in vitro-Vermehrung von *L. tibetica* die Konzentrationen der Wuchsstoffe noch weiter zu senken. So könnten möglicherweise der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen sowie die Kallusbildung minimiert werden.

Ein weiterer Einflussfaktor, der in der Gewebekultur bisher nur wenig erforscht wurde (Pinker, 2002), ist die Temperatur. Nguyen (Diplomarbeit in Vorbereitung) führte einen Versuch durch, bei dem sie 2 Klone bei 25°C und einen Klon bei 20°C für 7 Wochen kultivierte. Sie kam zum Ergebnis, dass die bei verschiedenen Temperaturen erhaltenen Sprosszahlen sich zwar statistisch gesehen nicht signifikant unterschieden, die bei der niedrigeren Temperatur gebildeten Sprosse aber kräftiger und gesünder waren. Song et al. (2014) untersuchten den Einfluss der Temperatur auf die Sprossvermehrung und die spätere Akklimatisierung von *Veratrum californicum*. Dabei handelt es sich um eine Arzneipflanze, die ähnlich wie *L. tibetica* in höheren Berglandschaften beheimatet ist und demnach kühlere Bodentemperaturen bevorzugt. In ihrem Versuch kultivierten Song et al. die Explantate bei 10°C, 16°C und 24°C. Ihren Ergebnissen zufolge eignete sich die mittlere Temperatur am besten für die in vitro-Vermehrung ihrer Versuchspflanze, da die bei dieser Temperatur kultivierten Explantate sowohl zufriedenstellende Regenerierungsraten als auch die höchste Überlebensrate im Glashaus mit sich brachte.

Um eine erfolgreiche Akklimatisierung erreichen zu können, ist die vorherige erfolgreiche Bewurzelung in vitro-vermehrter Sprosse unerlässlich. Daher gilt es in nachfolgenden Diplomarbeiten an *L. tibetica*, der Bewurzelung besondere

Aufmerksamkeit zu schenken. In dieser Arbeit bestand das Nährmedium für erste Bewurzelungsversuche aus vollkonzentriertem MS Medium und dem Auxin IAA in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  oder 5 $\mu\text{M}$ . Als Explantate für diesen Versuch dienten Sprossspitzen. In den Nährmedien für die Bewurzelung sollte die Konzentration der Auxine offensichtlich gesenkt werden, denn mit 5  $\mu\text{M}$  IAA blieb die Ausbildung von Wurzeln vollkommen aus. Außerdem kam es, wie bei Rajeswari und Paliwal (2008) ebenfalls beschrieben, auch hier zur Bildung von Kallus. Rajeswari und Paliwal führten die massive Kallusbildung auf die von ihnen eingesetzten hohen Auxinkonzentrationen zurück. Die Menge des in unseren Bewurzelungsversuchen gebildeten Kallus war zwar nicht sehr groß, es ist aber erstrebenswert, die Kallusbildung weitestgehend zu vermeiden, denn Kallus kann die Bildung von Wurzeln verhindern (Gomes et al., 2010). Möglicherweise kam es aus diesem Grund mit 5  $\mu\text{M}$  IAA zu keiner Wurzelbildung. Die genotypischen Unterschiede zwischen den drei von uns eingesetzten Klonen von *L. tibetica* wurden auch bei dem Bewurzelungsversuch sichtbar. So wurden mit Klon 11a auf wachstoffsstofffreiem Medium durchschnittlich ungefähr zwei Wurzeln gezählt, während die anderen beiden Klone in diesem Medium kaum Wurzeln ausbildeten. Auch im Nährmedium mit 1  $\mu\text{M}$  IAA konnte Klon 11a mehr Wurzeln bilden als die Klone 9c und 11b. Das Ausbleiben des Wurzelwachstums bei Einsatz von 5  $\mu\text{M}$  IAA war allen 3 Klonen gemeinsam. Daraus kann man schließen, dass sich diese IAA-Konzentration nicht für die Bewurzelung von *L. tibetica* eignet. Da die Wurzelzahlen sowohl im Versuch zu der Ionenstärke als auch im Versuch zum Explantattyp auf dem Medium mit halber Konzentration an Makroelementen etwas höher waren, sollten zukünftige Versuche zur Bewurzelung generell bei halber Ionenstärke durchgeführt werden.

