



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Klonale Vermehrung einer Pappel-Hybride
unter photoautotrophen Bedingungen

verfasst von

Silvia Schuhleitner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch

Danksagung

Mein großer Dank geht an Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch, der mir dieses Thema zur Verfügung gestellt hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist. Weiters möchte ich mich bei ihm für die nette Betreuung und die Begutachtung meiner Diplomarbeit bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Mag. Florian Gössnitzer bedanken, der mir das praktische Arbeiten näher gebracht hat und immer gerne dazu bereit war, bei Fragen zu helfen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen beiden Kolleginnen Katrin Prenner und Narges Pachala für das gute Arbeitsklima während des praktischen Teils der Arbeit bedanken.

Die Zeit der Diplomarbeit wird mir durch die gute Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre in dieser Arbeitsgruppe in angenehmer Erinnerung bleiben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich sowohl seelisch als auch finanziell bei meinem Studium unterstützt haben und mir so meine Ausbildung ermöglicht haben. Sie sind hinter allen meinen Entscheidungen gestanden und haben mir den Rücken freigehalten, sodass ich mich voll meinem Studium widmen konnte.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Verwandten, meinem Freund und meinen Freunden für die Abwechslung danken, die sie mir zum Uni-Alltag geboten haben.

Abkürzungen

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden.....	8
2.1. Pflanzenmaterial.....	8
2.2. Nährmedien.....	8
2.3. Kulturbedingungen	9
2.4. Kulturauswertung	12
3. Ergebnisse	14
3.1. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Sprosslänge	14
3.2. Einfluss der Kulturbedingungen auf das Frischgewicht.....	19
3.3. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Nodienzahl	24
3.4. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Blattfläche	28
3.5. Einfluss der Kulturbedingungen auf den Chlorophyllgehalt	30
3.6. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Blattzahl	34
4. Diskussion	39
5. Zusammenfassung	51
6. Summary.....	53
7. Literaturverzeichnis	55
Lebenslauf	62

1. Einleitung und Problemstellung

Pappeln, lat. *Populus* sp., zählen zur Familie der Salicaceae. Aufgrund hoher Hybridisierungsraten ist eine systematische Einteilung dieser Gattung schwierig - laut der jüngsten Klassifikation umfasst *Populus* 29 Arten. Es handelt sich bei Pappeln um schnell wachsende Bäume, die über die nördliche Hemisphäre weit verbreitet sind. Sie sind sowohl im nördlichen Nadelwaldgürtel als auch in Auwäldern zu finden. Aufgrund ihres üppigen Wachstums, der großen Anpassungsfähigkeit an ihre Umgebung und der zahlreichen Verwendung in der Holz- und Papierindustrie zählen Vertreter der Gattung *Populus* mit zu den bedeutendsten Holzgewächsen (Hamzeh et al., 2004). Überdies sind Pappeln vielversprechende erneuerbare Energieträger der Zukunft. In dieser Eigenschaft werden sie zur Elektrizitätserzeugung und in Biomassetechnologien verwendet (Djomo et al., 2011).

Ein ganz anderer Aspekt sind die antioxidativen und antiinflammatorischen sowie die Herz und Leber schützenden Wirkungen von Extrakten aus *Populus nigra* Blütenknospen, welche in einer Studie von Debbache-Benaidia et al. (2013) bestätigt wurden. In der Traditionellen Chinesischen Medizin werden die männlichen Pappelblüten bei Diarrhö und entzündlichen Erkrankungen verwendet. Antiinflammatorische und analgetische Wirkungen eines wässrigen Extraktes aus Pappelblüten wurden bereits bestätigt (Xu et al., 2014). Kürzlich haben Wang et al. (2014) in Untersuchungen von Extrakten aus chinesischem Propolis und Extrakten von Pappelknospen (*Populus x canadensis* Moench) festgestellt, dass beide Extrakte gleiche chemische Komponenten wie zB. Quercetin, Kaempferol, Galangin, Phenolsäuren aufweisen, als freie Radikalfänger wirken und antiinflammatorische Eigenschaften besitzen. Dadurch könnten Extrakte aus Pappelknospen ein potentieller Ersatz für Propolis, das nur begrenzt zur Verfügung steht, zur Vorbeugung und Behandlung von entzündlichen Erkrankungen sein.

