



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchungen zur Etablierung von
photoautotrophen in vitro-Kulturen der Pappel
(*Populus* sp.)

verfasst von

Patricia Schnur

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

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

Danksagung

Allen voran möchte ich meiner Betreuerin Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp für die Bereitstellung des interessanten Themas, die nette Betreuung und die Begutachtung meiner Diplomarbeit danken.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die hilfreiche Unterstützung und kompetente Betreuung.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Mag. Florian Gössnitzer, technischer Assistent, für seine Hilfsbereitschaft und die praktischen Tipps während des Arbeitens bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Ausbildung immer unterstützten und mir so dieses Studium ermöglicht haben.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinem Freund und meinen Freunden dafür, dass sie mir einen guten Ausgleich zum Uni-Alltag geboten haben und ich so mein Studium immer als schöne Zeit in Erinnerung behalten werde.

Abkürzungen

½ LS	Nährmedium nach Linsmaier und Skoog (1965), halbkonzentriert
MS	Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962)
PPF	photosynthetic photon flux; photosynthetisch aktive Strahlung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung.....	1
2. Material und Methoden.....	6
2.1. Pflanzenmaterial.....	6
2.2. Nährmedium.....	6
2.3. Kulturbedingungen.....	7
2.4. Kulturauswertung.....	9
3. Ergebnisse.....	11
3.1. Auswirkung der Kulturbedingungen auf die Blattzahl.....	13
3.2. Auswirkung der Kulturbedingungen auf die Blattfläche.....	19
3.3. Auswirkung der Kulturbedingungen auf das Frischgewicht.....	24
3.4. Auswirkung der Kulturbedingungen auf die Nodienzahl.....	30
3.5. Auswirkung der Kulturbedingungen auf den Chlorophyllgehalt.....	37
4. Diskussion.....	44
5. Zusammenfassung.....	53
6. Summary.....	55
7. Literaturverzeichnis.....	57
Lebenslauf.....	63

1. Einleitung und Problemstellung

Pappeln, lat. *Populus* sp., sind sommergrüne Bäume und gehören zur Familie der Salicaceae. Die Gattung umfasst etwa 34 Arten, was aber je nach Beschreiber variieren kann. Ihr Vorkommen beschränkt sich vor allem auf die nördliche Hemisphäre (Lubrano, 1992).

Pappeln sind schnell-wachsende Holzpflanzen, wodurch sie auch für die Industrie zunehmend an Bedeutung erlangen. Aus einem Bericht der International Poplar Commission 2004 geht hervor, dass sich Pappel-Plantagen auf etwa 7 Millionen Hektar weltweit erstrecken, Tendenz steigend (Verani et al., 2008).

Heute findet man viele Hybride innerhalb der Gattung, da man Eigenschaften wie z.B. schnelles Wachstum mit der Fähigkeit, auf kargen Böden leben zu können, kombinieren will. Verwendet werden Pappeln in der Holz- und Papierindustrie sowie zur Energiegewinnung. Aufgrund ihres schnellen Wachstums werden sie auch als erneuerbare Bioenergieträger der Zukunft angesehen. Da die Nachfrage an Pappeln ständig steigt, werden die Pflanzen neben der herkömmlichen vegetativen Vermehrung heute auch in vitro kultiviert (Lubrano, 1992).

Kürzlich hat man entdeckt, dass auch Pappeln, wie die meisten anderen Pflanzen, von Endophyten besiedelt werden (Germaine et al., 2004). Es konnte bereits mehrfach bestätigt werden, dass diese Mikroorganismen das Wachstum von Pflanzen fördern (Ulrich et al., 2008; Weyens et al., 2012).

Die vorliegende Arbeit entstand aus einer Kooperation mit dem Department für Ökogenomik und Systembiologie der Universität Wien (Leitung: Univ. Prof. Dr. Wolfram Weckwerth). Einer der Untersuchungsschwerpunkte dieses Departments sind Pappeln und deren Endophyten. Für die Versuche mit Endophyten ist es von Bedeutung, dass auch die Morphologie und Physiologie der dazu eingesetzten in vitro-kultivierten Pappeln im Vergleich zur Pflanze in vivo möglichst ähnlich sind. Dies kann durch photoautotrophe in vitro-Kultivierung ermöglicht werden.

Generell sind photoautotrophe in vitro-Kulturen dadurch gekennzeichnet, dass keine Kohlenstoffquelle, also kein Zucker, im Nährmedium vorhanden ist. Weiters

muss eine starke Lichtquelle ($100\text{--}150\ \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ oder höher) vorhanden sein und ein ausreichendes Angebot an CO_2 im Kulturgefäß herrschen, damit es der Pflanze überhaupt möglich ist, Photosynthese zu betreiben (Afreeen, 2005). Unter solchen Kulturbedingungen hängt das Wachstum der Pflanze ausschließlich von der eigenen Photosyntheseleistung und der Aufnahme anorganischer Nährstoffe ab (Zobayed et al., 2004). Dies wird in Abbildung 1 veranschaulicht.

Im Gegensatz zur photoautotrophen Gewebekultur sei an dieser Stelle kurz die konventionelle Methode der Mikrovermehrung erwähnt. Hier erfolgt die Etablierung der Kulturen auf zuckerhaltigen Medien (meist $20\text{--}30\ \text{g l}^{-1}$ Saccharose), in relativ kleinen, dicht verschlossenen Gefäßen bei einer Lichtstärke von etwa $50\ \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Zobayed et al., 2000). Wie in Abbildung 1 dargestellt ist, dient die Saccharose im Medium als Kohlenstoffquelle und die Kulturen ernähren sich photomixotroph.

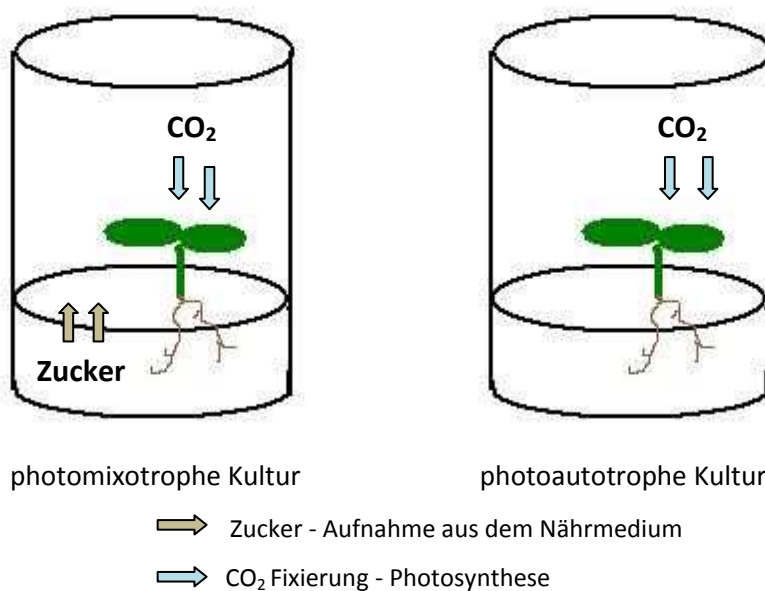


Abbildung 1: Typen von in-vitro Kulturen, klassifiziert nach dem Ernährungsverhalten (modifiziert nach Kozai und Kubota, 2005)

Die Etablierung von photoautotrophen in vitro-Kulturen erfordert ein gewisses Know-how sowie eine geeignete technische Ausstattung. Das Wissen um die Physiologie von Pflanzen und deren Anforderungen an ihre Umwelt sind unabdingbar. Eine ausreichende Belüftung der Kulturgefäße spielt dabei eine wichtige Rolle. Selbst bei verschlossenen Gefäßen erfolgt ein ständiger Gasaustausch zwischen der Umgebungsluft und dem Innenraum des Kulturgefäßes z.B. durch kleinste Lücken zwischen Verschluss und Gefäß oder durch gasdurchlässige Verschlüsse. Dieser permanente Gasaustausch ist wichtig, damit ausreichend CO₂ ins Innere des Kulturgefäßes gelangen kann und es so der Pflanze ermöglicht wird, Photosynthese zu betreiben. Es wurde bereits mehrfach in der Literatur angeführt, dass die CO₂ Konzentration im Kulturgefäß während der Dunkelperiode ansteigt, am Beginn der Lichtperiode jedoch sofort wieder abfällt, da es die Pflanze bei der Photosynthese verbraucht (Afreeen et al. 2002; Kozai und Kubota, 2005). Das Ziel ist es nun, durch ausreichende Belüftung der Kulturgefäße, die CO₂ Konzentration zu erhöhen und es dadurch der Pflanze zu ermöglichen, eine entsprechende Photosyntheseleistung zu erbringen.

Die natürliche Belüftung kann man auf verschiedene Arten fördern. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Verschlüssen mit Bohrungen, an denen gasdurchlässige Mikrofilter angebracht sind, um Kontaminationen zu verhindern. Durch diese Löcher kommt es zu vermehrten Gasaustausch (Kubota, 2001). So zeigten Xiao und Kozai (2006) an *Ipomoea batatas*, dass sich die in vitro-Kulturen besser entwickelten, wenn die Belüftung der Kulturgefäße erhöht wurde.

Es gibt jedoch auch noch eine weiter entwickelte Methode, um den Gasaustausch zu fördern: Die sogenannte forcierte Belüftung, bei der aktiv mit CO₂ angereicherte Luft in größere Kulturgefäße gepumpt wird (Heo et al., 1999) bzw. die Luft im Kulturraum mit CO₂ angereichert wird (Hazarika et al., 2003). So zeigten Zobayed et al. (1999) an *Eucalyptus camaldulensis*, dass sich durch die Methode der forcierten Belüftung großer Kulturgefäße Sprosse und Wurzeln besser entwickelten und mehr Pflanzen ex vitro überlebten als bei Kulturen, die unter konventioneller, nicht forcierter Belüftung etabliert wurden. In einem Versuch mit *Zantedeschia elliottiana* erkannten Xiao und Kozai (2004), dass sich durch forcierte Belüftung die Kulturperiode verkürzen ließ und auch mehr Pflanzen ex vitro überlebten.

Die relative Luftfeuchtigkeit in den Kulturgefäßen ist bei der konventionellen Mikrovermehrung bedingt durch unzureichenden Gasaustausch meist sehr hoch. Zusammen mit der Akkumulation von Ethylen im Kulturgefäß, das von den Pflänzchen selbst gebildet wird, wird dies oft mit Anomalien in der Morphologie und Physiologie von in vitro-Kulturen assoziiert. Hier kann man ebenso durch ausreichende Belüftung der Gefäße entgegenwirken (Zobayed et al., 2000; Kozai und Kubota, 2005).

Neben der Belüftung der Kulturgefäße spielt auch eine ausreichende Lichtintensität bei der Etablierung von photoautotrophen in vitro-Kulturen eine bedeutende Rolle. Steht der Pflanze nicht genügend Licht zur Verfügung, ist sie auch nicht in der Lage, eine entsprechende Photosyntheseleistung zu erbringen. Daher muss vor allem bei photoautotrophen in vitro-Kulturen auf ausreichend intensive Lichtquellen geachtet werden. Es wurde bestätigt, dass eine Erhöhung der Lichtintensität in Kombination mit entsprechendem CO₂ Angebot zu besseren Wachstums- und Photosyntheseraten von photoautotroph etablierten Kulturen geführt hat (Kubota, 2001).

Das dritte wesentliche Merkmal von photoautotrophen in vitro-Kulturen ist das Fehlen einer Kohlenstoffquelle, also Zucker, im Nährmedium. In diversen Versuchen über den Effekt von Zucker im Medium wurde festgestellt, dass hohe Zuckerkonzentrationen die Photosyntheserate der in vitro-Kulturen hemmen (Kozai und Kubota, 2005).

Eine erfolgreiche Etablierung von photoautotrophen in-vitro Kulturen kann also nur dann gelingen, wenn ausreichende Lichtintensität und Belüftung der Kulturgefäße und eine entsprechend niedrige Saccharosekonzentration im Nährmedium miteinander kombiniert werden. Im Vergleich zur konventionellen Gewebekultur bringt die photoautotrophe Mikrovermehrung viele Vorteile vor allem im Hinblick auf eine gesunde Pflanzenphysiologie. Das Wachstum der Kulturen wird gefördert und physiologische oder morphologische Anomalien, wie nicht funktionsfähige Stomata oder eine unzureichend ausgebildete epicutikuläre Wachsschicht, sind seltener zu beobachten (Afreen, 2005). In einem Versuch mit *Solanum tuberosum* haben Zobayed et al. (1999) festgestellt, dass unter photoautotrophen Konditionen

die Funktionsfähigkeit der Stomata erhalten blieb. Außerdem kann durch eine normal funktionierende Physiologie bei in vitro-Kulturen die heikle Phase der Akklimatisierung wesentlich besser überstanden werden (Hazarika et al., 2003). Es wurde bereits bestätigt, dass dadurch das Überleben der Kulturen ex vitro massiv gesteigert werden kann (Xiao et al., 2011). Zusätzlich kommt es bei photoautotrophen in vitro-Kulturen weniger häufig zu Kontaminationen durch Mikroorganismen, da keine Saccharose im Nährmedium vorhanden ist (Kubota et al., 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einiger für die Photoautotrophie wichtiger Faktoren auf die Entwicklung von in vitro-Kulturen der Pappel untersucht werden. Dies sollte über stufenweise Herabsetzung der Saccharosekonzentration im Nährmedium, unterschiedlich starke Belüftung der Kulturgefäße und Verwendung verschiedener Lichtintensitäten durchgeführt werden. In der Folge sollten Parameter des Wachstums (Frischgewicht, Blattzahl, Blattfläche und Nodienzahl) sowie der Chlorophyllgehalt in den Blättern evaluiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Zur Durchführung der Versuche wurden Explantate des Pappel-Hybrids 741 verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Hybride aus ([*Populus alba* x (*P. davidiana* + *P. simonii*) x *P. tomentosa*]], die erstmals in China gezüchtet wurde.

Die 3 Monate alten Pappelkulturen wurden von Mag. Anne-Mette Hanak, Department für Ökogenomik und Systembiologie, Universität Wien, übernommen. Das Pflanzenmaterial stammte ursprünglich vom Institut für Forstgenetik in Waldsiedersdorf, Deutschland.

Um die gewünschten Explantate zu erhalten, erfolgte die Zerteilung der Sprosse unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow). Grundsätzlich wurden Segmente der Sprossachse mit einem Nodium verwendet, wobei bei Nodienexplantaten das am Nodium sitzende Blatt entfernt wurde, während bei Stecklingsexplantaten dieses Blatt beibehalten blieb.

2.2. Nährmedien

Das verwendete ½ LS-Medium basierte auf der Formulierung von Linsmaier und Skoog (1965) und kam halbkonzentriert zur Anwendung. Es wurden Medien mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen an Saccharose bereitet.

Zur Herstellung der Medien wurde die entsprechende Menge an Fertigmischung des LS-Medium (Duchefa Biochemie) eingewogen und in destilliertem Wasser am Magnetrührer gelöst, danach $4\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Gelrite® (Carl Roth GmbH + Co. KG) portionsweise zugegeben und so lange gerührt, bis die Suspension homogen war. Danach wurden die entsprechenden Saccharosemengen (0, 10 oder $30\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ in Form von handelsüblichem Haushaltszucker) zugegeben und so lange gerührt, bis die

Saccharose gelöst war. Nach Auffüllen mit destilliertem Wasser auf das gewünschte Volumen wurde der pH-Wert durch Zugabe von KOH und HCl auf pH $5,7 \pm 0,1$ eingestellt.

Anschließend wurde das Medium in die Kulturgefäße abgefüllt, verschlossen und im Autoklaven bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert. Nachdem die Medien ausgekühlt waren, erfolgte die Lagerung in einem dunklen Kühlraum bei 5 ± 1 °C.

2.3. Kulturbedingungen

Als Kulturgefäße dienten für alle Versuche Babynahrungsgläser der Firma Hipp® (Höhe: 12,5 cm; Ø 5,5 cm). Die Gläser wurden mit je 40 ml des entsprechenden Nährmediums befüllt: Ein Drittel der Gläser mit saccharosefreiem Medium, ein Drittel mit Medium, das $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Saccharose enthielt und der Rest mit Medium mit $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Saccharose.

Generell wurden die Gefäße mit Magenta®B-Caps verschlossen. Ein Drittel dieser Verschlüsse wiesen zwei Bohrungen von je 0,8 mm Durchmesser auf, ein Drittel eine solche Bohrung und der Rest der Verschlüsse hatte keine Bohrungen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden auf diese Bohrungen an der Außenseite kleine Membranfilterscheiben angebracht (Porenweite $0,04 \text{ } \mu\text{m}$; Sun Biofilter, Mitomi Industrial Corporation, Japan). Die Bohrungen sollten dazu dienen, die Ventilation der Gefäße zu erhöhen.

Pro Kombination aus Medium und Verschluss wurden 5 Kulturgläser mit je 4 Nodienexplantaten angelegt und nach dem Beimpfen mit Parafilm®M verschlossen. Nun erfolgte die Aufteilung der Kulturen in zwei Gruppen: Ein Teil wurde bei einer Lichtstärke von $100 \text{ } \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert werden, der andere Teil bei $40 \text{ } \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF (photosynthetic photon flux; photosynthetisch aktive Strahlung). Die Aufteilung erfolgte so, dass von allen möglichen Kombinationen aus Zuckergehalt des Mediums, Art des Verschlusses und Lichtstärke jeweils 5 Gläser á 4 Explantate

erhalten wurden. Insgesamt ergaben sich also 18 Versuchsreihen, wobei eine Versuchreihe 20 Explantate umfasste.

Die erste Gruppe der in vitro-Kulturen, die mit der niedrigeren Lichtintensität etabliert werden sollte, wurde in einer Klimakammer mit einer konstanten Temperatur von $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % gehalten. Als Lichtquelle fanden Leuchtstoffröhren (SYLVANIA Gro-Lux®) Verwendung. Dabei waren die Kulturen einer Lichtperiode von 16 Stunden und einer Lichtstärke von $40\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ausgesetzt.

Die zweite Gruppe der Kulturen wurde in einem Heraeus®-Prüfgutschrank kultiviert. Die Lichtintensität betrug hier $100\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bei einer Temperatur von $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 16 Stunden-Tag ausgesetzt.

Die Versuchsdauer für den gesamten Versuch mit Nodienexplantaten betrug 11 Wochen. Ausschlaggebend für die Wahl der Dauer war die Beobachtung des Fortschritts der Entwicklung der Versuchsreihe unter den Bedingungen $40\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/3 % Saccharose/normaler Verschluss, was den Standardbedingungen von konventionellen in vitro-Kulturen entspricht.