Auxine bewirken die Ausbildung von Wurzeln, hemmen aber deren Längenwachstum. Daher wäre eine Kombination des Auxins mit einem Cytokinin zu empfehlen, denn Cytokinine fördern die Zellteilung und somit auch das Längenwachstum der Wurzeln. Auch der gleichzeitige Einsatz von 2 Auxinen kann zielführend sein, so berichten Rawat et al. (2013) von einem synergistischen Effekt der Auxine IAA und IBA, und mit 0,1  $\mu\text{M}$  IAA und 0,5  $\mu\text{M}$  NAA konnten sie bei *Aconitum violaceum* eine Bewurzelungsrate von 96,4% erzielen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für die Sprossvermehrung von *L. tibetica* das Nährmedium nach Murashige und Skoog, bei dem die Konzentration der Makroelemente halbiert wird, am besten geeignet ist. Mit niedrigen Cytokininkonzentrationen kann das Auftreten von Hyperhydratisierung eingedämmt werden, hierzu sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig.

Um eine erfolgreiche Bewurzelung der Sprosse zu erreichen, sollte eine niedrige Auxinkonzentration im Nährmedium vorhanden sein. In fortführenden Arbeiten wird schließlich auch die genotypische Variabilität bei *Lancea tibetica* zu berücksichtigen sein.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Mikrovermehrung von *L. tibetica*, einer bestandsgefährdeten Pflanze, die in der Traditionellen Tibetischen Medizin eingesetzt wird. Es wurden die Einflüsse der Cytokinine Kinetin und 2iP, des Auxins IAA, der Ionenstärke der Nährmedien, des Explantattyps und des Genotypen auf Sprossbildung, Nodienzahl, die Anzahl und Länge an Wurzeln, den Prozentsatz an Hyperhydratisierung und die Bildung von Kallus untersucht. Es stellte sich heraus, dass große genotypische Unterschiede zwischen den drei eingesetzten Klonen vorlagen. Die besten Ergebnisse bezüglich der Sprossvermehrung konnten durch den Einsatz von 0,5  $\mu\text{M}$  2iP in vollem MS-Medium mit Klon 9c erreicht werden, diese Kombination ergab auch die längsten Sprosse und meisten Nodien. Eine gute Wachstumsrate konnte mit 0,5  $\mu\text{M}$  Kinetin und dem Klon 11a erreicht werden, mit diesem Wuchsstoff war jedoch bei den Klonen 9c und 11b meist keine Sprossvermehrung zu erzielen. Generell führten niedrige Konzentrationen der Cytokinine zu einer besseren Sprossvermehrung, höhere Konzentrationen resultierten in höheren Prozentsätzen an Hyperhydratisierung und stärkerer Kallusbildung.

Bezüglich der Ionenstärke konnte gezeigt werden, dass MS-Medium mit halbiertem Konzentration an Makroelementen zu hohen Vermehrungsraten und guter Wurzelbildung führte. Die größte Wurzellänge wurde auf Nährmedien erreicht, deren Ionenstärke auf ein Viertel reduziert wurde. Die durchschnittliche Kallusgröße nahm mit steigender Ionenstärke zu.

Der Einsatz von Spross- bzw. Sprossspitzenexplantaten erwies sich bezüglich der Anzahl an gebildeten Sprossen, ihrer Länge und der Nodienzahl als der Verwendung von Nodienexplantaten überlegen. Mehr und längere Wurzeln wurden jedoch an Nodienexplantaten gebildet. Höhere Prozentsätze an Hyperhydratisierung traten in den Nodienkulturen auf, während größere Kalli in den Kulturen auftraten, in denen Sprosse eingesetzt wurden.

In weiterführenden Untersuchungen sollten Medien mit halber Ionenstärke eingesetzt werden, da diese sowohl für die Sprossvermehrung als auch für die Wurzelbildung effektiver waren. Nach Ausarbeitung der Bedingungen für

Bewurzelung und Akklimatisierung würde ein effizientes Protokoll für die in vitro-Vermehrung von *Lancea tibetica* zur Verfügung stehen.