Aufgrund der steigenden wirtschaftlichen und wissenschaftlichen Bedeutung von Pappeln werden sie im Rahmen der verschiedensten Forschungsgebiete untersucht. Mithilfe der in vitro-Kultivierung können das ganze Jahr über genetisch identische Pflanzen zur Aufzucht oder zu Forschungszwecken kloniert werden. Im Bereich der Vermehrung ist die in vitro-Kultivierung eine der wichtigsten Techniken (Müller et al., 2013). Die größte Herausforderung auf diesem Gebiet ist die Optimierung der Protokolle für Holzpflanzen wie zum Beispiel der Pappel (McCown, 1997).

Bei der konventionellen in vitro-Kultivierung wird dem Nährmedium Saccharose als Kohlenstoffquelle zugesetzt. Weitere Kennzeichen für diese Art der Vermehrung sind eine hohe relative Luftfeuchte, eine hohe Ethylen-Konzentration im Gasraum, niedrige Lichtintensitäten, limitierte Belüftung und damit verbunden eine geringe CO₂-Konzentration im Kulturgefäß während der Lichtperiode. Durch diese großen Unterschiede zu ex vitro-Bedingungen ergeben sich einige Nachteile wie zum Beispiel nicht funktionsfähige Stomata, geringer Chlorophyllgehalt der Blätter, eine geringe Bewurzelungsrate und manchmal große Verluste bei der Akklimatisierung. Um diese Probleme zu lösen, wurde die photoautotrophe in vitro-Kultivierung etabliert (Kozai, 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam die photoautotrophe in vitro-Kultivierung zur Anwendung, die im Folgenden näher erläutert wird.

Photoautotrophe in vitro-Kultivierung

Mit Hilfe der photoautotrophen Gewebekultur können große Mengen qualitativ hochwertiger, genetisch identischer Pflanzen kultiviert werden, die hohe Photosynthese- und Wachstumsraten aufweisen und frei von Krankheitserregern sind (Kubota, 2001). Bislang wurden etwa 50 Pflanzenarten, darunter auch einige pharmazeutisch bedeutende Species wie z.B. *Hypericum perforatum*, photoautotroph vermehrt (Xiao et al., 2011).

Die photoautotrophe in vitro-Kultivierung ermöglicht im Gegensatz zur konventionellen Methode eine wesentliche Vereinfachung des Kultursystems. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, wird in der konventionellen Gewebekultur der Kulturablauf in vier Schritte eingeteilt. Durch die Verwendung von Explantaten mit einem Blatt, die bereits fähig sind, Photosynthese zu betreiben, werden die Schritte der Vermehrung und Bewurzelung im Rahmen der photoautotrophen in vitro-Kultivierung auf einen Schritt reduziert. Da die Pflanzen in einer ähnlichen Umgebung wie ex vitro wachsen, kann auch meist auf den Akklimatisierungsschritt verzichtet werden (Kubota, 2001).