Die bisher beschriebenen Kulturbedingungen beziehen sich auf Nodienexplantate. Zusätzlich wurde auch eine sogenannte „photoautotrophe Kontrollgruppe“ angelegt, wofür Stecklingsexplantate (Kapitel 2.1., Seite 6) verwendet wurden. Die Entwicklung dieser Explantate erfolgte ausschließlich auf zuckerfreiem Medium, verschlossen mit Magenta B®-Caps mit 2 Bohrungen und bei einer Lichtstärke von $100\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ im Heraeus®-Schränk. In dieser Versuchsreihe wurden 5 Gläser zu je 4 Explantaten angelegt. Die Versuchsdauer betrug hier 7 Wochen, da aus den Vorversuchen mit Nodienexplantaten bekannt war, dass unter den genannten Kulturbedingungen eine längere Versuchsdauer zum Absterben der Kulturen führt.

2.4. Kulturauswertung

Während der Versuchsdauer von 11 Wochen bei Nodienexplantaten bzw. 7 Wochen bei Stecklingsexplantaten wurden die Kulturen wöchentlich beobachtet und optisch feststellbare Veränderungen wie Blatt- oder Wurzelbildung, Verfärbungen, Kallusbildung oder „Einschrumpfung“ des Nährmediums infolge von Wasserverlust dokumentiert.

Nach Ablauf der Kulturperiode wurde die Auswertung unter sterilen Bedingungen (Laminar flow) durchgeführt, da die Nodien der neu gebildeten Sprosse zur weiteren Vermehrung genutzt werden sollten. Die Auswertung erfolgte pro Explantat und umfasste folgende Faktoren:

- Frischgewicht pro Spross: Hierfür wurde der neu gebildete Spross so nah wie möglich am ursprünglichen Explantat abgetrennt und gewogen.
- Blattzahl pro Spross: Die Anzahl der Blätter wurde notiert.
- Blattfläche: Die Abtrennung der Blätter vom Spross erfolgte so, dass maximal 1 mm Blattstiel am Blatt verblieb. Danach wurden die Blätter in der Reihenfolge, in der sie auch an den Sprossen gewachsen waren, in eine transparente Folie gelegt und in einem Flachbettscanner digitalisiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Blätter an keiner Stelle umgeknickt waren. Im Anschluss erfolgte die Vermessung der Blattflächen mit der Software Image J® (National Institutes of Health, U.S.A.).
- Chlorophyllgehalt der Blätter: Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte mit dem Chlorophyllmeter SPAD-502 (Firma Konica Minolta, Japan). Die Werte wurden in SPAD-Units angegeben, diese Einheit ist von Minolta definiert und wird geräteintern aus der Absorption von Licht bei etwa 650 nm durch das Chlorophyll im Blatt berechnet (Konica Minolta, 2009). Da die Blätter nach Abtrennung vom Spross teilweise schnell welkten, erfolgte die

Chlorophyllmessung unmittelbar nach dem Scannen der Blätter, als diese noch in der Folie waren. Pro Blatt wurde der Chlorophyllgehalt an 5 Stellen bestimmt und hiervon der Mittelwert notiert. Die Werte, die durch Messungen mit der Folie erhalten wurden, waren jedoch um den Faktor 1,273 größer als bei Messung ohne Folie. Daher wurde dieser Faktor später bei der Auswertung berücksichtigt. Die Ermittlung des Faktors erfolgte durch Messung von 30 Blättern aus in vitro-Pappelkulturen mit und ohne Folie.

- Nodienzahl pro Spross: Die Anzahl der neu gebildeten Nodien pro Spross wurde ermittelt und die Nodien anschließend zur weiteren Vermehrung auf $\frac{1}{2}$ LS-Medium mit einer Saccharosekonzentration von $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ beimpft.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Statistica® (StatSoft Inc., USA, Version 6). Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts wurden ermittelt und einfaktorielle sowie mehrfaktorielle Varianzanalysen bei einem Signifikanzniveau von 0,05 durchgeführt. Auch der multiple Spannweitentest nach Duncan wurde zur Analyse der Daten verwendet.

3. Ergebnisse

Während der 11-wöchigen Entwicklungsperiode der Nodienexplantate konnten rein optisch bereits einige Trends beobachtet werden: Sprosse, die sich auf zuckerhaltigen Medien bildeten, schienen nach derselben Zeitspanne länger zu sein als jene, die auf zuckerfreiem Medium wuchsen.

Kallusbildung wurde generell selten beobachtet. Sie trat jedoch ausschließlich bei jenen Kulturen auf, die auf saccharosehaltigen Medien etabliert wurden.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Intensität der Blattfarbe geringer ausfiel, wenn die Entwicklung auf zuckerfreiem Medium bzw. mit normalem Verschluss erfolgte.

Teilweise traten innerhalb der ersten Wochen auch Infektionen auf bzw. kamen Endophyten zum Vorschein. War dieser Befall mit Mikroorganismen schwerwiegend, so wurden die betroffenen Gläser ausgesondert und zur Vervollständigung der Versuchsreihen neue Kulturen beimpft. Kam es nur zu minimalen Kontaminationen, so blieben die Kulturen Teil des Versuchs, da bekannt war, dass leichte Infektionen zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums führen (Hanak, persönliche Mitteilung).

Nach etwa 3-4 Wochen kam es generell zu Medienschrumpfung, die vor allem bei Kulturgefäßen, die mit Magenta® B-Caps mit 2 Bohrungen verschlossen waren, verstärkt auftrat (siehe Abbildung 2, S. 12). Die Schrumpfung der Medien war außerdem bei jenen Kulturen verstärkt zu beobachten, die sich bei $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtstärke im Heraeus®-Schränk entwickelten. Am geringsten ausgeprägt war die Medienschrumpfung bei Gefäßen mit normalem Verschluss.

Die Entwicklung der Stecklingsexplantate erfolgte, verglichen mit der von Nodienexplantaten unter denselben Kulturbedingungen, wesentlich schneller, wie aus Abbildung 3 (S. 12) ersichtlich ist. Daher wurde die Versuchsdauer des Experiments mit Stecklingsexplantaten auf 7 Wochen reduziert.

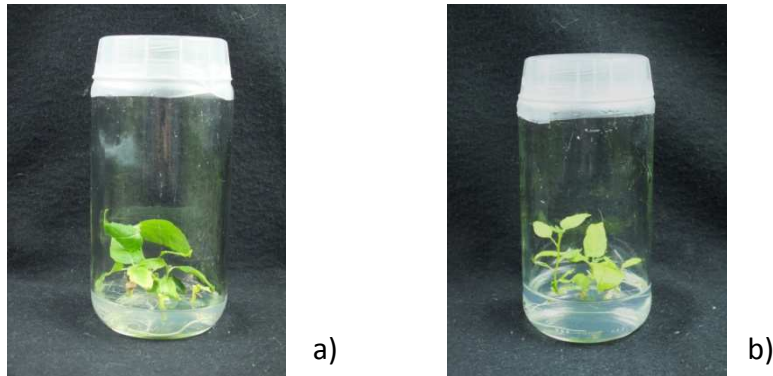


Abbildung 2: Einschrumpfung des Nährmediums infolge von Wasserverlust bei Pappelkulturen nach 5 Wochen; Kulturbedingungen: $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Lichtstärke, 1 % Saccharosegehalt; a) Verschluss mit 2 Bohrungen, b) normaler Verschluss ohne Bohrung

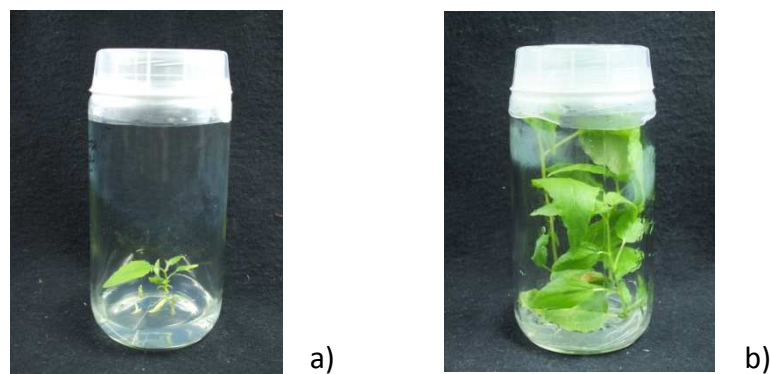


Abbildung 3: Entwicklung von Pappelkulturen nach 5 Wochen; Kulturbedingungen: 0 % Saccharose im Medium, Verschluss mit 2 Bohrungen, $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Lichtstärke; a) Nodienexplantat, b) Stecklingsexplantat

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden die Auswirkungen der Faktoren Lichtstärke, Art des Verschlusses der Kulturgefäße und Zuckergehalt im Medium auf die Blattzahl, die Blattfläche, das Frischgewicht der Sprosse, die Nodienzahl pro Spross und den Chlorophyllgehalt der Blätter beschrieben. In erster Linie wurden dabei Nodienexplantate untersucht, wir führten jedoch auch eine Versuchsreihe mit Stecklingsexplantaten durch. Auf signifikante Unterschiede zwischen Nodien- und Stecklingsexplantaten wird in den entsprechenden Unterkapiteln eingegangen.

3.1. Auswirkung der Kulturbedingungen auf die Blattzahl

Im Folgenden werden die Auswirkungen der Faktoren Lichtstärke (PPF = 40 oder 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Art des Verschlusses der Kulturgefäße (normaler Verschluss ohne Bohrung, Verschluss mit 2 oder 1 Bohrung) und Zuckergehalt im Medium (0, 1 oder 3 % Saccharose) auf die Blattzahl erst unabhängig voneinander und dann in Kombinationen erörtert.

Betrachtet man den Einfluss der Lichtstärke unabhängig von den anderen Faktoren, so war die Blattzahl bei Kulturen, die bei einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ heranwuchsen, mit 6,5 Blättern pro Spross signifikant höher als bei jenen mit einer Lichtintensität von 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (siehe Abbildung 4). Der Einfluss der Lichtintensität auf die Blattbildung wird auch in Abbildung 5 (S. 14) veranschaulicht.

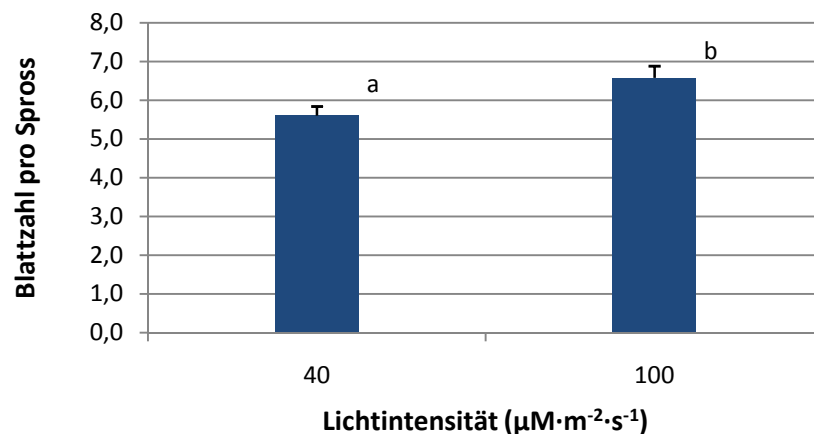


Abbildung 4: Einfluss der Lichtintensität auf die durchschnittliche Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

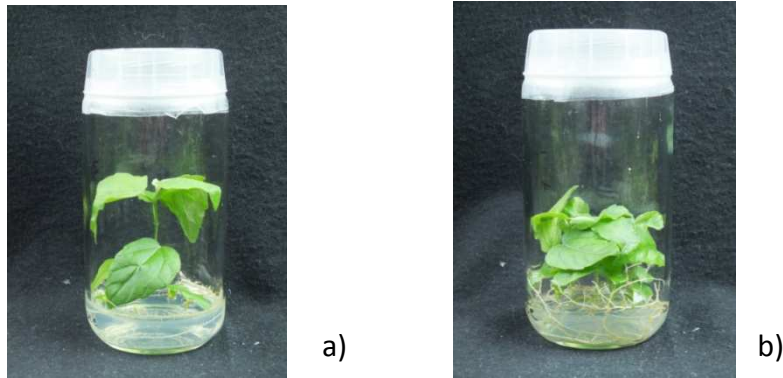


Abbildung 5: Blattanzahl nach 8 Wochen in Abhängigkeit von der Lichtintensität; Kulturbedingungen: 3 % Saccharosegehalt, Verschluss mit 1 Bohrung; a) $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität, b) $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität

Beim Betrachten der Art des Verschlusses der Kulturgefäße als alleinigen Einflussfaktor konnte festgestellt werden, dass bei Kulturgefäßen mit normalem Verschluss die Blattzahl am höchsten und bei Verschlüssen mit 2 Bohrungen am niedrigsten war. Bei Sprossen, die sich in Gefäßen mit 1 Bohrung entwickelten, lag die Blattzahl dazwischen. Der Unterschied zwischen den drei Gruppen war jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 6).

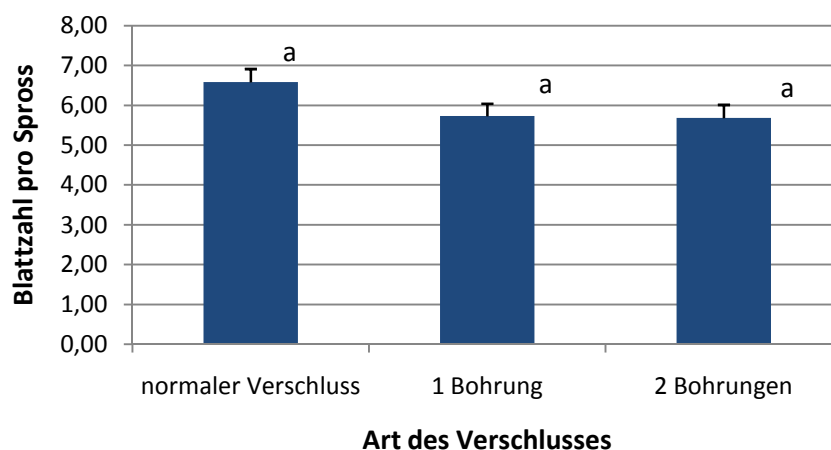


Abbildung 6: Einfluss der Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf die Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Der Saccharosegehalt im Medium wirkte sich auf die Blattzahl wie folgt aus: Sprosse, die auf saccharosefreiem Medium kultiviert wurden, wiesen die meisten Blätter auf, gefolgt von 1 % und 3 % Saccharose. Wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist, gab es signifikante Unterschiede zwischen den Saccharosekonzentrationen 3 % und 0 % und zwischen 3 % und 1 %. Hingegen fiel der Unterschied zwischen 0 % und 1 % Saccharose im Medium gering aus und war nicht signifikant. In diesen Gruppen bildeten sich annähernd gleich viele Blätter. Der Einfluss der Saccharose auf die Anzahl der Blätter pro Spross ist auch in Abbildung 8 dargestellt.

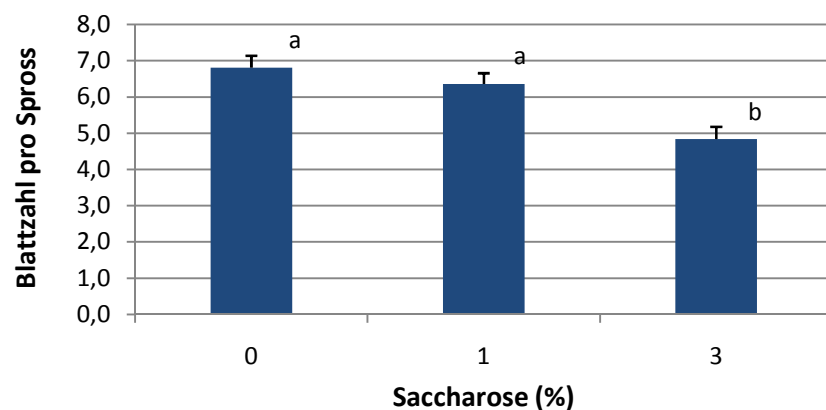


Abbildung 7: Einfluss der Saccharosekonzentration im Medium auf die durchschnittliche Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

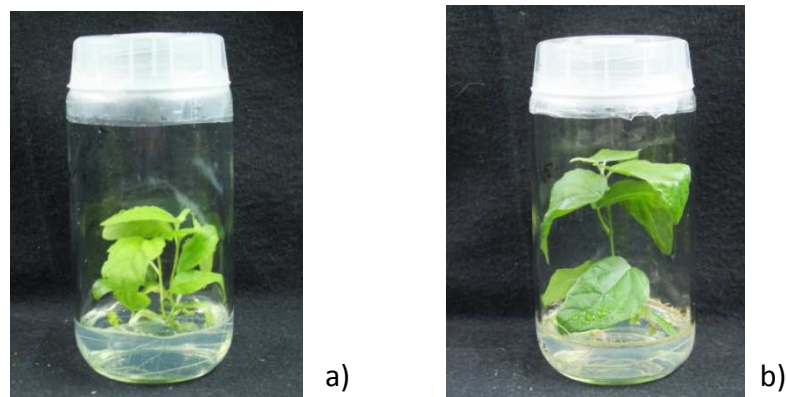


Abbildung 8: Blattanzahl nach 10 Wochen in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration im Medium; Kulturbedingungen: $40 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Lichtintensität, Verschluss mit 1 Bohrung; a) 0 % Saccharose, b) 3 % Saccharose

Nun werden mögliche Kombinationen dieser drei Einflussfaktoren erörtert und dargestellt.

Betrachtet man die Auswirkungen von Lichtintensität und Saccharosekonzentration im Medium, ohne dabei die Art des Verschlusses am Gefäß zu berücksichtigen, zeigt sich, dass Sprosse, die auf Medium mit 3 % Saccharosegehalt und bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ kultiviert wurden, mit Abstand die wenigsten Blätter aufwiesen. Diese Versuchsreihe unterschied sich signifikant von den anderen möglichen Kombinationen aus Lichtintensität und Saccharosekonzentration (siehe Abbildung 9). In der Versuchsreihe mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1% Saccharose wurde die höchste Blattzahl mit 7 Blättern pro Spross erreicht. Es folgten in absteigender Reihenfolge die Versuchsreihen mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/0 % Saccharose bzw. $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /0 % Saccharose, $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 % Saccharose und $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/3 % Saccharose. Diese Versuchsreihen unterschieden sich nur in geringem Maße voneinander, und der Unterschied war hier nicht signifikant (siehe Abbildung 9).