## Summary

The present study deals with the micropropagation of *L. tibetica*, a threatened plant which is used in Traditional Tibetan medicine. The influence of the cytokinins kinetin and 2iP, the auxin IAA, the salt strength of the media, the type of explant, and the genotype was examined by evaluating the produced number of clusters and shoots, length of shoots, number of nodes, number and length of roots, percentage of hyperhydric shoots and the formation of callus. It turned out that there are big genotypic differences between the 3 clones used in our experiments. The best results relating to shoot multiplication were obtained with 0,5  $\mu$ M 2iP in full strength MS medium for clone 9c, this combination also gave rise to the longest shoots and most nodes. A good shoot growth was achieved with 0,5  $\mu$ M kinetin for clone 11a. Kinetin couldn't induce shoot proliferation in some cultures of clone 9c and 11b. Lower cytokinin concentrations resulted in a higher shoot multiplication rate and higher concentrations led to a higher percentage of hyperhydric shoots and the formation of larger calli.

As for the salt strength, it could be shown that half strength MS medium is superior to full strength media, as it led to significantly higher rates of shoot multiplication and root formation. The highest root length was achieved on media with quarter strength of macronutrients. Furthermore less callus was formed than on full strength MS medium.

Using shoot or shoot tip explants was advantageous regarding the number of formed shoots, their length and the number of nodes, whereas more and longer roots were achieved by using nodes as explants. A higher percentage of hyperhydricity was observed in node cultures whereas more callus was formed in shoot cultures.

In future experiments it is advisable to use half strength MS media as it was more effective for both shoot multiplication and root formation. After finding proper conditions for rooting and acclimatization an efficient protocol for the in vitro propagation of *Lancea tibetica* will be available.

## 6. Literaturverzeichnis

Ahmad N., Javed B. S., Khan M.I., Anis M. (2013), Rapid plant regeneration and analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Vitex trifolia*: an important medicinal plant, *Acta Physiol. Plant.* **35**: 2493-2500

Amasino R. (2005), 1955: Kinetin Arrives. The 50th Anniversary of a New Plant Hormone, *Plant Physiol.* **138**: 1177-1184

Anthony, J. L. (1992), In vitro propagation of *Drosera spp.*, *HortScience* **27**: 850-850

Ayene W., Tefera W., Kassahun B. (2014), In vitro propagation of Ethiopian ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultivars: Evaluation of explant types and hormone combinations, *Afr. J. Biotechnol.* **11**: 3911-3918

Cardoso J. C., Habermann G. (2014), Adventitious shoot induction from leaf segments in *Anthurium andreaeanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator, *Hort. Environ. Biotechnol.* **55**: 56-62

Duhoky M. M. S., Rasheed K. A. (2010), Effect of different concentrations of Kinetin and NAA on micropropagation of *Gardenia jasminoides*, *J. Zankoy Sulaimani* **13**: 103-120

Faisal M., Siddique I., Anis M. (2006), In vitro rapid regeneration of plantlets from nodal explants of *Mucuna pruriens*-a valuable medicinal plant, *Ann. Appl., Biol.* **148**: 1-6

Fraga M., Alonso M., Ellul Ph., Borja M. (2004), Micropropagation of *Dianthus gratianopolitanus*, *HortScience* **39**: 1083-1087

Gomes F., Simões M., Lopes M. L., Canhoto J. M. (2010), Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree), *New Biotechnol.* **27**: 882-892

Gonbad R. A., Sinniah U. R., Abdul Aziz M., Mohamad R. (2014), Influence of Cytokinins in Combination with GA<sub>3</sub> on Shoot Multiplication and Elongation of Tea Clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), Sci World J. **2014**: 1-9

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

Hesar A. A., Kaviani B., Tarang A., Zanjani S. B. (2011), Effect of different concentrations of kinetin on regeneration of ten weeks (*Matthiola incana*), Plant OMICS **4**: 236-238

Hess D. (1992), Biotechnologie der Pflanzen: Eine Einführung, Ulmer, Stuttgart

Hess D. (2008), Pflanzenphysiologie: Grundlagen der Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Ulmer, Stuttgart