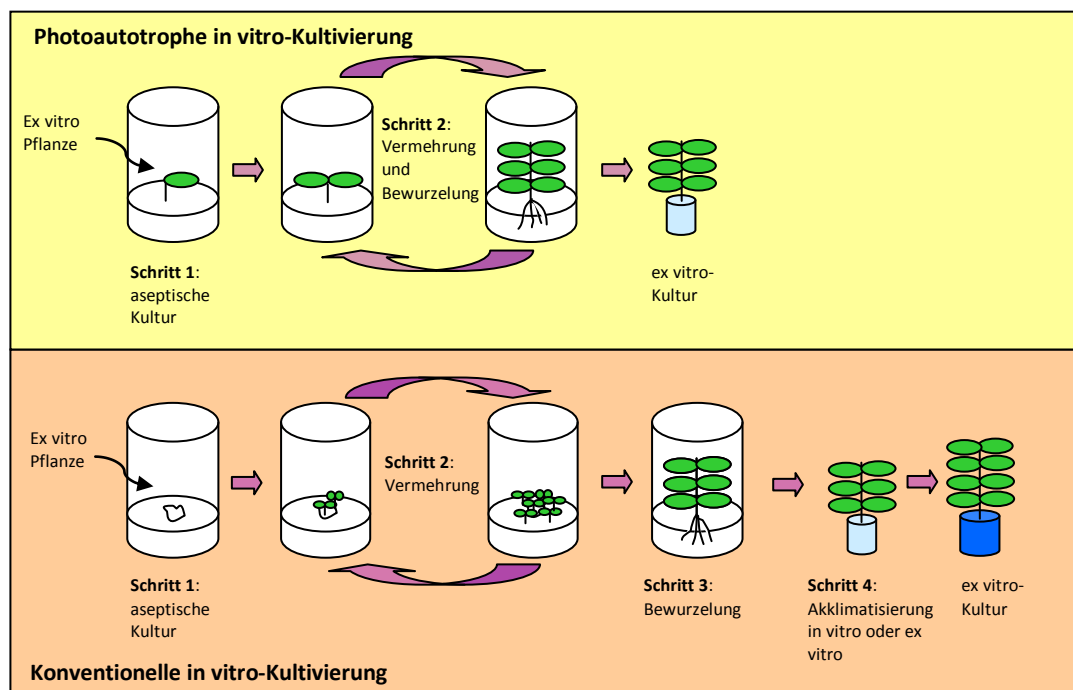


Abbildung 1 Gegenüberstellung der Kulturabläufe bei photoautotropher und konventioneller in vitro-Kultivierung (modifiziert nach Kozai und Kubota, 2005b)

Das wichtigste Kennzeichen der photoautotrophen in vitro-Kultivierung ist die Verwendung eines saccharosefreien Nährmediums. Erstmals ist es Kozai et al. (1988) in ihren Versuchen mit *Solanum tuberosum* gelungen, Pflanzen auf zuckerfreiem Nährmedium zu vermehren. Die Photosynthese ist hier der einzige Weg zur Energiegewinnung. Um diese zu ermöglichen, sind eine gute Belüftung der Gefäße, eine erhöhte CO₂-Zufuhr und eine starke Lichtquelle mit einer Lichtintensität von

100-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF (photosynthetic photon flux; photosynthetisch aktive Strahlung) oder höher essentiell (Kubota, 2001).

Weil keine Saccharose im Nährmedium vorhanden ist, müssen sich die Explantate ohne exogene Zufuhr organischer Nährstoffe entwickeln. Der große Vorteil von saccharosefreiem Medium ist, dass weniger Kontaminationen mit Mikroorganismen auftreten (Kubota, 2001).

Die meisten chlorophyllhaltigen Pflanzen können photoautotroph wachsen. Dazu ist es aber notwendig, die Lichtintensität als auch die CO_2 -Konzentration im Kulturgefäß zu erhöhen. Denn lässt man nur die Saccharose im Nährmedium weg, wäre keine Steigerung des Wachstums möglich (Xiao et al., 2011). Lucchesini et al. (2006) haben bei Versuchen mit *Myrtus communis* gezeigt, dass ein zu geringes CO_2 -Angebot während der Lichtperiode die Photosyntheserate deutlich senkt. Bei konventionellen Gewebekulturen sind ein linearer Anstieg der CO_2 -Konzentration während der Dunkelperiode und ein schneller Abfall mit Einsetzen der Lichtperiode zu bemerken. Diese Beobachtung bestätigt, dass die Pflanzen in vitro Photosynthese betreiben können. Allerdings müssen die Pflanzen bei konventioneller in vitro-Kultivierung aufgrund des geringen CO_2 -Gehaltes im Kulturgefäß auch die Saccharose im Nährmedium als Energiequelle nützen. Unter photoautotrophen Bedingungen ist deshalb eine gute Belüftung der Kulturgefäße erforderlich, um eine höhere CO_2 -Konzentration aufrechtzuerhalten (Kubota, 2001). Die verbesserte Belüftung unter keimfreien Bedingungen ist dabei eine der großen technologischen Herausforderungen (Xiao et al., 2011).