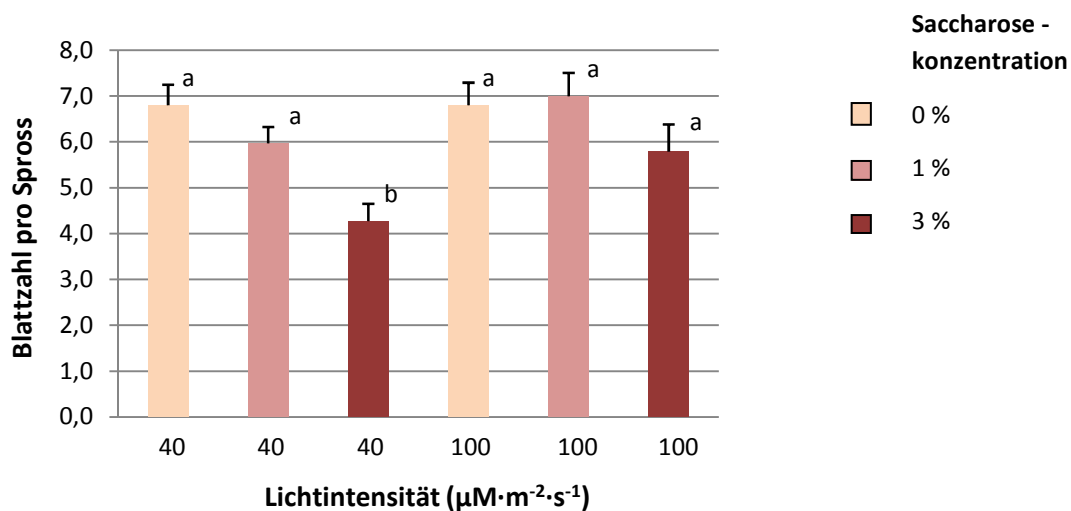


Abbildung 9: Einfluss von Lichtintensität und Saccharosekonzentration im Medium auf die Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Fasst man die Auswirkungen von Lichtintensität und Art des Verschlusses der Gefäße zusammen, ohne die Saccharosekonzentration im Medium zu berücksichtigen, so kann festgestellt werden, dass bei einer Kombination von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und normalem Verschluss die höchste Blattzahl mit 7,6 Blättern pro Spross erreicht wurde. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich ist, gab es einen signifikanten Unterschied zwischen dieser Versuchsreihe und den restlichen Gruppen. Die zweithöchste Blattzahl fand sich in der Versuchsreihe mit Lichtintensität $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/2$ Bohrungen. Danach folgten die Versuchsreihen mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 Bohrung, $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /normaler Verschluss, $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/2$ Bohrungen und $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/1$ Bohrung, wobei hier der Unterschied nicht signifikant war (siehe Abbildung 10).

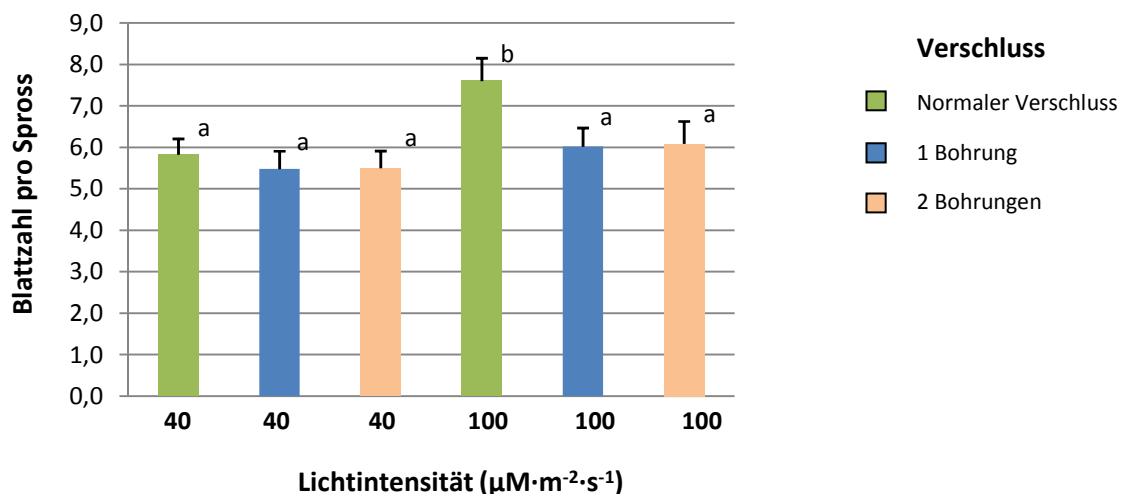


Abbildung 10: Einfluss von Lichtintensität und Verschluss auf die Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Betrachtet man die beiden Faktoren Saccharosekonzentration im Medium und Art des Verschlusses, ohne den Einfluss der Lichtintensität zu berücksichtigen, so zeigt sich, dass die Anzahl der Blätter bei einer Saccharosekonzentration von 0 % im Medium und mit normalem Verschluss am höchsten war, gefolgt von 1 % Saccharosegehalt und normalem Verschluss, 0 % Saccharose mit Verschlüssen

2 Bohrungen und 0 % Saccharose mit 1 Bohrung. Diese Versuchsreihen unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 11).

Die wenigsten Blätter bildeten sich unter den Konditionen 3 % Saccharose und Verschluss mit 2 Bohrungen aus, gefolgt von 3 % Saccharose mit 1 Bohrung. Diese Versuchsreihen unterschieden sich von den oben erwähnten signifikant.

Die Versuchsreihen 1 % Saccharose/1 Bohrung, 1 % Saccharose/2 Bohrungen und 3 % Saccharose/normaler Verschluss lagen im Mittelfeld und unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Diese 3 Versuchsreihen unterschieden sich aber signifikant von der Versuchsreihe mit der geringsten Blattzahl, 3 % Saccharose/2 Bohrungen (siehe Abbildung 11).

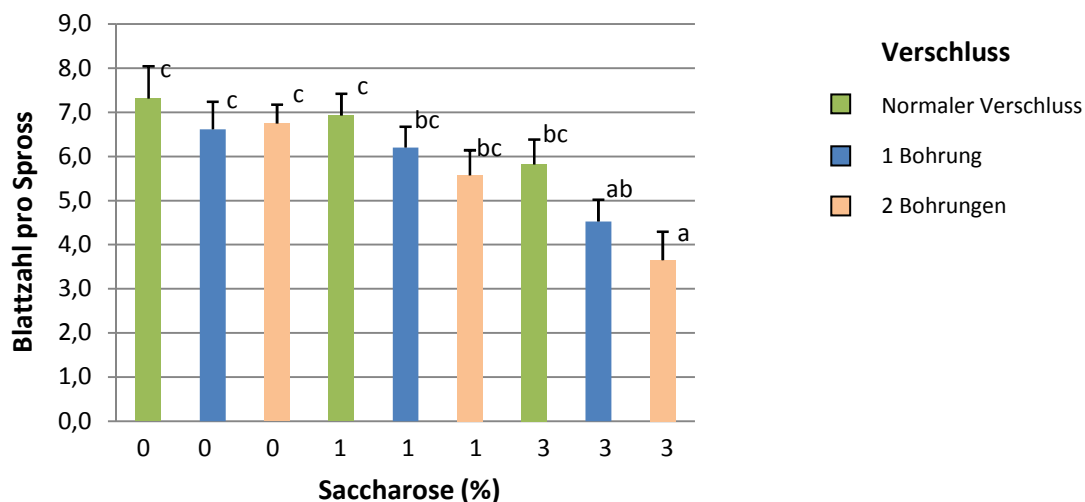


Abbildung 11: Einfluss von Saccharosekonzentration und Verschluss auf die Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Generell hat sich gezeigt, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Blattzahl zwischen den beiden Explantattypen (Nodien- und Stecklingsexplantate) zu sehen waren, so dass auf die Ergebnisse mit Stecklingsexplantaten hier nicht näher eingegangen wird.

3.2. Auswirkung der Kulturbedingungen auf die Blattfläche

Im Folgenden werden die Auswirkungen von unterschiedlicher Lichtintensität (40 oder 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF), Art des Verschlusses (normaler Verschluss ohne Bohrung, Verschluss mit 1 Bohrung oder 2 Bohrungen) und Saccharosekonzentration im Medium (0, 1, 3 % Saccharose) auf die Blattfläche beschrieben. Die drei Faktoren werden erst unabhängig voneinander und anschließend in Kombinationen miteinander erörtert.

Sieht man sich den Einfluss der Lichtintensität unabhängig von den anderen Faktoren an, kann festgestellt werden, dass bei 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF die Blattflächen durchschnittlich größer waren als bei geringerer Lichtstärke. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 12).

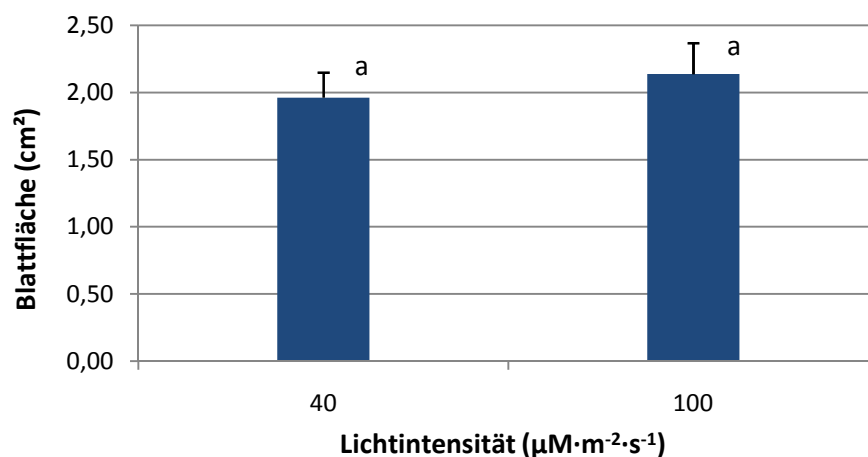


Abbildung 12: Einfluss der Lichtintensität auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Die Art des Verschlusses des Kulturgefäßes schien die Größe der Blattflächen stärker zu beeinflussen: Die Blätter erwiesen sich mit einer durchschnittlichen Fläche von 2,65 cm^2 am größten, wenn die Kulturgefäße Verschlüsse mit 2 Bohrungen hatten, und am geringsten bei den Gefäßen mit normalem Verschluss. Diese beiden Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander. Wurden Verschlüsse mit 1 Bohrung verwendet, lagen die Blattflächen im Mittelfeld und

unterschieden sich nicht signifikant von den beiden anderen Gruppen (siehe Abbildung 13). Der Einfluss der Art des Verschlusses am Kulturgefäß wird auch in Abbildung 14 dargestellt.

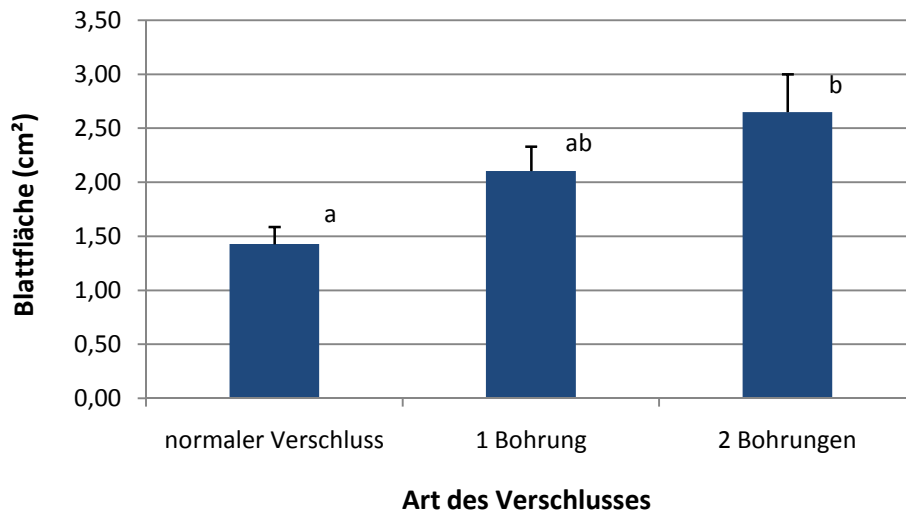


Abbildung 13: Einfluss der Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

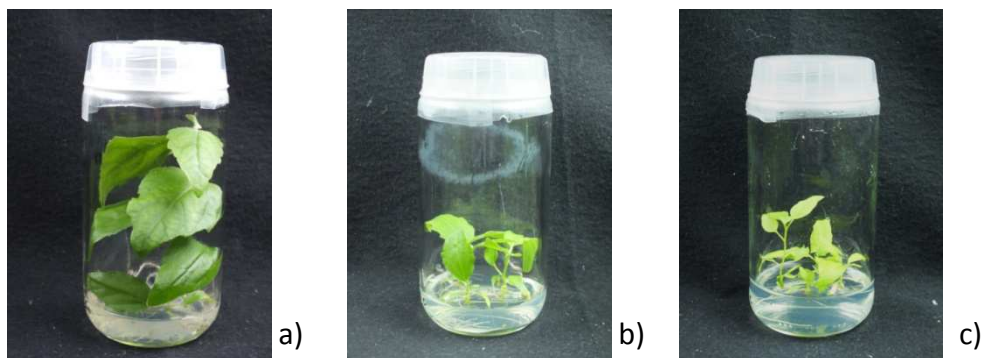


Abbildung 14: Blattfläche nach 6 Wochen in Abhängigkeit von der Art des Verschlusses; Kulturbedingungen: $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Lichtintensität, 1 % Saccharose im Medium; a) Verschluss mit 2 Bohrungen, b) Verschluss mit 1 Bohrung, c) normaler Verschluss ohne Bohrungen

Betrachtet man den alleinigen Einfluss der Saccharosekonzentration im Medium auf die Blattfläche, stellt man fest, dass bei einer Saccharosekonzentration von 3 % die größten Blätter entwickelt wurden, gefolgt von 1 % und 0 % Saccharose im Medium. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich ist, war der Unterschied zwischen den verschiedenen Saccharosekonzentrationen jedoch nicht signifikant.

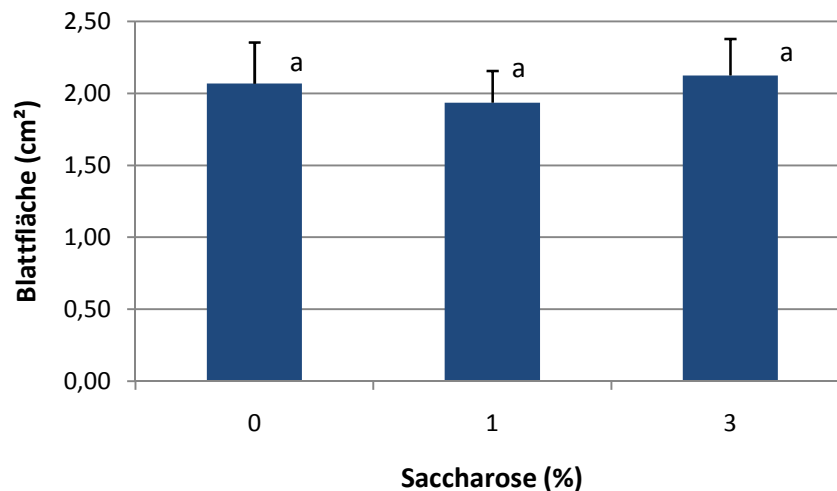


Abbildung 15: Einfluss der Saccharosekonzentration im Medium auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Kombiniert man die Effekte unterschiedlicher Lichtintensität mit unterschiedlicher Saccharosekonzentration, ohne dabei auf die Art des Verschlusses einzugehen, zeigt sich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den sechs hier möglichen Versuchsreihen gab. Die größten Blattflächen wurden unter den Konditionen $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/3 % Saccharosegehalt im Medium erzielt, gefolgt von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/0 % Saccharose und $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/3 % Saccharose. Anschließend reihten sich $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/1 \%$ und $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/1 \%$. Die geringsten Blattflächen fanden sich bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ kombiniert mit 0 % Saccharosegehalt im Medium (siehe Abbildung 16, S. 22).

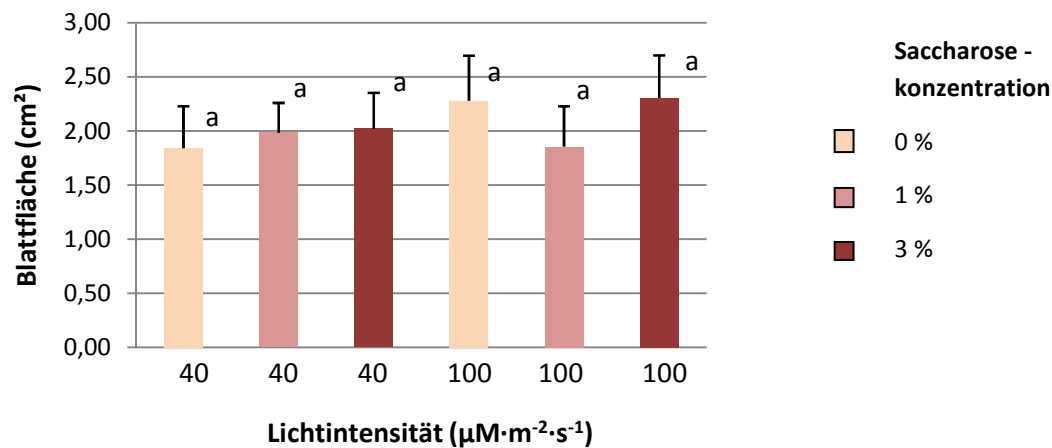


Abbildung 16: Einfluss von Lichtintensität und Saccharosekonzentration auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Betrachtet man die Auswirkung der beiden Faktoren Lichtintensität und Art des Verschlusses unabhängig vom Saccharosegehalt im Medium, kann festgestellt werden, dass die Versuchsreihe mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/2 Bohrungen mit $2,52 \text{ cm}^2$ die größten Blattflächen aufwies, gefolgt von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /2 Bohrungen, wobei der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen allerdings nicht signifikant war (siehe Abbildung 17, S. 23). Die geringsten Blattflächen mit $1,40 \text{ cm}^2$ fanden sich in der Versuchsreihe mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtstärke/normaler Verschluss. Diese Versuchsreihe unterschied sich signifikant von den beiden oben genannten Versuchsreihen, welche die größten Blattflächen aufwiesen. Die Versuchsreihe mit der Kombination $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/normaler Verschluss wies ebenso relativ geringe Blattflächen auf und unterschied sich signifikant von der Versuchsreihe $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/2 Bohrungen, die die größten Blätter aufwies. Im Mittelfeld rangierten die Versuchsreihen mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/1 Bohrung und mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /1 Bohrung. Sie unterschieden sich nicht signifikant von allen anderen Versuchsreihen (siehe Abbildung 17, S. 23).