Janarthana B., Sumathi E. (2011), High Frequency Shoot Regeneration from Internodal Explants of *Santalum album* L., Int. J. Bot. **7**: 249-254

Jirakiatikul Y., Rithichai P., Itharat A. (2013), Effects of medium salt strength and plant growth regulators on shoot multiplication and root induction of *Smilax corbularia*, PharmacologyOnline **3**: 1-7

Kadota M., Niimi Y. (2003), Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots, Plant Cell Tissue Organ Cult. **72**: 261-265

Kletter C., Glasl S., Thalhammer T., Narantuya S. (2008), Traditional Mongolian Medicine - A Potential for Drug Discovery, Sci. Pharm. **76**: 49-63

Kletter C., Kriechbaum M. (2001), Tibetan Medicinal Plants, CRC Press, medpharm scientific publishers, Stuttgart, London, New York, Washington D.C.

Li J., Zheng Y., Zhou H., Su B., Zheng R. (1997) Differentiation of Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line MGc80-3 Induced by Verbascoside, *Planta Med.* **63**: 499-502

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

Mahendran G., Narmatha B. V. (2014), Micropropagation, antioxidant properties and phytochemical assessment of *Swertia corymbosa* (Griseb.) Wight ex. C. B Clarke: a medicinal plant, *Acta Physiol. Plant.* **36**: 589-603

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

Mousa M. A. A., Bakhawain A. A. S. (2014), Genotypic and Growth Regulator Combination Effects on in vitro Nodal Segements of Jojoba (*Simmondsia chinensis*), *Life Sci. J.* **11**: 37-42

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

Nguyen N. C. (2015), Diplomarbeit, Universität Wien, in Vorbereitung

Pinker I. (2002), Einfluss der Temperatur auf die Vermehrung und Sprossentwicklung in vitro von *Prunus glandulosa* und *Tilia cordata*, *Gartenbauwiss.* **67**: 182-189

Rajeswari V., Paliwal K. (2008), In vitro plant regeneration of red sanders (*Pterocarpus santalinus L.f.*) from cotyledonary nodes, *Ind. J. Biotechnol.* **7**: 541-546

Rawat J. M., Rawat B., Agnihotri R. K., Chandra A., Nautiyal S. (2013), In vitro propagation, genetic and secondary metabolite analysis of *Aconitum violaceum* Jacq.: a threatened medicinal herb, *Acta Physiol. Plant.* **35**: 2589-2599

Reveal J. L. (2011), Summary of Recent Systems of angiosperm classification, *Kew Bulletin* **66**: 5-48

Roy A. T., Leggett G., Koutoulis A. (2001), Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.), *In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant* **37**: 79-83

Senapati S. K., Lahere N., Tiwaty B. N. (2013), Improved in vitro clonal propagation of *Rauwolfia serpentina* L. Benth- an endangered medicinal plant, *Plant Biosyst.* **148**: 885-888

Serrano Martínez F., Cano- Castillo M. Casas J. L. (2012), In vitro propagation of *Helianthemum marminorense*, *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **21**: 300-304

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 J. Y., Naylor- Adelberg J., White S. A., Mann D. A. (2014), Establishing clones of *Veratrum californicum*, a native medicinal species, for micropropagation, *In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant* **50**: 337-344

Song Z., Wang Y., Qian 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., 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

Witt C. M., Berking N. E. J., Rinpoche N. T., Cuomo M. (2009), Evaluation of Medicinal Plants as Part of Tibetan Medicine Prospective Observational Study in Sikkim and Nepal, *J. Alt. Compl. Med.* **15**: 59-65

## Curriculum Vitae

### **Persönliche Daten:**

Name: Osmen Sahr

Geburtsdatum: 11.6.1987

Geburtsort: Wien

### **Ausbildung:**

September 1993- Juni 1997

Volksschule

Halirschgasse 25, 1170 Wien

September 1997- Juni 2006

Allgemeinbildende Höhere Schule

Billrothstraße 26-30, 1190 Wien

seit Oktober 2006

Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Oktober 2013- März 2014

Durchführung der praktischen Arbeit der  
Diplomarbeit am Department für  
Pharmakognosie, Universität Wien