Ein luftdichtes Verschließen der Kulturgefäße ist nicht möglich, da zwischen Gefäß und Verschluss, Dichtungsbändern und dergleichen immer kleine Spalten und Fugen bleiben, durch die ein natürlicher Luftaustausch möglich ist (Kubota, 2001). Die natürliche Belüftung der Gefäße hängt von Druck- und Temperaturunterschieden, Gasgradienten innerhalb und außerhalb des Kulturgefäßes und von der Geschwindigkeit ab, mit der sich die Luft außerhalb der Kulturgefäße bewegt (Xiao et al., 2011).

Eine forcierte Belüftung der Kulturgefäße kann beispielsweise durch die Verwendung von Deckeln mit gasdurchlässigen Filtern erreicht werden (Kubota, 2001). Dadurch wird die CO₂-Konzentration im Gefäß erhöht und die relative Luftfeuchte gesenkt. Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung von Luftpumpen dar, die durch einen luftdurchlässigen Membranfilter ein definiertes Gasgemisch direkt in das Kulturgefäß leiten (Xiao et al., 2011). Xiao und Kozai (2004) etablierten ein System zur photoautotrophen in vitro-Kultivierung von *Zantedeschia elliottiana*. Sie verwendeten für ihre Versuche große Kulturgefäße mit forcierter Belüftung und erhöhtem CO₂-Angebot. Im Vergleich zur konventionellen in vitro-Vermehrung von *Z. elliottiana* war bei der photoautotrophen Kultivierung die Kulturdauer um die Hälfte kürzer, es überlebten wesentlich mehr Pflanzen den Akklimatisierungsschritt und die Produktionskosten konnten um fast die Hälfte gesenkt werden. Um die CO₂-Konzentration im Kulturgefäß zu erhöhen, können auch chemische Substanzen verwendet werden (Hazarika et al., 2003).

Der zweite wichtige Faktor für die Photosynthese in vitro ist eine hohe Lichtintensität. Laut Kozai und Kubota (2005a) ist der Wellenlängenbereich von 400-700 nm von Bedeutung, da in diesem Bereich Photosynthese betrieben wird. Daher wird Strahlung innerhalb dieser Wellenlängen auch als photosynthetisch aktive Strahlung (PAS) bezeichnet. Weil bei der photoautotrophen in vitro-Kultivierung kein Zucker im Nährmedium vorhanden ist, ist die Pflanze auf Licht als Energiequelle angewiesen, um organische Stoffe zu produzieren, die sie später für zelluläre Prozesse verwenden kann. Deshalb werden bei dieser Art der Kultivierung viel höhere Lichtstärken verwendet als bei der konventionellen Methode (Afreeen, 2005). Zhang et al. (2009) kultivierten eine in der Traditionellen Chinesischen Medizin verwendete Pflanze, *Momordica grosvenori*, sowohl unter photoautotrophen als auch konventionellen Bedingungen. Bei den photoautotrophen Kulturen wurden Lichtstärken von 25-200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei höheren Lichtintensitäten auch das Frischgewicht der Pflanzen steigt. Außerdem können sich bei höheren Lichtstärken photoautotroph kultivierte Pflanzen ex vitro besser an das natürliche Sonnenlicht anpassen.

Zusammenfassend seien an dieser Stelle kurz die wichtigsten Vorteile der photoautotrophen in vitro-Kultur gegenüber der konventionellen Vorgangsweise erwähnt:

- + verbesserte Wachstumsraten unter hohen Lichtintensitäten und hohen CO₂-Konzentrationen (Hazarika et al., 2003)
- + weniger physiologische oder morphologische Fehlbildungen (Hazarika et al., 2003)
- + größere Kulturgefäße können verwendet werden (Hazarika et al., 2003)
- + bessere Bewurzelung und leichtere Akklimation (Hazarika et al., 2003)
- + weniger Kontamination mit Mikroorganismen wegen Verwendung eines Nährmediums ohne Saccharose (Kubota, 2001)
- + hohe Überlebensrate ex vitro aufgrund funktionsfähiger Stomata (Kubota, 2001)
- + erhöhte jährliche Pflanzenproduktion (Xiao et al., 2011)
- + reduzierte Laborkosten (Xiao et al., 2011)

Nichtsdestotrotz erfordert die Aufrechterhaltung der entsprechenden in vitro-Bedingungen großes technisches Fachwissen und die Anwendung komplexer Techniken. Fortschritte in der photoautotrophen in vitro-Kultivierung sind nur dann möglich, wenn der Zusammenhang zwischen der Pflanzenphysiologie in vitro, den Kulturbedingungen, der ex vitro Umwelt und den Kulturgefäßen verstanden wird. Hohe Kosten für Beleuchtung, CO₂-Anreicherung und Kühlung werden oft als Nachteil der photoautotrophen in vitro-Gewebekultur angesehen (Kozai und Kubota, 2005b).