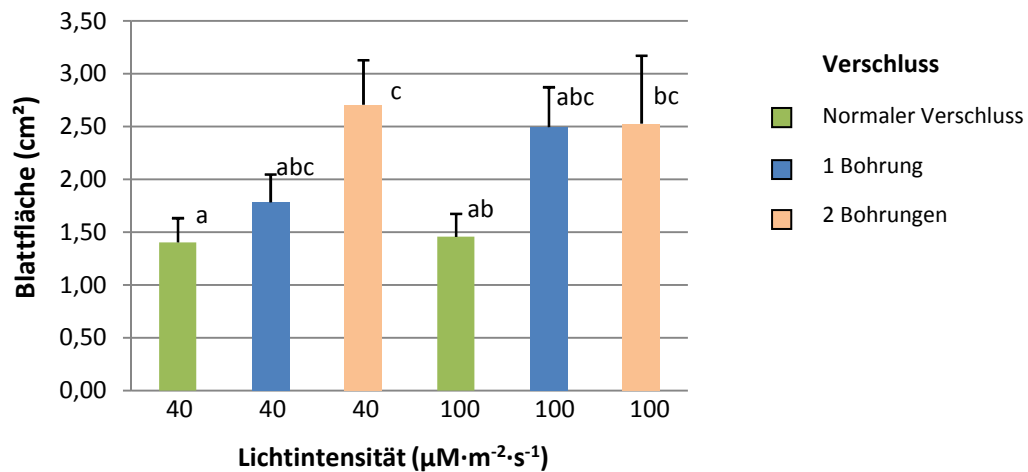


Abbildung 17: Einfluss der Art des Verschlusses am Kulturgefäß und der Lichtintensität auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Fasst man die Auswirkung der 3 verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Medium kombiniert mit den 3 möglichen Arten von Verschlüssen zusammen, so stellt man fest, dass die Blattflächen in der Versuchsreihe 0 % Saccharose/2 Bohrungen mit $2,81 \text{ cm}^2$ am größten waren. Nichtsignifikant folgten die Versuchsreihen 1 % Saccharose/2 Bohrungen, 1 % Saccharose/1 Bohrung, 3 % Saccharose/2 Bohrungen, 3 % Saccharose/normaler Verschluss und 0 % Saccharose/1 Bohrung. Die geringste Blattfläche ($0,87 \text{ cm}^2$) wurde in der Versuchsreihe 0 % Saccharose/normaler Verschluss gemessen, gefolgt von der Versuchsreihe mit 1 % Saccharose/normaler Verschluss. Wie aus Abbildung 18 (S. 24) ersichtlich ist, unterschieden sich diese beiden Versuchsreihen signifikant von den beiden oben beschriebenen Versuchsreihen, welche die größten Blattflächen aufwiesen (0 % Zucker/2 Bohrungen und 1 % Zucker/2 Bohrungen).

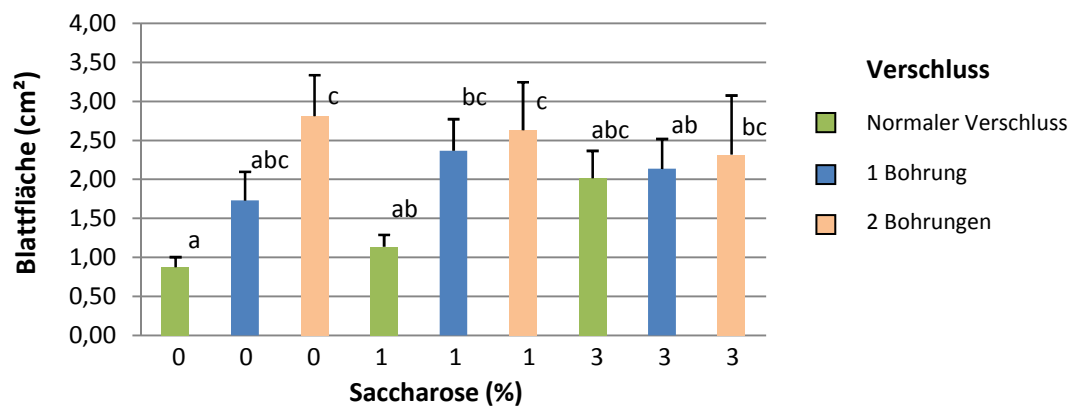


Abbildung 18: Einfluss der Art des Verschlusses am Kulturgefäß und der Saccharosekonzentration auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Es zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied bezüglich der Blattfläche zwischen den beiden Explantattypen feststellbar war. Daher werden die Ergebnisse der Stecklingsexplantate hier nicht näher beschrieben.

3.3. Auswirkung der Kulturbedingungen auf das Frischgewicht

In diesem Kapitel werden die Effekte von unterschiedlicher Lichtintensität (40 oder $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF), unterschiedlicher Saccharosekonzentrationen im Medium (0, 1, 3 %) und Art des Verschlusses am Kulturgefäß (normaler Verschluss ohne Bohrung, Verschluss mit 1 Bohrung, mit 2 Bohrungen) auf das Frischgewicht der Sprosse erörtert. Auch hier wird der Einfluss jeder dieser drei Faktoren erst einzeln und im Anschluss in möglichen Kombinationen beschrieben.

Bei der Betrachtung der Auswirkung des Faktors Lichtstärke unabhängig von den restlichen Einflussfaktoren ist feststellbar, dass das Frischgewicht mit $0,332 \text{ g}$ bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ höher ausfiel als bei der geringeren

Lichtintensität. Wie in Abbildung 19 dargestellt ist, war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

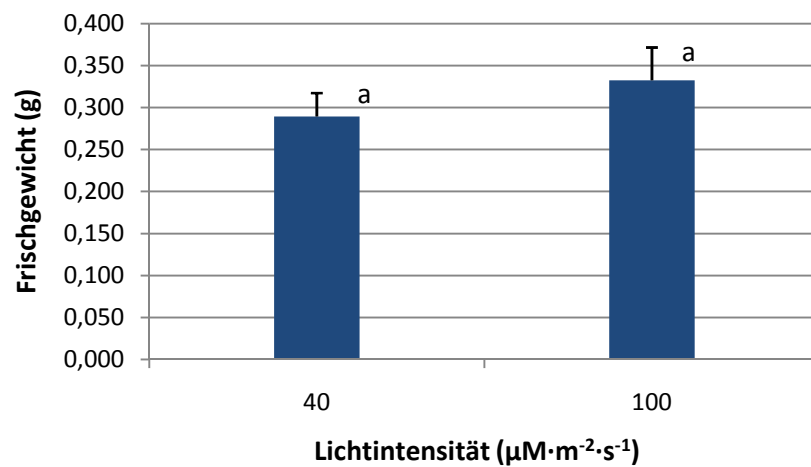


Abbildung 19: Einfluss der Lichtintensität auf das Frischgewicht der Sprosse, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Die Art des Verschlusses schien einen merklichen Einfluss auf das Frischgewicht von Sprossen zu haben. Kulturen, die in Gefäßen mit Verschlüssen mit 2 Bohrungen etabliert wurden, wiesen mit 0,375 g das höchste Frischgewicht der Sprosse auf. Nichtsignifikant folgten Kulturgefäßen mit Verschlüssen mit 1 Bohrung. Das geringste Frischgewicht wurde bei Kulturen gemessen, bei denen die Kulturgefäße normale Verschlüsse hatten. Hier betrug das durchschnittliche Frischgewicht nur 0,207 g und unterschied sich somit signifikant von den beiden anderen Versuchsreihen (siehe Abbildung 20, S. 26).

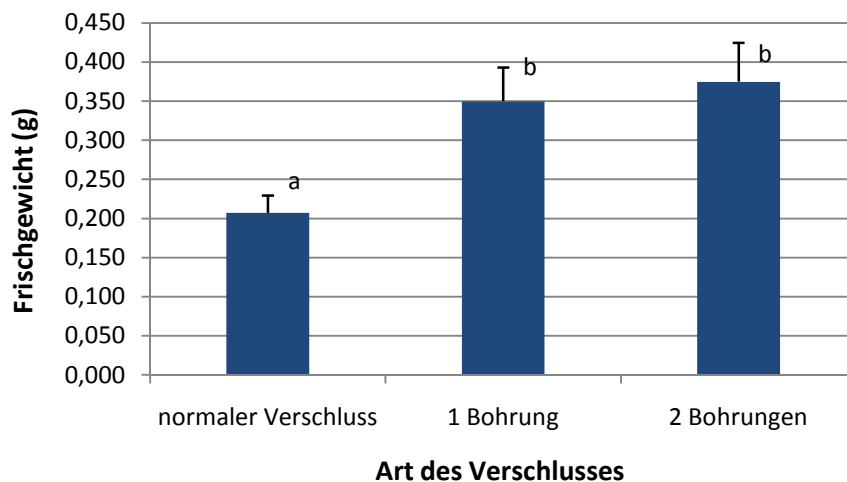


Abbildung 20: Einfluss der Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf das Frischgewicht von Sprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Betrachtet man den Effekt der drei unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen unabhängig von den beiden anderen Einflussfaktoren, kann festgestellt werden, dass das Frischgewicht der Sprosse bei Kultivierung auf saccharosefreiem Medium mit 0,322 g am höchsten war, gefolgt von Kulturen auf Medien mit 3 % Saccharosegehalt. Das niedrigste Frischgewicht mit 0,297 g konnte bei Kultivierung auf Medien mit 1 % Saccharose festgestellt werden. Die Unterschiede innerhalb dieser drei Versuchsreihen waren jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 21, S. 27).

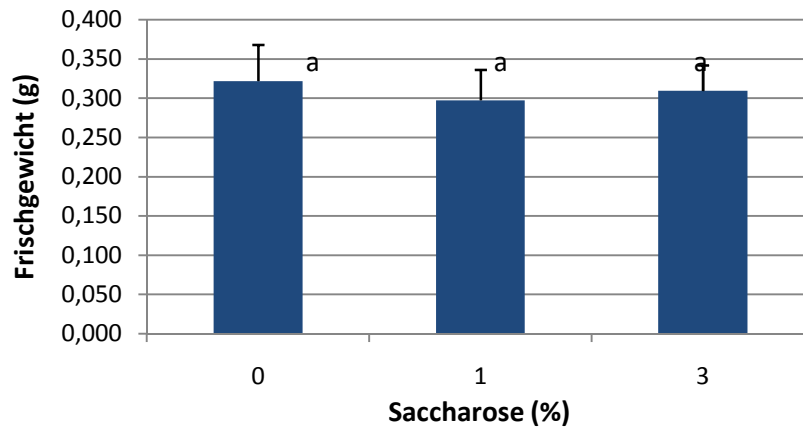


Abbildung 21: Einfluss unterschiedlicher Saccharosekonzentrationen im Medium auf das Frischgewicht von Sprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Im Anschluss werden die Auswirkungen von möglichen Kombinationen der drei Faktoren Lichtintensität, Saccharosekonzentration im Medium und Art des Verschlusses am Kulturgefäß beschrieben.

Betrachtet man den gemeinsamen Einfluss von Lichtintensität und Saccharosekonzentration im Medium, ohne dabei die Art des Verschlusses am Kulturgefäß zu berücksichtigen, so zeigt sich, dass das höchste Frischgewicht von 0,404 g in der Versuchsreihe mit den Konditionen $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 0 % Saccharose im Medium erreicht wurde. Nichtsignifikant folgten in absteigender Reihenfolge die Versuchsreihen mit $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Lichtintensität/3 % Saccharose, $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 % Saccharose, $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtstärke/1 % Saccharose, $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/3 % Saccharose und $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /0 % Saccharose (siehe Abbildung 22, S. 28).

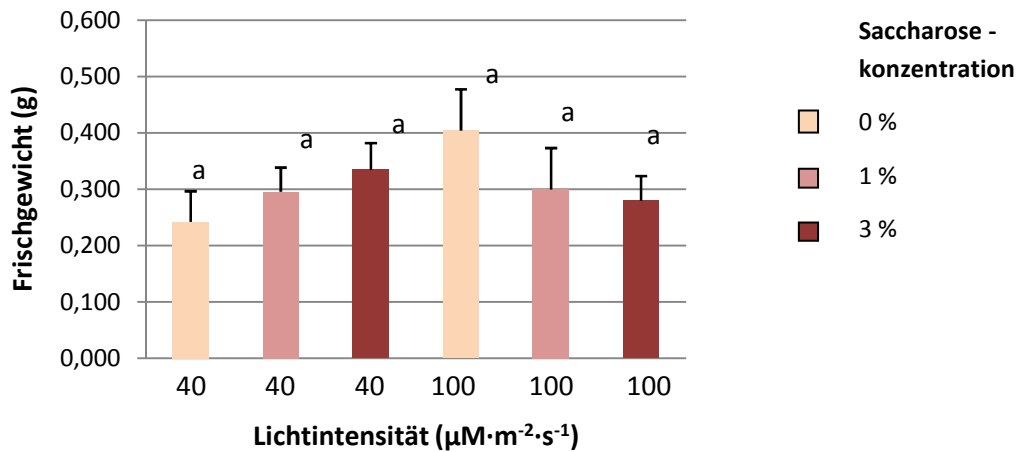


Abbildung 22: Einfluss von Lichtintensität und Saccharosekonzentration im Medium auf das Frischgewicht von Sprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Kombiniert man die Faktoren Lichtintensität und Art des Verschlusses und lässt dabei die Saccharosekonzentration außer Acht, kann man feststellen, dass Sprosse, die in der Versuchsreihe mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität und in Gefäßen mit Verschlüssen mit 2 Bohrungen kultiviert wurden, das höchste Frischgewicht von 0,404 g erreichten. Nichtsignifikant folgten in absteigender Reihenfolge die Versuchsreihen mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 Bohrung, $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /2 Bohrungen und $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /1 Bohrung (siehe Abbildung 23, S. 29). Das geringste Frischgewicht von 0,205 g wurde in der Versuchsreihe mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtstärke/normaler Verschluss gemessen, gefolgt von Kulturen mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/normaler Verschluss, wobei der Unterschied zwischen diesen beiden Versuchsreihen nicht signifikant war. Es konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei soeben beschriebenen Versuchsreihen zu jenen beiden Versuchsreihen mit dem höchsten Frischgewicht festgestellt werden (siehe Abbildung 23, S. 29).

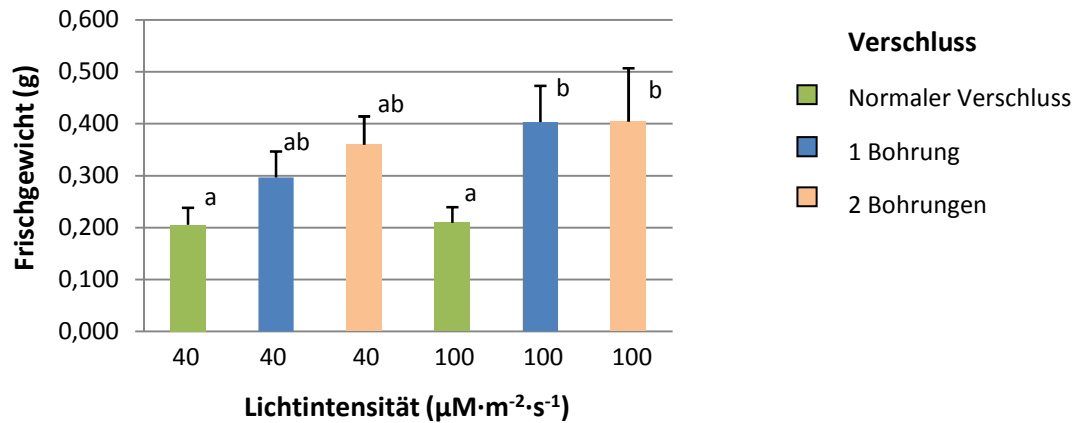


Abbildung 23: Einfluss von Lichtintensität und Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf das Frischgewicht von Sprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Fasst man unabhängig von der Lichtintensität den Einfluss unterschiedlicher Saccharosekonzentrationen im Medium und der Art des Verschlusses am Kulturgefäß zusammen, so kann festgestellt werden, dass das höchste Frischgewicht bei jenen Kulturen gemessen werden konnte, die auf Medien mit 3 % Saccharose und Verschlüssen mit 2 Bohrungen etabliert wurden (siehe Abbildung 24, S. 30). In der Reihung danach finden sich die Versuchsreihen 0 % Saccharose/2 Bohrungen, 1 % Saccharose/1 Bohrung, 0 % Saccharose/1 Bohrung und 1 % Saccharose/2 Bohrungen, welche sich jedoch nicht signifikant voneinander unterschieden. Das geringste Frischgewicht wurde bei Kulturen unter den Konditionen 0 % Saccharose/normaler Verschluss festgestellt, womit ein signifikanter Unterschied zu den oben genannten Versuchsreihen gegeben war. In der Versuchsreihe 1 % Saccharose/normaler Verschluss fiel das Frischgewicht relativ gering aus und unterschied sich nicht signifikant von den restlichen Versuchsreihen. Auch in den Gruppen mit 3 % Saccharose/normaler Verschluss und 3 % Saccharose/1 Bohrung zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zu den übrigen Versuchsreihen bestand, obwohl hier das Frischgewicht etwas höher ausfiel (siehe Abbildung 24, S. 30).

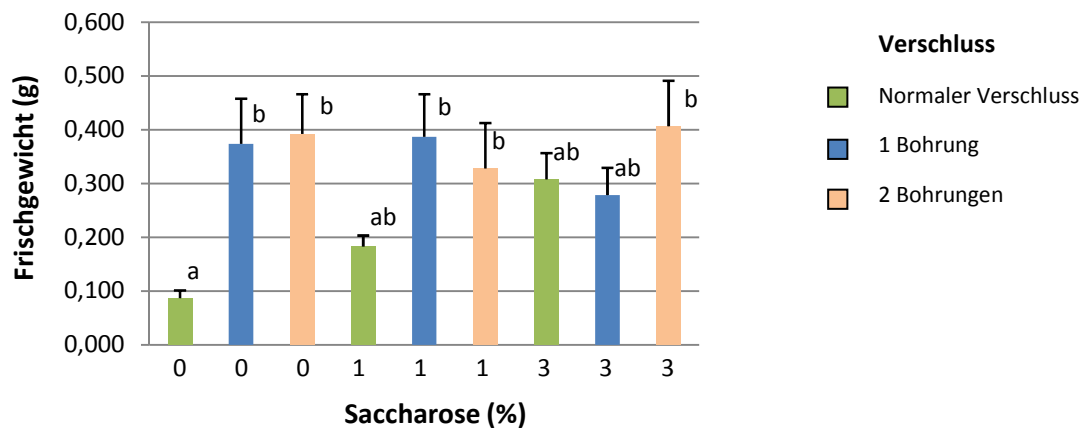


Abbildung 24: Einfluss von Saccharosekonzentration und Art des Verschlusses auf das Frischgewicht von Sprossen, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Auch bezüglich des Frischgewichtes der Sprosse waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Explantattypen festzustellen. Daher wird auf die Ergebnisse von Stecklingsexplantaten hier nicht näher eingegangen.