Schnur (2013) konnte in ihren Versuchen mit dem Pappel-Hybrid 741 zeigen, dass eine Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF eine größere Blattfläche, höheres Frischgewicht sowie eine höhere Nodien- und Blattzahl zur Folge hatte als eine Strahlung von 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF. Weiters konnten bei einer besseren Belüftung der Kulturgefäße durch die Verwendung von Verschlüssen mit 2 Bohrungen Blattfläche, Frischgewicht und Chlorophyllgehalt gesteigert werden. Die Auswirkungen von verschiedenen Zuckerkonzentrationen im Medium waren nicht so stark ausgeprägt.

Gindler (Diplomarbeit in Vorbereitung) konnte in ihrer Arbeit ebenfalls nachweisen, dass der Pappel-Hybrid 741 bei einer besseren Belüftung der Kulturgefäße durch Verwendung eines Membrandeckels ein besseres Wachstum zeigt. Eine erhöhte Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF hatte ein höheres Frischgewicht sowie größere Blätter zur Folge. Die Saccharosekonzentration hatte unter den obigen Bedingungen weniger Einfluss auf das Pappelwachstum, sehr wohl zeigten sich hingegen bei einem erhöhten CO_2 -Partialdruck von 2 % Auswirkungen auf das Wachstum der Pflanzen.

Aufbauend auf den Arbeiten von Schnur (2013) und Gindler (Diplomarbeit in Vorbereitung) sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von verschiedenen Saccharosekonzentrationen im Nährmedium, höheren Lichtintensitäten und einem erhöhten CO_2 -Angebot im Kulturgefäß auf photoautotrophe in vitro-Kulturen des Pappel-Hybrids 741 untersucht werden. Nach einer Kulturdauer von 8 Wochen sollten Sprosslänge, Frischgewicht, Nodienzahl, Blattzahl, Blattfläche und der Chlorophyllgehalt der Blätter ermittelt werden, um so das Pappelwachstum beurteilen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen Explantate der Pappel-Hybride 741 zur Anwendung. Diese in China gezüchtete Hybride ist eine Kreuzung aus (*Populus alba* x (*P. davidiana* + *P. simonii*) x *P. tomentosa*). Die Pappelkulturen wurden vom Department für Ökogenomik und Systembiologie, Universität Wien, übernommen und dem Department für Pharmakognosie, Universität Wien, für Versuche zur Verfügung gestellt.

Die Sprossachsen wurden unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow in Segmente mit einem Nodium geschnitten. Jedes Nodienexplantat wurde mit dem darauf sitzenden Blatt verwendet, wobei darauf geachtet wurde, dass die Blätter in etwa gleich groß waren.

2.2. Nährmedien

Als Nährmedium diente $\frac{1}{2}$ LS-Medium, das auf der Formulierung von Linsmaier und Skoog (1965) basiert und halbkonzentriert verwendet wurde. Den Medien wurde Saccharose in Form von handelsüblichem Haushaltszucker in vier verschiedenen Konzentrationen (0, 10, 20 oder $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) zugesetzt.

Zur Herstellung der Medien wurde die jeweilige Menge Fertigmischung des LS-Mediums (Duchefa Biochemie) abgewogen und am Magnetrührer in destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Saccharose in den entsprechenden Mengen hinzugegeben und gelöst. Danach wurden portionsweise $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Gelrite® (Carl Roth GmbH + Co. KG) bis zum Erhalt einer homogenen Suspension beigemischt. Zum Schluss wurde mit destilliertem Wasser auf das

gewünschte Volumen aufgefüllt und der pH-Wert mit Hilfe von HCl oder KOH auf $\text{pH } 5,70 \pm 0,1$ eingestellt. Die gesamte Herstellung erfolgte am Magnetrührer, um etwaiges Verklumpen oder Absetzen der Bestandteile zu vermeiden.