3.4. Auswirkungen der Kulturbedingungen auf die Nodienzahl

In dem nun folgenden Kapitel wird der Einfluss der drei Faktoren Lichtintensität (40 oder $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF), Art des Verschlusses am Kulturgefäß (normaler Verschluss ohne Bohrung, mit 1 oder 2 Bohrungen) und Saccharosekonzentration im Medium (0, 1 oder 3 %) auf die Nodienzahl pro Spross beschrieben. Der Effekt dieser drei Variablen wird jeweils erst einzeln und im Anschluss in den möglichen Kombinationen erörtert.

Als alleiniger Einflussfaktor betrachtet, wirkte sich die Lichtintensität so auf die Nodienzahl aus, dass Kulturen, die bei einer Lichtstärke von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ etabliert wurden, mit durchschnittlich 8,8 Nodien pro Spross geringfügig mehr Nodien

bildeten als solche, die unter der Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ kultiviert wurden. Wie aus Abbildung 25 ersichtlich ist, war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

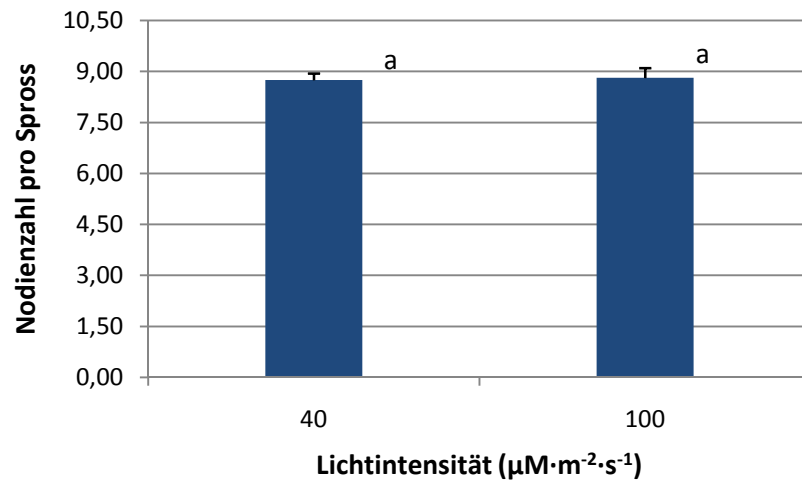


Abbildung 25: Einfluss der Lichtintensität auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Betrachtet man den Einfluss des Verschlusses am Kulturgefäß unabhängig von den beiden anderen Faktoren, so kann festgestellt werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den drei möglichen Verschluss-Arten gegeben war. Wie aus Abbildung 26 (S. 32) ersichtlich ist, wurde die höchste Nodienzahl von 9,6 Nodien pro Spross dann erreicht, wenn zum Verschließen der Kulturgefäße normale Verschlüsse ohne Bohrung verwendet wurden. Mit signifikantem Unterschied folgten Gefäße, die mit Deckeln mit 1 Bohrung verschlossen waren. Die geringste Nodienzahl wurde bei Kulturen festgestellt, deren Gefäße Verschlüsse mit 2 Bohrungen aufwiesen. Hier betrug die Nodienzahl 7,8 und unterschied sich signifikant von den beiden anderen Verschluss-Arten (siehe Abbildung 26, S. 32). Der Einfluss der Art des Verschlusses am Kulturgefäß ist auch in Abbildung 27 (S. 32) dargestellt.

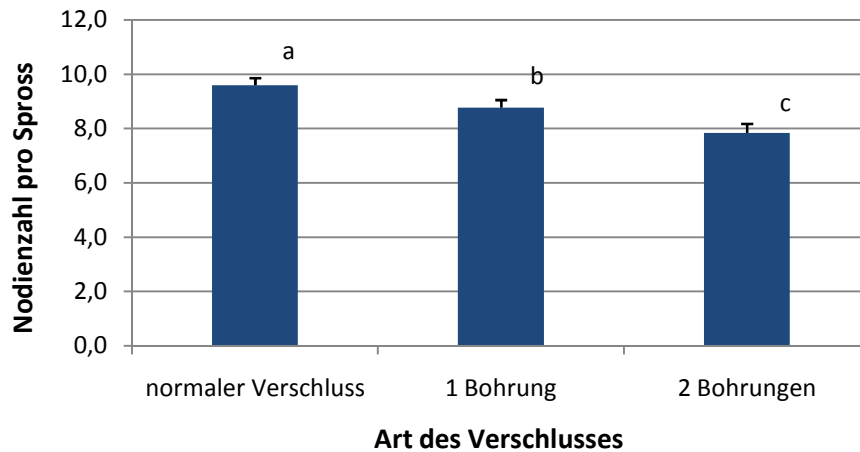


Abbildung 26: Einfluss der Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

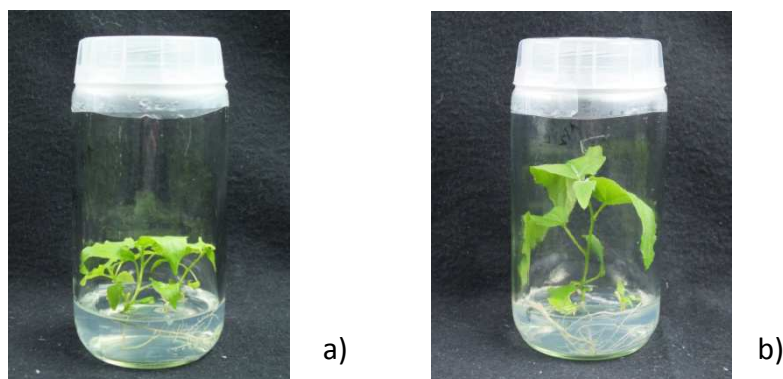


Abbildung 27: Anzahl der Nodien pro Spross nach 7 Wochen in Abhängigkeit von der Art des Verschlusses; Kulturbedingungen: $40 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Lichtintensität, 1 % Saccharose im Nährmedium; a) normaler Verschluss ohne Bohrung, b) Verschluss mit 2 Bohrungen

Im Gegensatz dazu schien die Saccharosekonzentration im Medium nur eine geringe Auswirkung auf die Nodienzahl zu haben, wenn man sie als alleinigen Einflussfaktor betrachtet. Die meisten Nodien bildeten sich in den Versuchsreihen mit 1 % Saccharosegehalt im Medium: Hier betrug die Nodienzahl 9,0. Danach folgten

Kulturen, die auf saccharosefreiem Medium etabliert wurden mit einer Nodienzahl von 8,8. Die geringste Nodienzahl fand sich in Versuchsreihen mit 3 % Saccharosekonzentration im Medium wieder. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den drei verschiedenen Zuckerkonzentrationen festgestellt werden (siehe Abbildung 28).

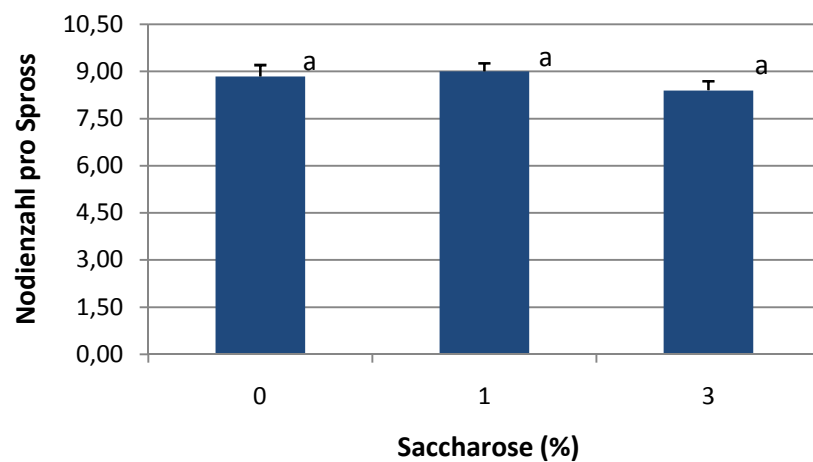


Abbildung 28: Einfluss der Saccharosekonzentration im Medium auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Im Folgenden werden mögliche Kombinationen der drei Faktoren Lichtintensität, Saccharosekonzentration und Art des Verschlusses und deren Auswirkung auf die Anzahl der Nodien pro Spross beschrieben.

Betrachtet man den Einfluss der Kombination aus den Variablen Lichtintensität und Saccharosekonzentration, ohne die Art des Verschlusses am Kulturgefäß zu berücksichtigen, so zeigt sich, dass der Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsreihen nur gering ausfiel. Die meisten Nodien konnten bei den Konditionen $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/0 % Saccharosegehalt gezählt werden. Hier betrug die Nodienzahl 9,5 (siehe Abbildung 29, S. 34). Nichtsignifikant folgten in absteigender Reihenfolge die Versuchsreihen mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 % Saccharose, $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Lichtstärke/1 % Zuckergehalt, $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/3 % Saccharosegehalt und $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/0 % Zucker im Medium. Die wenigsten Nodien bildeten Kulturen aus, die unter den Konditionen $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität und 3 % Saccharosegehalt im Medium etabliert wurden. Die Nodienzahl in dieser Gruppe betrug 8,1. Beim Vergleich dieser Versuchsreihe mit jener, in welcher die meisten Nodien gebildet wurden, stellt man fest, dass hier ein signifikanter Unterschied gegeben war (siehe Abbildung 29).

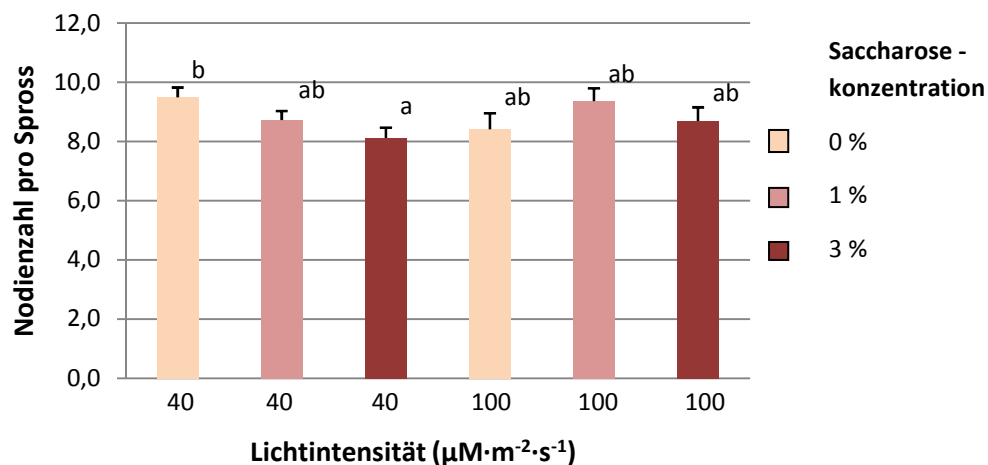


Abbildung 29: Einfluss von Lichtintensität und Saccharosekonzentration auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Fasst man die beiden Faktoren Lichtintensität und Art des Verschlusses am Kulturgefäß zusammen und betrachtet deren gemeinsamen Einfluss auf die Nodienzahl unabhängig von der Saccharosekonzentration im Medium, so kann man feststellen, dass sich die meisten Nodien in der Versuchsreihe mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität und normalem Verschluss gebildet haben. Hier wurden 10,1 Nodien pro Spross gezählt (siehe Abbildung 30, S. 35). Danach reihte sich die Gruppe mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und normalem Verschluss mit nichtsignifikantem Unterschied. Die drei Versuchsreihen mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 Bohrung, $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 Bohrung und $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/2 Bohrungen lagen im Mittelfeld und unterschieden sich signifikant von jener Versuchsreihe mit der höchsten

Nodienanzahl. Hingegen war der Unterschied zur oben genannten Versuchsreihe mit der zweithöchsten Nodienzahl nicht signifikant. Mit 7,0 Nodien pro Spross konnte in der Gruppe mit den Konditionen $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und Verschluss mit 2 Bohrungen die niedrigste Nodienanzahl festgestellt werden. Diese Gruppe unterschied sich signifikant von allen anderen Versuchsreihen (siehe Abbildung 30).

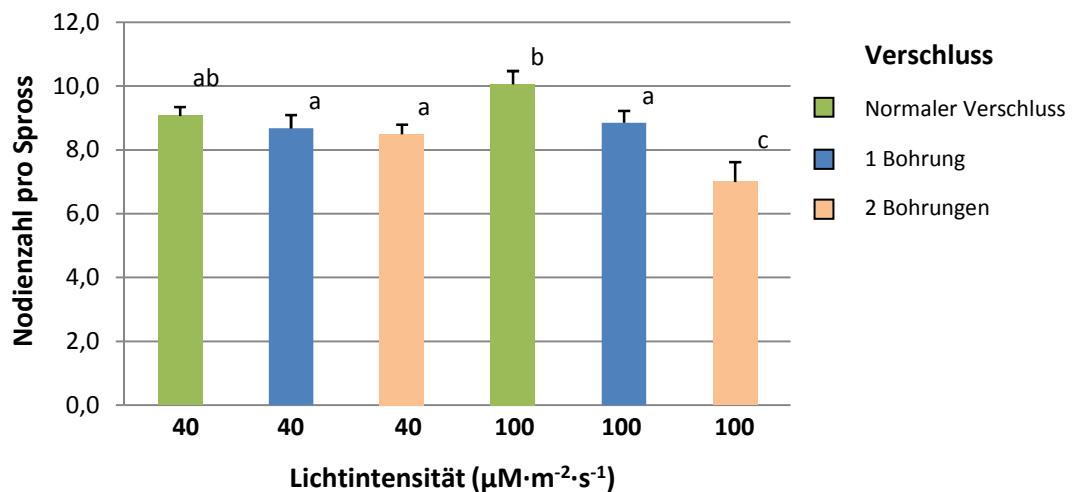


Abbildung 30: Einfluss von Lichtintensität und Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Kombiniert man die Variablen Saccharosegehalt im Medium und Art des Verschlusses am Kulturgefäß und betrachtet die Auswirkungen auf die Nodienzahl pro Spross, ohne dabei die Lichtintensität zu berücksichtigen, stellt man fest, dass Kulturen, die auf saccharosefreiem Medium und mit Verschlüssen mit 1 Bohrung etabliert wurden, die höchste Nodienzahl von 10,4 erreichten (siehe Abbildung 31, S. 36). Nichtsignifikant folgten in absteigender Reihenfolge die Kulturen mit den Konditionen 1 % Saccharose/normaler Verschluss, 0 % Saccharose/normaler Verschluss und 3 % Saccharose/normaler Verschluss. Mit nichtsignifikantem Unterschied zu den drei soeben erwähnten Versuchsreihen platzierten sich danach die Kulturen, die unter den Konditionen 1 % Saccharose/1 Bohrung etabliert wurden. Beim Vergleich dieser Gruppe mit jener Versuchsreihe, die die höchste

Nodienanzahl erreicht hat, stellt man hier einen signifikanten Unterschied fest. 7,8 Nodien pro Spross wurden in der Versuchsreihe mit 0 % Saccharose/2 Bohrungen gebildet. Sie stellte somit die Gruppe mit der niedrigsten Nodienzahl dar. Verglichen mit den drei Versuchsreihen, die die meisten Nodien hervorbrachten, konnte man hier einen signifikanten Unterschied feststellen. Wie aus Abbildung 31 ersichtlich ist, bildeten sich geringfügig mehr Nodien in den Versuchsreihen mit 3 % Saccharose/2 Bohrungen, 1 % Saccharose/2 Bohrungen und 3 % Saccharose/1 Bohrung. Sie reihten sich vor der Versuchsreihe mit der geringsten Nodienzahl, allerdings mit nichtsignifikantem Unterschied. Beim Vergleich dieser Gruppen mit jenen 3 Versuchsreihen, die die meisten Nodien aufwiesen, zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 31).

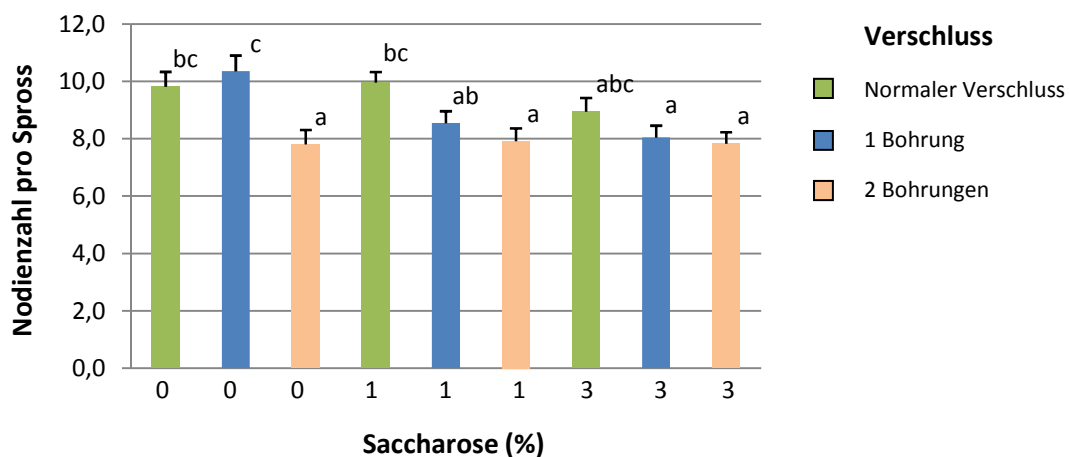


Abbildung 31: Einfluss der Saccharosekonzentration im Medium und der Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Beim Vergleich der beiden Explantattypen stellte sich heraus, dass es einen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl der Nodien gab. Wie in Abbildung 32 (S. 37) zu sehen ist, bildeten sich bei den Nodienexplantaten im Durchschnitt 9,4 Nodien pro Spross. Hingegen betrug die Anzahl der Nodien bei den Stecklingsexplantaten nur 7,0.

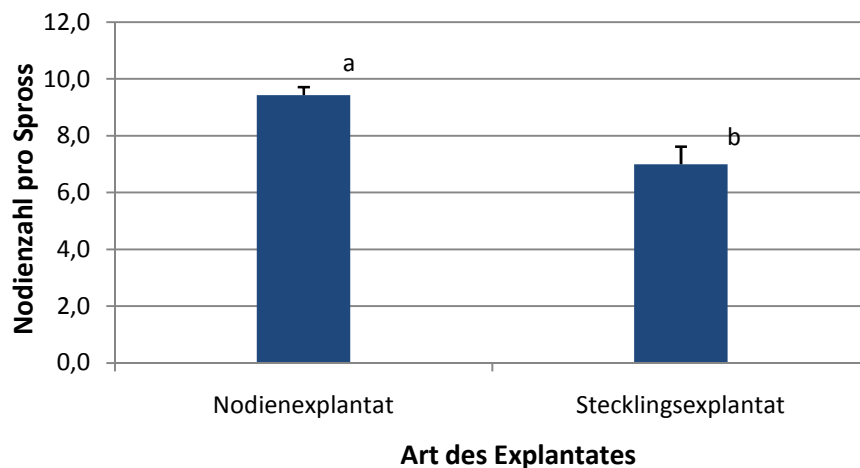


Abbildung 32: Einfluss des Explantattyps auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

3.5. Auswirkungen der Kulturbedingungen auf den Chlorophyllgehalt

In diesem Kapitel wird der Einfluss der drei Variablen Lichtintensität (40 oder 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF), Art des Verschlusses am Kulturgefäß (normaler Verschluss ohne Bohrung, mit 1 bzw. 2 Bohrungen) und Saccharosekonzentration im Medium (0, 1 oder 3 %) auf den Chlorophyllgehalt der Blätter beschrieben. Zuerst wird einzeln auf den Effekt eines jeden Faktors eingegangen und danach die Auswirkung von möglichen Kombinationen dargelegt.

Beim Betrachten der Lichtintensität als alleinigen Einflussfaktor auf den Chlorophyllgehalt der Blätter ist feststellbar, dass bei Kulturen, die bei einer Lichtintensität von 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ etabliert wurden, der Gehalt an Chlorophyll höher war als bei jenen mit einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Wie aus Abbildung 33 (S. 38) ersichtlich ist, war dieser Unterschied signifikant.

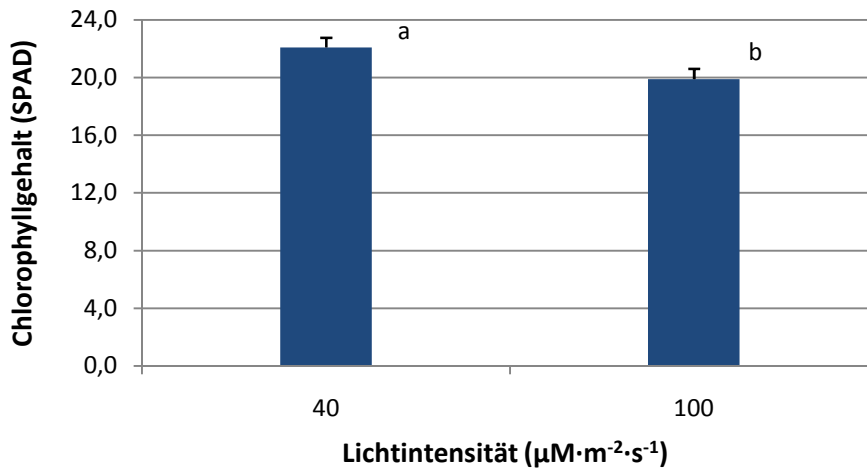


Abbildung 33: Einfluss der Lichtintensität auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Unabhängig von den beiden Faktoren Lichtstärke und Saccharosegehalt wirkte sich die Art des Verschlusses auf den Chlorophyllgehalt der Blätter wie folgt aus: Der höchste Gehalt an Chlorophyll mit 23,2 SPAD-Units wurde bei Kulturen gemessen, die sich in Gefäßen mit Verschlüssen mit 2 Bohrungen entwickelten. Mit nichtsignifikantem Abstand folgten die Kulturen in Gefäßen mit 1 Bohrung. Bei Etablierung der Kulturen in Gefäßen mit normalem Verschluss ohne Bohrung wurde der niedrigste Chlorophyllgehalt festgestellt. Diese Gruppe unterschied sich signifikant von den beiden anderen Versuchsreihen (siehe Abbildung 34, S. 39).

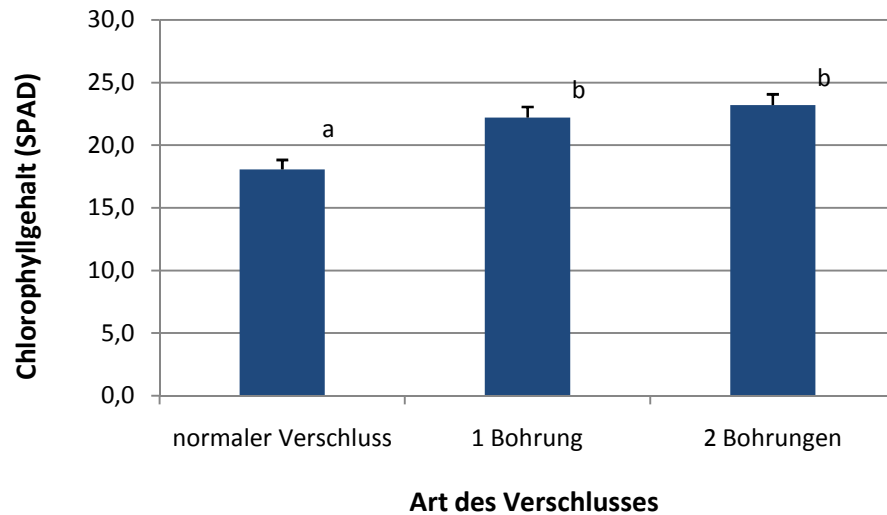


Abbildung 34: Einfluss der Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Sieht man sich die Auswirkung der Saccharosekonzentration unabhängig von Lichtintensität oder Verschluss auf den Chlorophyllgehalt der Blätter an, so zeigt sich, dass der höchste Gehalt bei jenen Kulturen erreicht werden konnte, die mit 3 % Saccharose im Medium etabliert wurden. Hier betrug der gemessene Wert 25,7 SPAD-Units (siehe Abbildung 35, S. 40). Danach folgten mit signifikantem Unterschied die Kulturen mit 1 % Saccharose. Der geringste Gehalt an Chlorophyll wurde in der Versuchsreihe mit saccharosefreiem Medium gemessen. Hier betrug der Wert 17,8 SPAD-Units. Wie in Abbildung 35 (S. 40) zu sehen ist, war hier ein signifikanter Unterschied zu den beiden anderen Versuchsreihen feststellbar.

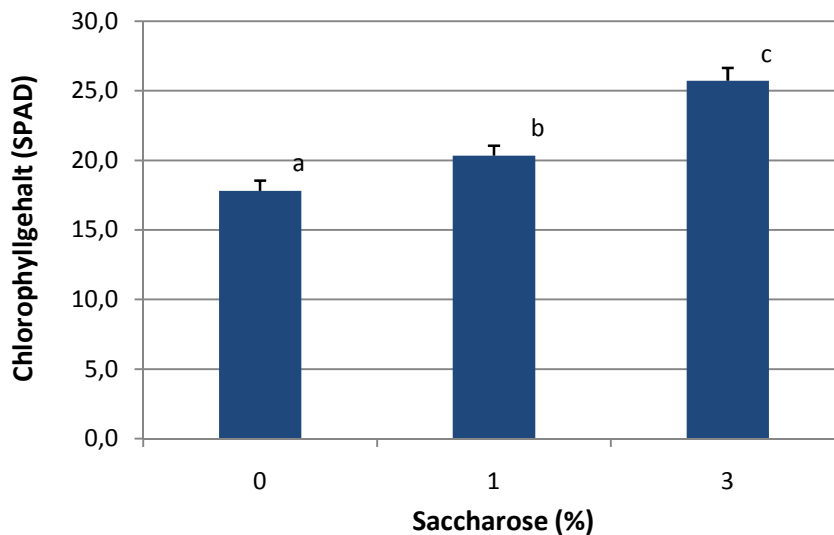


Abbildung 35: Einfluss der Saccharosekonzentration im Medium auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit verschiedenen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Nun werden jeweils zwei Variablen zusammengefasst und deren Auswirkung auf den Chlorophyllgehalt der Blätter beschrieben.

Kombiniert man die Faktoren Lichtintensität und Saccharosegehalt im Medium und betrachtet deren Einfluss auf den Gehalt an Chlorophyll, ohne die Art des Verschlusses am Kulturgefäß zu berücksichtigen, so zeigt sich, dass der höchste Wert (26,5 SPAD-Units) bei der Versuchsreihe mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 3 % Zuckergehalt gemessen wurde (siehe Abbildung 36, S. 41). Danach reihten sich mit nicht signifikantem Unterschied die Kulturen unter den Konditionen $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/3 % Saccharose. Der dritthöchste Chlorophyllgehalt wurde in der Versuchsreihe mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 1 % Zuckergehalt im Medium erreicht. Es bestand ein signifikanter Unterschied zu jener Gruppe mit den höchst gemessenen Werten, jedoch nicht zu jener mit dem zweithöchsten Gehalt an Chlorophyll. In der Versuchsreihe mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtstärke/0 % Saccharose wurde der vierthöchste Wert gemessen. Sie unterscheidet sich nicht signifikant von jener Gruppe, die den dritthöchsten Chlorophyllgehalt aufwies. Hingegen ist der Unterschied zu jenen beiden Gruppen mit den höchsten Chlorophyllwerten

signifikant. In der Versuchsreihe mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/0 % Saccharose wurde der geringste Gehalt an Chlorophyll gemessen. Nichtsignifikant folgten die Kulturen unter den Konditionen Lichtintensität $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 % Saccharosegehalt. Hingegen gab es einen signifikanten Unterschied zu den anderen Versuchsreihen, wie aus Abbildung 36 ersichtlich ist.

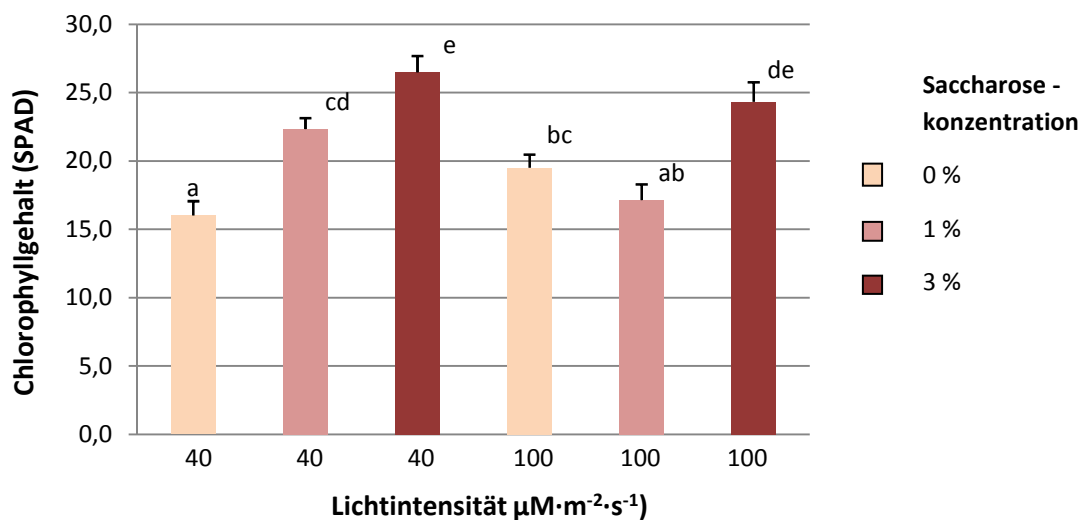


Abbildung 36: Einfluss von Lichtintensität und Saccharosekonzentration auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Nun wird der Einfluss der Kombination aus den beiden Variablen Lichtintensität und Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf den Chlorophyllgehalt der Blätter unabhängig vom Saccharosegehalt im Medium beschrieben. Wie in Abbildung 37 (S. 42) zu sehen ist, wurde der höchste Wert bei Kulturen gemessen, die unter den Konditionen $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität/Verschluss mit 2 Bohrungen etabliert wurden. Der Wert betrug in dieser Gruppe 23,8 SPAD-Units. Mit nichtsignifikantem Unterschied und in absteigender Reihenfolge folgten die Versuchsreihen mit $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 Bohrung, $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/2 Bohrungen, $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 Bohrung und $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtstärke kombiniert mit normalem Verschluss ohne Bohrung. Der geringste Gehalt an Chlorophyll wurde in jener Gruppe von

Kulturen gemessen, die unter den Konditionen Lichtstärke $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /normaler Verschluss ohne Bohrung etabliert wurde. Sie unterschied sich signifikant von den oben beschriebenen Versuchsreihen (siehe Abbildung 37).

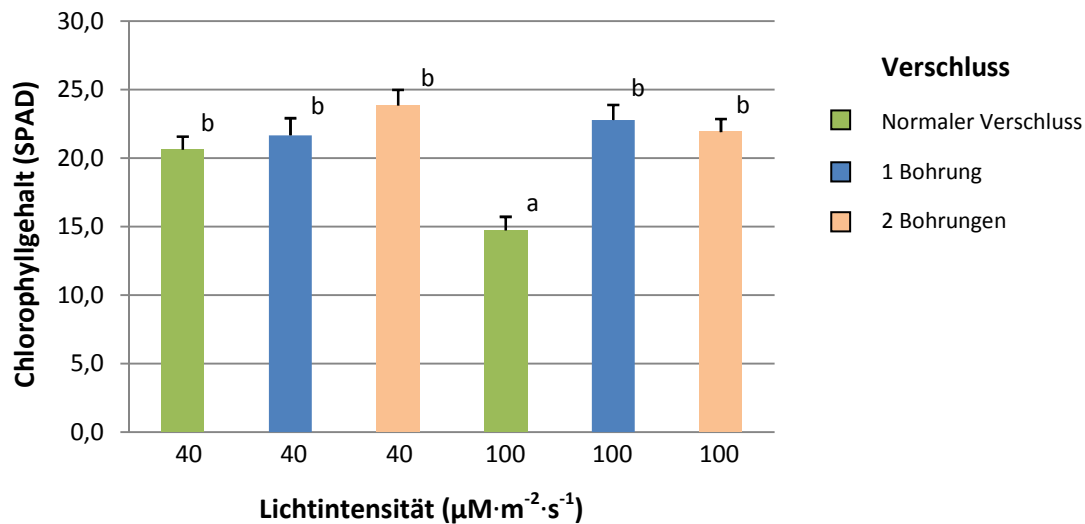


Abbildung 37: Einfluss von Lichtintensität und Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Betrachtet man die Auswirkung einer Kombination der Faktoren Saccharosegehalt im Medium und Art des Verschlusses am Kulturgefäß, ohne die Lichtintensität dabei zu berücksichtigen, so zeigt sich, dass der Chlorophyllgehalt der Blätter generell bei einer Zuckerkonzentration von 3 % am höchsten war, unabhängig davon, welcher Verschluss verwendet wurde (siehe Abbildung 38, S. 43). Der höchste Wert von 26,8 SPAD-Units wurde in der Gruppe mit 3 % Saccharose/Verschluss mit 1 Bohrung erreicht. Nichtsignifikant folgten in absteigender Reihenfolge die Versuchsreihen mit 3 % Zuckergehalt/2 Bohrungen und 3 % Saccharose/normaler Verschluss ohne Bohrung. Danach reihten sich jene Kulturen, die unter den Konditionen 1 % Saccharose/2 Bohrungen etabliert worden waren, gefolgt von solchen mit 1 % Saccharose/1 Bohrung (bei nichtsignifikantem Unterschied). Weiters folgte die Versuchsreihe mit 0 % Saccharose und Verschluss mit 2 Bohrungen. Es konnte ein

signifikanter Unterschied zu jenen beiden Versuchsreihen festgestellt werden, welche den höchsten Gehalt an Chlorophyll aufwiesen, nicht jedoch zu den drei Gruppen, die dazwischen lagen. Der geringste Wert wurde in der Versuchsreihe mit 0 % Saccharosegehalt im Medium und normalem Verschluss ohne Bohrung gemessen. Mit nichtsignifikantem Abstand folgte die Gruppe 1 % Saccharose/normaler Verschluss vor 0 % Saccharose/1 Bohrung. Wie aus Abbildung 38 ersichtlich ist, gab es jedoch einen signifikanten Unterschied beim Vergleich dieser drei soeben beschriebenen mit den restlichen Versuchsreihen.

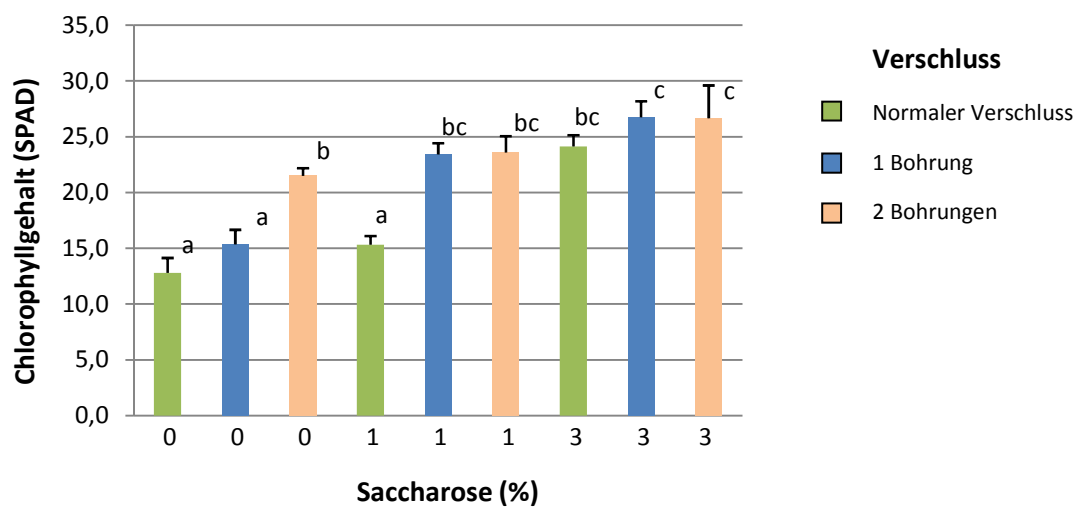


Abbildung 38: Einfluss von Saccharosekonzentration im Medium und Art des Verschlusses am Kulturgefäß auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p = 0,05$)

Es hat sich gezeigt, dass beim Vergleich der beiden Explantattypen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Chlorophyllgehaltes der Blätter aufgetreten sind. Daher wird auf die genauen Ergebnisse mit Stecklingsexplantaten nicht näher eingegangen.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Versuchen zur Etablierung von photoautotrophen in vitro-Kulturen des Pappel-Hybrids 741. Pappeln sind Holzpflanzen und gehören zur Familie der Salicaceae. Da sie sehr schnell wachsen, werden sie auch industriell, z.B. in der Holz- und Papierindustrie oder zur Energiegewinnung, immer mehr genutzt. Dadurch steigt der Bedarf an Pappeln kontinuierlich an. Heute werden Pappeln neben der herkömmlichen vegetativen Vermehrung auch über Gewebekultur weitervermehrt (Lubrano, 1992).

Um der steigenden Nachfrage besser nachkommen zu können, scheint die photoautotrophe in vitro-Kultivierung von Pappeln eine gute Alternative zur herkömmlichen vegetativen Vermehrung und zur konventionellen Gewebekultur zu sein, da diese noch relativ neue Technik der Mikrovermehrung viele Vorteile mit sich bringt (siehe Kap. 1, S. 4). So sind bei photoautotroph etablierten in vitro-Kulturen weniger oft Anomalien in der Morphologie oder Physiologie der Pflanzen zu beobachten als bei konventionellen in vitro-Kulturen (Afreeen, 2005). Dies führt unter anderem auch dazu, dass ein größerer Prozentsatz der Pflänzchen ex vitro überleben kann (Xiao et al., 2011).

Eine Reihe verschiedener Pflanzenarten wurde bereits erfolgreich photoautotroph kultiviert (Kubota et al., 2005), darunter auch viele Holzpflanzen (Kozai und Kubota, 2001). In der Literatur sind auch einige Versuche mit Pappeln angeführt, die allerdings meist über konventionelle Mikrovermehrung etabliert wurden (Sellmer et al., 1989; Chaturvedi et al., 2004; Yadav et al., 2009). In einer Studie mit *Populus deltoides* untersuchten Mingozi et al. (2008) die Entwicklung der Explantate unter photoautotrophen Kulturbedingungen und stellten fest, dass vermehrt Wurzeln und größere Blätter gebildet wurden und die Sprosselongation wesentlich schneller erfolgte als bei der photomixotrophen Kontrollgruppe.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Findung erfolgsversprechender Kulturbedingungen für die Etablierung einer photoautotrophen in vitro-Kultur des Pappel-Hybrids 741. Untersucht wurden dabei die Auswirkungen unterschiedlich

starker Lichtintensitäten, der Art des Verschlusses bzw. die daraus resultierende unterschiedlich starke Belüftung des Kulturgefäßes und der Effekt einer variierenden Saccharosekonzentration im Nährmedium auf die Entwicklung der Explantate. Der Einfluss dieser drei Faktoren auf das Wachstum der Kulturen wurde anhand von fünf Parametern bestimmt, nämlich Blattzahl, Blattfläche, Frischgewicht, Nodienzahl und Chlorophyllgehalt der Blätter. Diese Parameter werden oft zur Auswertung entsprechender Versuche herangezogen (Teixeira da Silva et al., 2005; Mingozi et al., 2008; Xiao et al., 2011).

Die Wahl des Nährmediums fiel auf das ½ LS-Medium, da von Hanak (Dissertation in Vorbereitung) bestätigt wurde, dass es für die Entwicklung des Pappel-Hybrids 741 gut geeignet ist. Als Gelbildner wurde Gelrite® eingesetzt. Kang et al. (2009) bestätigten in einem Versuch mit *Populus trichocarpa* „Nisqually-1“ den positiven Einfluss von Gelrite® auf die Entwicklung der Kulturen im Vergleich zu Agar.

Ein Untersuchungsaspekt der vorliegenden Arbeit war der Einfluss unterschiedlicher Saccharosekonzentrationen im Medium auf das Wachstum der Explantate. Getestet wurden die Saccharosekonzentrationen 1 und 3 % sowie saccharosefreies Medium. Auch Mingozi et al. (2008) arbeiteten in ihrem Versuch mit *Populus deltoides* mit diesen 3 Saccharosekonzentrationen.

Ebenso sollte die Auswirkung unterschiedlicher Lichtintensitäten untersucht werden. So fiel die Entscheidung auf 100 und 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF, wobei der höhere Wert für die photoautotrophen und der niedrigere für die konventionellen Kulturbedingungen stehen sollte. Ähnliche Lichtintensitäten wurden auch von Xiao und Kozai (2006) in einem Versuch verwendet, in dem die Entwicklung von *Limonium latifolium* unter photoautotrophen Konditionen mit der unter photomixotrophen Konditionen verglichen wurde.

Der dritte Untersuchungsgegenstand war der Einfluss des Verschlusses am Kulturgefäß bzw. die unterschiedlich starke Belüftung, die daraus resultierte. Generell wurden Magenta®B-Caps verwendet, wobei ein Teil davon eine Bohrung, ein Teil zwei Bohrungen und der Rest keine Bohrungen aufwies. Um Kontaminationen zu verhindern, wurden außen an den Löchern gasdurchlässige Membranfilterscheiben angebracht. Die Bohrungen sollten einer verstärkten

Belüftung der Gefäße dienen. Die Wahl dieser Methode erfolgte in Anlehnung an die Literatur (Afreen-Zobayed et al., 2000; Xiao und Kozai, 2006).

Ein Untersuchungsparameter der vorliegenden Arbeit war der Einfluss der Kulturbedingungen auf die durchschnittliche Blattzahl pro Spross. Bei der alleinigen Betrachtung des Einflussfaktors Belüftung ist feststellbar, dass die höchste Blattzahl bei Kulturen mit normalem Verschluss erreicht wurde. Aus einer Kombination der Einflussfaktoren Lichtstärke und Art des Verschlusses kann herausgelesen werden, dass sich bei hohem PPF und normalem Verschluss die meisten Blätter pro Spross bildeten. Betrachtet man nur die Lichtintensität, ohne die anderen Kulturbedingungen zu berücksichtigen, bildeten sich bei höherem PPF von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ mehr Blätter pro Spross als bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ähnlich verhält es sich, wenn man zusätzlich als zweiten Einflussfaktor die Saccharosekonzentration im Medium mit berücksichtigt. Die höchste Blattzahl konnte bei der Kombination von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 1 % Saccharose festgestellt werden. Auch auf zuckerfreiem Medium bildeten die Kulturen sowohl bei 40 als auch bei $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF viele Blätter aus. Nimmt man die Saccharosekonzentration im Medium als alleinigen Einflussfaktor an, zeigt sich, dass zuckerfreies Medium am besten dafür geeignet war, eine hohe Blattzahl zu erreichen. Bezieht man auch die Art des Verschlusses mit ein, so ist feststellbar, dass mit normalem Verschluss umso mehr Blätter gebildet wurden, je weniger Saccharose im Medium vorhanden war. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Blattzahl bei hoher Lichtstärke, wenig oder keiner Saccharose im Medium und mit normalem Verschluss ohne Bohrungen am höchsten war.

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch von Cui et al. (2000) beschrieben: Sie stellten fest, dass eine erhöhte Belüftung der Kulturgefäße bei *Rehmannia glutinosa* nicht zu einer erhöhten Blattzahl führte. Man findet in der Literatur jedoch auch kontroverse Ergebnisse. Zobayed et al. (1999) beobachteten in einem Versuch mit *Eucalyptus camaldulensis*, dass unter photoautotrophen Konditionen mehr Blätter pro Spross gebildet wurden als in einer Kontrollgruppe unter konventionellen Bedingungen. Auch Zobayed et al. (2001) und Xiao und Kozai (2006) kamen zu diesen Ergebnissen. Hingegen berichteten Xiao und Zhang (2011), dass zwischen in vitro-Kulturen von

Yucca filamentosa unter photoautotrophen und photomixotrophen Konditionen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Blattzahl zu messen war.

Ein weiterer Untersuchungsparameter war die Blattfläche. Hier schien vor allem der Belüftungsgrad einen großen Einfluss zu haben. In Kulturgefäßen mit 2 Bohrungen wurden die größten Blätter gebildet. Wenn man zusätzlich das Licht als zweiten Einflussfaktor miteinbezieht, zeigt sich, dass die Blätter bei 2 Bohrungen und $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF am größten waren. Aus einer Kombination der Faktoren Verschluss und Saccharosegehalt geht hervor, dass sich die größten Blattflächen bildeten, wenn Verschlüsse mit 2 Bohrungen und saccharosefreies Medium verwendet wurden. Betrachtet man jedoch die Saccharosekonzentration als alleinigen Einflussfaktor, zeigt sich, dass sich bei 3 % Zuckergehalt die größten Blätter bildeten. Nimmt man die Lichtintensität als alleinigen Einflussfaktor an, war die Blattfläche bei einer Lichtstärke von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ größer als bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Wenn man den Einfluss der Faktoren Lichtintensität und Saccharosegehalt im Medium gemeinsam betrachtet, ist festzustellen, dass die Blattfläche am größten war, wenn die höhere Lichtstärke von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ mit 3 % Zucker kombiniert waren. Man kann hier also zusammenfassend behaupten, dass der Verschluss bzw. ein hoher Belüftungsgrad einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung der Blattflächen hat.

Kozai und Kubota (2001) postulierten die Wichtigkeit eines ausreichenden CO_2 -Angebotes bei in vitro-Kulturen. Bei mehreren Pflanzenarten konnte bereits beobachtet werden, dass die Blattflächen größer ausfielen, wenn die Kulturen unter photoautotrophen Bedingungen etabliert wurden. Dieses Erkenntnis wurde in einem Versuch mit *Rhododendron* „Hatsuyuki“ von Valero-Aracama et al. (2001) bestätigt. So wurden unter photoautotrophen Kulturbedingungen mit hohem PPF und ausreichendem CO_2 -Angebot größere Blätter gebildet als bei der photomixotrophen Kontrollgruppe unter Standardbedingungen. Auch Mingozi et al. (2008) kamen in einem Versuch mit *Populus deltoides* zu diesem Ergebnis. In einem Versuch mit *Coffea arabusta* zeigten Nguyen et al. (2001), dass größere Blattflächen entwickelt wurden, wenn die in vitro-Kulturen unter hoher Lichtintensität und forcierter Belüftung etabliert wurden.

Ebenso wurde das Frischgewicht von Sprossen analysiert. Dabei ist aufgefallen, dass auch hier der Belüftungsgrad einen großen Einfluss hatte. Betrachtet man die Art des Verschlusses als alleinigen Einflussfaktor, ist feststellbar, dass Sprosse in Kulturen, die in Gefäßen mit Verschlüssen mit 2 Bohrungen etabliert wurden, das größte Frischgewicht erzielten, gefolgt von Gefäßen mit 1 Bohrung und normalen Verschlüssen. Ein verstärkter Gasaustausch schien also das Frischgewicht zu erhöhen. Bezieht man zusätzlich noch den Einflussfaktor Lichtintensität mit ein, zeigt sich, dass das Frischgewicht bei jenen Kulturen am höchsten war, die unter den Bedingungen $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 2 Belüftungslöcher etabliert wurden. Auch bei der Betrachtung der Lichtstärke als alleinigen Einflussfaktor stellt man fest, dass bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ein höheres Frischgewicht erreicht wurde als bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Der Einflussfaktor Saccharosegehalt im Medium allein betrachtet, brachte ein interessantes Ergebnis: Hier wurde das größte Frischgewicht auf saccharosefreiem Medium erzielt, gefolgt von 3 und 1 % Saccharosegehalt. Kombinierte man jedoch die beiden Faktoren Saccharosegehalt im Nährmedium und Art des Verschlusses, wurde das größte Frischgewicht in jener Versuchsreihe mit den Konditionen 3 % Zuckergehalt und 2 Belüftungslöchern erreicht. Bei der Betrachtung der Einflussfaktoren Saccharosegehalt kombiniert mit Lichtstärke zeigt sich, dass das Frischgewicht der Sprosse unter den Bedingungen 0 % Zucker und $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF am höchsten war. Zusammenfassend lässt sich behaupten, dass die Art des Verschlusses bzw. der Belüftungsgrad des Kulturgefäßes und die Lichtintensität, bei der die Kulturen etabliert wurden, einen großen Einfluss auf das Frischgewicht hatten: Es war umso höher, je höher der Belüftungsgrad und je höher die Lichtstärke war. Hingegen war der Einfluss der Saccharosekonzentration im Nährmedium auf das Frischgewicht der Sprosse weniger eindeutig.

Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Heo et al. (1999) in einem Versuch mit *Ipomoea batatas*. Sie testeten die Entwicklung der Kulturen auf zuckerfreiem Medium bei einer Lichtintensität von $150 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF, jedoch mit unterschiedlich starker Belüftung der Gefäße, wobei sich herausstellte, dass das Frischgewicht der Pflänzchen umso höher war, je höher der Belüftungsgrad des Kulturgefäßes war. Nguyen et al. (2001) zeigten, dass das Frischgewicht von *Coffea arabusta*-Pflänzchen höher war, wenn die Kulturen unter stark forcierter Belüftung entwickelt

wurden, unabhängig davon, ob hohe oder niedrige Lichtintensität verwendet wurde. Auch Valero-Aracama et al. (2001) kamen zum Ergebnis, dass eine stark forcierte Belüftung der Kulturgefäße zu höherem Frischgewicht von in vitro-Kulturen führt. In ihrem Versuch mit *Rhododendron* „Hatsuyuki“ zeigten sie, dass das größte Frischgewicht bei starker Belüftung erreicht wurde, wobei es bei Kulturen, die bei $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF etabliert wurden, größer war, als bei jenen unter $150 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF.

Ein anderer Parameter, der in der vorliegenden Arbeit zur Auswertung herangezogen wurde, war die Anzahl der Nodien pro Spross. Wie auch bei den beiden Parametern Blattfläche und Frischgewicht schienen die Art des Gefäßverschlusses bzw. die daraus resultierende unterschiedlich starke Belüftung einen großen Einfluss auf die Anzahl der Nodien auszuüben. Es bildeten sich bei Kulturen, die mit normalen Verschlüssen ohne Bohrung etabliert wurden, mehr Nodien aus als bei Einsatz von Verschlüssen mit 1 oder 2 Bohrungen. Beim Betrachten der Auswirkungen von Verschluss und Lichtintensität in Kombination zeigt sich, dass die meisten Nodien in jenen Kulturen gebildet wurden, die mit normalen Verschlüssen etabliert wurden, wobei hier die Kombination aus $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtstärke und normalem Verschluss an der Spitze stand. Betrachtet man die Lichtintensität als alleinigen Einflussfaktor, so kommt man zum Ergebnis, dass bei $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF mehr Nodien gebildet wurden als bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF. Kombiniert man die Faktoren Lichtintensität und Saccharosekonzentration und betrachtet deren Einfluss auf die Nodienzahl, so konnten in der Versuchsreihe mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Lichtintensität und zuckerfreiem Medium die meisten Nodien gezählt werden. Wenn man den Saccharosegehalt im Nährmedium als alleinigen Einflussfaktor heranzieht, wurden bei einer Konzentration von 1 % die meisten Nodien gebildet. Bezieht man jedoch die Art des Verschlusses als zweiten Einflussfaktor mit ein, so ist feststellbar, dass die Nodienzahl bei einer Kombination aus zuckerfreiem Medium und Verschluss mit 1 Bohrung am höchsten war. Zusammenfassend lässt sich behaupten, dass sich die meisten Nodien bei einer Lichtstärke von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in Gefäßen mit normalen Verschlüssen ohne

Bohrung, also mit relativ wenig Gasaustausch, und auf Nährmedien mit eher geringem Saccharosegehalt bildeten.

In der Literatur findet man ähnliche Ergebnisse, jedoch auch solche kontroverser Natur. Sha Valli Khan et al. (2002) beobachteten in ihren Untersuchungen an *Eucalyptus tereticornis*, dass sich unter photomixotrophen Kulturbedingungen (3 % Saccharose im Medium, $60 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF, normaler Verschluss) mehr Nodien pro Spross entwickelten als unter photoautotrophen Konditionen (zuckerfreies Medium, $125 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF, forcierte Belüftung). Hingegen zeigten Pruski et al. (2002), dass bei Etablierung auf zuckerhaltigem Medium und unter CO_2 -Anreicherung mehr Nodien gebildet wurden als auf zuckerfreiem Medium mit und ohne CO_2 -Anreicherung. Ähnlich sind auch die Ergebnisse von Shim et al. (2003). Sie verglichen die Auswirkung von zuckerhaltigen und zuckerfreien Medien jeweils mit und ohne forcierter Belüftung und konnten feststellen, dass die meisten Nodien bei jenen Kulturen gebildet wurden, die auf zuckerhaltigen Medien und unter forcierter Belüftung etabliert wurden. Auch Adelberg et al. (1999) kamen zum Ergebnis, dass die Nodienzahl umso höher war, je höher der Zuckergehalt, die Lichtintensität und der Belüftungsgrad der Kulturgefäße waren.

Ein weiterer Untersuchungsaspekt dieser Diplomarbeit war der Einfluss der Kulturbedingungen auf den Chlorophyllgehalt der Blätter. Die Messung erfolgte mit dem Chlorophyllmeter SPAD-502 der Firma Minolta, Japan (siehe Kap. 2.4., S. 9). Dieses Messgerät wurde auch schon in anderen Versuchen zur Messung des Chlorophyllgehaltes herangezogen (Cui et al., 2000; Tanaka et al., 2005; Teixeira da Silva et al., 2006). Die Lichtintensität schien einen großen Einfluss auf den Chlorophyllgehalt zu haben: Bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF war der Wert höher als bei 100. Bezieht man als zweiten Einflussfaktor die Saccharosekonzentration im Nährmedium mit ein, so wurde der höchste Wert bei jenen Kulturen gemessen, die unter den Konditionen $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 3 % Saccharose im Medium etabliert wurden. Betrachtet man den Saccharosegehalt als alleinigen Einflussfaktor, konnte der höchste Chlorophyllgehalt bei einer Konzentration von 3 % gemessen werden. Bezieht man zusätzlich noch den Verschluss mit ein, zeigt sich, dass der höchste Wert in den Versuchsreihen mit 3 % Zucker und Verschluss mit 1 Bohrung erreicht

wurde. Betrachtet man jedoch die Auswirkung des Verschlusses unabhängig von den anderen Einflussfaktoren, stellt man fest, dass der höchste Gehalt an Chlorophyll bei Kulturen mit Verschlüssen mit 2 Bohrungen gemessen werden konnte. Beim Betrachten der beiden Faktoren Verschluss und Lichtintensität in Kombination zeigt sich, dass der höchste Wert unter den Kulturbedingungen $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und Verschluss mit 2 Bohrungen erreicht wurde. Zusammenfassend lässt sich behaupten, dass der Chlorophyllgehalt bei geringerer Lichtintensität, kombiniert mit hohem Saccharosegehalt im Medium und guter Belüftung des Kulturgefäßes, am höchsten war.

Zu einem ähnlichen Ergebnis bezüglich der Auswirkung der Lichtintensität und der Belüftung der Kulturgefäße auf den Chlorophyllgehalt kamen Teixeira da Silva et al. (2005). In ihrem Versuch mit *Spatiphyllum* cv. Merry zeigten sie, dass der Chlorophyllgehalt bei einer niedrigeren Lichtintensität höher war als bei hohen PPF. Allerdings verwendeten sie für das Experiment spezielle gas- und lichtdurchlässige Kulturgefäße, was auch ein Grund für dieses Resultat sein könnte. Weiters kamen sie zum Ergebnis, dass der Chlorophyllgehalt durch forcierte Belüftung der Gefäße, also ausreichendes CO₂-Angebot, anstieg. Ein anderer Versuch bestätigte ebenfalls die Erhöhung des Chlorophyllgehaltes durch verstärkte Belüftung der Kulturgefäße bei *Rehmannia glutinosa*, es zeigte sich jedoch auch, dass der Chlorophyllgehalt mit steigender Lichtintensität zunahm und dass eine Erhöhung der Saccharosekonzentration nicht zu höheren Chlorophyllwerten führte (Cui et al., 2000). Ebenso konnte in einem Versuch mit *Limonium latifolium* eine verminderte Bildung von Chlorophyll festgestellt werden, wenn Saccharose im Nährmedium vorhanden war (Xiao und Kozai, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von unterschiedlichen Kulturbedingungen (Lichtintensität, Belüftung, Saccharosegehalt im Nährmedium) auf die Entwicklung von in vitro-Kulturen des Pappel-Hybrids 741 untersucht. Ein weiterer Ansatzpunkt für fortführende Versuche wäre die vermehrte Verwendung von Stecklingsexplantaten anstelle von Nodienexplantaten (siehe Kap. 2.1., S. 6). Dadurch, dass ein Blatt am Nodium vorhanden ist, wird es den Kulturen ermöglicht, von Beginn an auch auf zuckerfreiem Medium Photosynthese zu betreiben, was bei

Nodienexplantaten aufgrund des fehlenden Blattes nur eingeschränkt möglich ist (Kozai und Kubota, 2005). Dieser Explantattyp wird auch in der Literatur häufig für die Etablierung von photoautotrophen Kulturen verwendet (Zobayed et al., 1999; Tanaka et al., 2004; Xiao und Kozai, 2006).

Weiters sollte vor allem bei hoher Lichtintensität, verstärkter Belüftung der Kulturgefäße und wenig bzw. ohne Saccharose im Medium die Kulturperiode verkürzt werden, da solche Kulturen wesentlich schneller wachsen als konventionelle (Kozai, 2005). In der Literatur werden Versuche mit photoautotrophen in vitro-Kulturen ebenfalls meist über kürzere Zeitspannen durchgeführt (Afreen-Zobayed et al., 2000; Xiao und Kozai, 2004). Auch die Austestung des Einflusses verschiedener Nährmedien auf den Pappel-Hybrid 741 wäre von Interesse. In der Literatur werden für Versuche mit diversen Pappel-Hybriden einige Medien erwähnt, darunter das MS-Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962), welches in verschiedenen Konzentrationen erprobt wurde (Sellmer et al., 1989; Lu et al., 2001).

Neben Agar oder Gelrite® als Gelbildner im Nährmedium findet man in der Literatur auch Alternativen wie Vermiculit oder Florialite®. Der positive Einfluss dieser Stoffe auf das Wachstum und die Entwicklung von in vitro-Kulturen wird oft erwähnt (Kozai und Kubota, 2005; Xiao und Kozai, 2006), daher wäre ein Versuch mit diesen Trägermaterialien von Interesse.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der in vitro-Kultivierung einer *Populus*-Hybride. Pappeln sind schnell wachsende Holzpflanzen aus der Familie der Salicaceae. Verwendet werden Pappeln vor allem in der Holz- und Papierindustrie, jedoch sieht man sie aufgrund des raschen Wachstums auch als erneuerbaren Bioenergieträger der Zukunft. Da die Nachfrage ständig steigt, werden sie neben der herkömmlichen vegetativen Vermehrung auch über Gewebekultur vermehrt. Die konventionelle Mikrovermehrung hat jedoch auch Nachteile: Oft kommt es zu morphologischen und physiologischen Anomalien, die unter anderem die Ursache dafür sind, dass ein relativ großer Teil der Kulturen die heikle Phase der Akklimatisierung nicht überlebt. Dies kann durch photoautotrophe in vitro-Vermehrung umgangen werden, da bei dieser Methode solche Anomalien seltener auftreten und eine gesunde Pflanzenphysiologie gegeben ist.

Der Hauptaspekt der Untersuchungen lag in der Findung von optimalen Kulturbedingungen für die Etablierung einer photoautotrophen in vitro-Kultur des Pappel-Hybrids 741. Dabei wurde der Einfluss von Lichtintensität (100 oder 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF), Saccharosegehalt im Nährmedium (0, 1 oder 3 %) und Art des Verschlusses (keine, 1 oder 2 Bohrungen) bzw. der daraus resultierende Belüftungsgrad der Kulturgefäße auf die Entwicklung der Kulturen analysiert. Zur Auswertung wurden die fünf Parameter Blattanzahl pro Spross, Blattfläche, Frischgewicht und Nodienanzahl pro Spross und Chlorophyllgehalt der Blätter herangezogen.

Unter erhöhter Lichtintensität stiegen Blatt- und Nodienzahl, Blattfläche und Frischgewicht an. Hingegen nahm der Chlorophyllgehalt mit zunehmender Lichtstärke ab. Der Einfluss der unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium war weniger ausgeprägt: Bei Kulturen, die auf saccharosefreiem Medium etabliert wurden, konnten die höchste Blattzahl und das höchste Frischgewicht pro Spross erreicht werden. Die größten Blattflächen und Chlorophyllwerte resultierten hingegen aus der Verwendung der höchsten Zuckerkonzentration von 3 %. Außerdem wurde festgestellt, dass eine

Saccharosekonzentration von 1 % am besten geeignet war, um möglichst viele Nodien zu erhalten. Je besser die Belüftung der Kulturgefäße war, umso höher fielen auch Blattfläche, Frischgewicht und Chlorophyllgehalt aus. Bei den beiden Parametern Blattzahl und Nodienzahl pro Spross wurden jedoch die besten Ergebnisse dann erzielt, wenn normale Verschlüsse ohne Bohrungen verwendet wurden.

Tendenziell konnten erfolgsversprechende Ergebnisse für die Etablierung von photoautotrophen in vitro-Kulturen des Pappel-Hybrids 741 erzielt werden, vor allem bezüglich einer hohen Lichtintensität und verstärkter Belüftung der Kulturgefäße. Ein weiterführender Versuch mit Stecklingsexplantaten wäre empfehlenswert, da dann auch auf zuckerfreiem Medium von Beginn an Photosynthese möglich ist, wodurch man weitere Informationen bezüglich der Auswirkung der Saccharosekonzentration im Medium erhalten könnte.

6. Summary

The present study deals with the in vitro-cultivation of a *Populus* hybrid. Poplars are fast-growing woody plants belonging to the Salicaceae family. They are mainly used in the timber and paper industry, but are also considered as a renewable energy source in the future because of their fast-growing habit. The demand for poplars is continuously increasing, therefore they are nowadays propagated vegetatively but also through micropropagation. However, the conventional micropropagation has some disadvantages like abnormalities in morphology or physiology, which are the reason for the poor survival of plantlets during the sensible phase of acclimatization. This can be avoided through photoautotrophic in vitro-cultivation where those abnormalities rarely occur and the plants exhibit a healthy physiological status.

The main aspect of our investigations was the finding of suitable culture conditions for the establishment of a photoautotrophic in vitro-culture of the poplar-hybrid 741. Within this study the effect of light intensity (100 and 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF), sugar concentration in the culture medium (0, 1, or 3 %) and type of lid on the culture vessel (none, 1 or 2 holes) respectively the ventilation of the vessels on the development of the cultures was analyzed. Five parameters were used for the evaluation of the experiments: number of leaves per shoot, leaf area, fresh weight, number of nodes per shoot and chlorophyll content of the leaves.

When high light intensity was used, the number of leaves and nodes, leaf area and fresh weight increased. However, the chlorophyll content decreased with high PPF. The effect of the sucrose concentration in the culture medium was less pronounced. The most leaves and the highest fresh weight were measured in cultures which were established on sugar-free medium. The leaf area and also the amount of chlorophyll were highest when 3 % sucrose were used. The most nodes were formed in cultures established with medium containing 1 % sucrose. The more holes for air exchange were on the lid of the vessel, the higher leaf area, fresh weight and chlorophyll content could be measured. However, the highest number

of leaves and nodes per shoot was achieved when normal lids without any holes were used.

Tendentially promising results for the establishment of photoautotrophic in vitro-cultures of the poplar-hybrid 741 could be achieved, especially concerning a high light intensity and forced ventilation of the culture vessels. Further investigations using leafy nodal cuttings are recommended, because only then the ability to run photosynthesis from the beginning of the culture periode is given also on sugar-free medium. In this way some clarifying information concerning the effect of the sucrose concentration in the medium could be obtained.

7. Literaturverzeichnis

Adelberg J., Fujiwara K., Kirdmanee C., Kozai T. (1999), Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **57**: 95-104

Afreen F., Zobayed S.M.A., Kozai T. (2002), Photoautotrophic Culture of *Coffea arabusta* Somatic Embryos: Photosynthetic Ability and Growth of Different Stage Embryos, *Ann. Bot.* **90**: 11-19

Afreen F. (2005), Physiological and anatomical characteristics of in vitro photoautotrophic plants, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 61-90

Afreen-Zobayed F., Zobayed S.M.A., Kubota C., Kozai T., Hasegawa O. (2000), A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato, *Plant Sci.* **157**: 225-231

Chaturvedi H.C., Sharma A.K., Agha B.Q., Jain M., Sharma M. (2004), Production of cloned trees of *Populus deltoides* through in vitro regeneration of shoots from leaf, stem and root explants and their field cultivation, *Indian J. Biotechnol.* **2**: 203-208

Cui Y.Y., Hahn E.J., Kozai T., Paek K.Y. (2000), Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmania glutinosa* plantlets in vitro, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **62**: 219-226

Germaine K., Keogh E., Garcia-Cabellos G., Borremans B., van der Lelie D., Barac T., Oeyen L., Vangronsveld J., Porteous Moore F., Moore E.R.B., Campbell C.D., Ryan D., Dowling D.N. (2004), Colonisation of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes, *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 109-118

Hanak A.M., Dissertation, Univ. Wien, in Vorbereitung

Hazarika B.N., Parthasarathy V.A., Nagaraju V. (2003), Photoautotrophic micropropagation – a review, *Agric. Rev.* **24**: 152-156

Heo J., Wilson S.B., Kozai T. (1999), A Forced Ventilation Micropropagation System for Photoautotrophic Production of Sweetpotato Plug Plantlets in a Scaled-up Culture Vessel: I. Growth and Uniformity, Dissertation, Chungbuk National University

Kang B., Osburn L., Kopsell D., Tuskan G.A., Cheng Z.M. (2009), Micropropagation of *Populus trichocarpa* „Nisqually-1“: the genotype deriving the *Populus* reference genome, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **99**: 251-257

Konica Minolta (2009), Chlorophyll Meter SPAD-502 Instruction Manual, Konica Minolta, Tokyo

Kozai T. (2005), Introduction, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 61-90

Kozai T., Kubota C. (2001), Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants, *J. Plant Res.* **114**: 525-537

Kozai T., Kubota C. (2005), Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation and Transplant Production System, Springer Dordrecht, S. 19-30

Kozai T., Kubota C. (2005), in vitro aerial environments and their effects on growth and development of plants, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.),

Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 31-52

Kozai T., Kubota C. (2005), in vitro root zone environments and their effects on growth and development of plants, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 53-60

Kubota C. (2001), Concepts and background of photoautotrophic micropropagation, in Morohoshi N., Komamine A. (Hrsg.), Molecular Breeding of Woody Plants, Elsevier Science, Amsterdam, S. 325-334

Kubota C., Tadokoro N. (1999), Workshop on bioreactor technology - control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant **35**: 296-298

Kubota C., Afreen F., Zobayed S.M.A. (2005), Plant species successfully micropropagated photoautotrophically, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 243-266

Linsmaier E.M., Skoog F. (1965), Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures, *Physiol. Plantarum* **18**: 100-127

Lu S., Zhao H.Y., Wei J.H., Song Y.R. (2001) Establishment of in Vitro Regeneration System of Triploid Chinese White Poplar, *Acta Bot. Sin.* **43**: 435-437

Lubrano L. (1992), Micropropagation of Poplars (*Populus* spp.), in Bajaj Y.P.S. (Hrsg.), Biotechnology in Agriculture and Forestry 18, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 151-178

Mingozzi M., Montello P., Merkle S. (2008), Adventitious shoot regeneration from leaf explants of eastern cottonwood (*Populus deltoides*) cultured under photoautotrophic conditions, *Tree Physiol.* **29**: 333-343

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

Nguyen Q.T., Kozai T., Heo J., Thai D.X. (2001), Photoautotrophic growth response of in vitro cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched conditions, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **66**: 217-225

Pruski K., Astatkie T., Mirza M., Nowak J. (2002), Photoautotrophic micropropagation of Russet Burbank Potato, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **69**: 197-200

Sellmer J.C., McCown B.H., Haissig B.E. (1989), Shoot culture dynamics of six *Populus* clones, *Tree Physiol.* **5**: 219-227

Sha Valli Khan P.S., Kozai T., Nguyen Q.T., Kubota C., Dhawan V. (2002), Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **71**: 141-146

Shim S.W., Hahn E.J., Paek K.Y. (2003), In vitro and ex vitro growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in the culture media, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **75**: 57-62

Tanaka M., Giang D.T.T., Murakami A. (2005), Application of a novel disposable film culture system to photoautotrophic micropropagation of *Eucalyptus uro-grandis* (Urophylla x grandis), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **41**: 173-180

Teixeira da Silva J.A., Giang D.D.T., Tanaka M. (2006), Photoautotrophic micropropagation of *Spatiphyllum*, *Photosynthetica* **44**: 53-61

Ulrich K., Staubner T., Ewald D. (2008), *Paenibacillus* – a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **93**: 347-351

Valero-Aracama C., Zobayed S.M.A., Roy S.K., Kubota C., Kozai T. (2001), Photoautotrophic micropropagation of *Rhododendron*, in Morohoshi N., Komamine A. (Hrsg.), *Molecular Breeding of Woody Plants*, Elsevier, Amsterdam, S. 385-390

Verani S., Sperandio G., Picchio R., Spinelli R., Picchi G. (2008), *Field handbook – Poplar harvesting*, Working paper IPC/8, FAO, Rome (unpublished)

Weyens N., Boulet J., Adriaensen D., Timmermans J.P., Prinsen E., Van Oevelen S., D’Haen J., Smeets K., van der Lelie D., Taghavi S., Vangronsveld J. (2012), Contrasting colonization and plant growth promoting capacity between wild type and a *gfp*-derivative of the endophyte *Pseudomonas putida* W619 in hybrid poplar, *Plant Soil* **356**: 217-230

Xiao Y., Kozai T. (2004), Commercial Application of a Photoautotrophic Micropropagation System Using Large Vessels with Forced Ventilation: Plantlet Growth and Production Cost, *Hortscience* **39**: 1387-1391

Xiao Y., Kozai T. (2006), In vitro multiplication of static plantlets using sugar-free media, *Sci. Hortic.* **109**: 71-77

Xiao Y., Kozai T. (2006), Photoautotrophic Growth and Net Photosynthetic Rate of Sweet Potato Plantlets In Vitro as Affected by the Number of Air Exchanges of the Vessel and Type of Supporting Material, *Tsinghua Science and Technology* **11**: 481-489

Xiao Y., Li S., Zhang Y. (2011), A Photoautotrophic Micropropagation System Using Large Vessels with Forced Ventilation for Commercial Application, *Acta Hort.* **893**: 1081-1088

Yadav R., Arora P., Kumar D., Katyal D., Dilbaghi N., Chaudhury A. (2009), High frequency direct plant regeneration from leaf, internode, and root segments of Eastern Cottonwood (*Populus deltoides*), *Plant Biotechnol. Rep.* **3**: 175-182

Zobayed S.M.A., Afreen-Zobayed F., Kubota C., Kozai T. (1999), Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured in vitro under photoautotrophic and photomixotrophic conditions, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **35**: 183⁻¹⁸⁸

Zobayed S.M.A., Afreen-Zobayed F., Kubota C., Kozai T. (2000), Mass Propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a Scaled-up Vessel Under In Vitro Photoautotrophic Conditions, *Ann. Bot.* **85**: 587-592

Zobayed S.M.A., Afreen F., Kozai T. (2000), Quality biomass production via photoautotrophic micropropagation, *Acta Hort.* **530**: 377-386

Zobayed S.M.A., Afreen F., Kubota C., Kozai T. (2001), Large-scale photoautotrophic micropropagation in a scaled-up vessel, in Morohoshi N., Komamine A. (Hrsg.), *Molecular Breeding of Woody Plants*, Elsevier Science, Amsterdam, S. 345-354

Zobayed S.M.A., Afreen F., Xiao Y., Kozai T. (2004), Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **40**: 450-458

LEBENS LAUF



Persönliche Daten

Name: Patricia Schnur

Geburtsdatum: 20.07.1984

Bildungsweg

1990 – 1994	Volksschule Voralpe
1994 – 1998	Hauptschule Voralpe
1998 – 2003	HLW Hartberg
Okt 2003 – Aug 2004	Studium der Biologie, Universität Wien
Okt 2004 – Okt 2006	Lehre als PKA, St. Nikolaus Apotheke, 2333 Leopoldsdorf
Jan 2007 – Okt 2007	Angestellte, Brady Apotheke, 1010 Wien
Seit Okt 2007	Studium der Pharmazie, Universität Wien
März 2013 – Juli 2013	Durchführung der praktischen Arbeiten der Diplomarbeit, Department für Pharmakognosie, Universität Wien