Jedes Kulturgefäß (vgl. Kap. 2.3.) wurde mit 40 ml Nährmedium gefüllt und nach dem Verschließen im Autoklaven für 20 Minuten bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ sterilisiert. Im Anschluss an das Abkühlen wurden die Gefäße im Kühlraum bei $5 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ dunkel gelagert und einen Tag vor der Verwendung wieder bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.3. Kulturbedingungen

Als Kulturgefäße kamen Babynahrungsgläser der Firma Hipp® (Höhe 12,5 cm; Durchmesser 5,5 cm) mit 40 ml Medium zum Einsatz. Jedes Kulturgefäß wurde unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow mit je 4 Nodienexplantaten beimpft. Um eine für die photoautotrophe in vitro-Kultivierung notwendige erhöhte Ventilation der Gläser zu erreichen, wurden sie mit Magenta®B-Caps, die eine Bohrung von 8 mm Durchmesser aufwiesen, verschlossen. Die Bohrung wurde an der Außenseite des Verschlusses mit Membranfilterscheiben (Porenweite $0,04\text{ }\mu\text{m}$; Sun Biofilter, Mitomi Industrial Corporation, Japan) versehen, um die Möglichkeit einer Kontamination so gering wie möglich zu halten. Zusätzlich wurde der Spalt zwischen den Caps und den Gläsern mit Parafilm®M verschlossen.

Anschließend wurden die Kulturen auf drei Heraeus®-Klimaschränke mit unterschiedlichen Lichtintensitäten ($40, 100$ und $200\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF) aufgeteilt. In jeden Klimaschrank platzierten wir pro Saccharosekonzentration 10 Gläser, wobei diese wiederum auf zwei unterschiedliche CO_2 -Konzentrationen (0 und 5%) aufgeteilt wurden.

Somit wurden für jede Kombination von Saccharosegehalt, CO_2 -Konzentration und Lichtintensität 5 Kulturgefäße mit je 4 Explantaten kultiviert.

Unter 0 % CO₂-Konzentration wird im Folgenden immer die atmosphärische CO₂-Konzentration von 0,039 % verstanden. Die CO₂-Konzentration von 5 % wurde mit Hilfe eines Puffers erreicht: Laut Warburg (1962) lässt sich bei 20 °C und darüber mit 3 M Gemischen von KHCO₃ und K₂CO₃ ein konstanter CO₂-Partialdruck im Gasraum über dem Puffer einstellen. Durch die Pufferlösung entsteht CO₂, welches in den Gasraum entweicht. Das CO₂ im Gasraum steht im Gleichgewicht mit der Kohlensäure in der Pufferlösung. Wird durch die Photosynthese CO₂ aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt, wird es permanent vom Puffer nachgebildet. Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurde ein Gemisch aus 170 ml 3 M KHCO₃ und 30 ml K₂CO₃ verwendet. Der Puffer wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

Zur gleichzeitigen Aufrechterhaltung der Atmosphäre von 5 bzw. 0 % CO₂ innerhalb eines Heraeus®-Schranks war ein Kultursystem für erhöhten CO₂ Partialdruck erforderlich. Dazu wurden handelsübliche Aquarien (L 60 x B 30 x H 30 cm) eingesetzt, welche wie in Abbildung 2 (S. 11) ersichtlich umgedreht auf einem hölzernen Podest platziert wurden. Der Puffer und ein kleines Magnetrührstäbchen wurden immer in einer Kristallisierschale in das Aquarium gestellt. Um den flüssigen Puffer ständig in Bewegung zu halten, wurde ein Magnetrührer außerhalb des Aquariums genau unter der Kristallisierschale angebracht. Die Holzplatte zwischen Rührer und Schale hatte den Vorteil, dass eine mögliche Wärmeentwicklung des Magnetrührers durch dessen Motor nicht auf den Puffer übertragen werden und eventuell zum Auskristallisieren der Salze führen konnte. Ein kleiner Ventilator neben der Kristallisierschale stellte eine ausreichende Luftdurchmischung im Aquarium sicher.

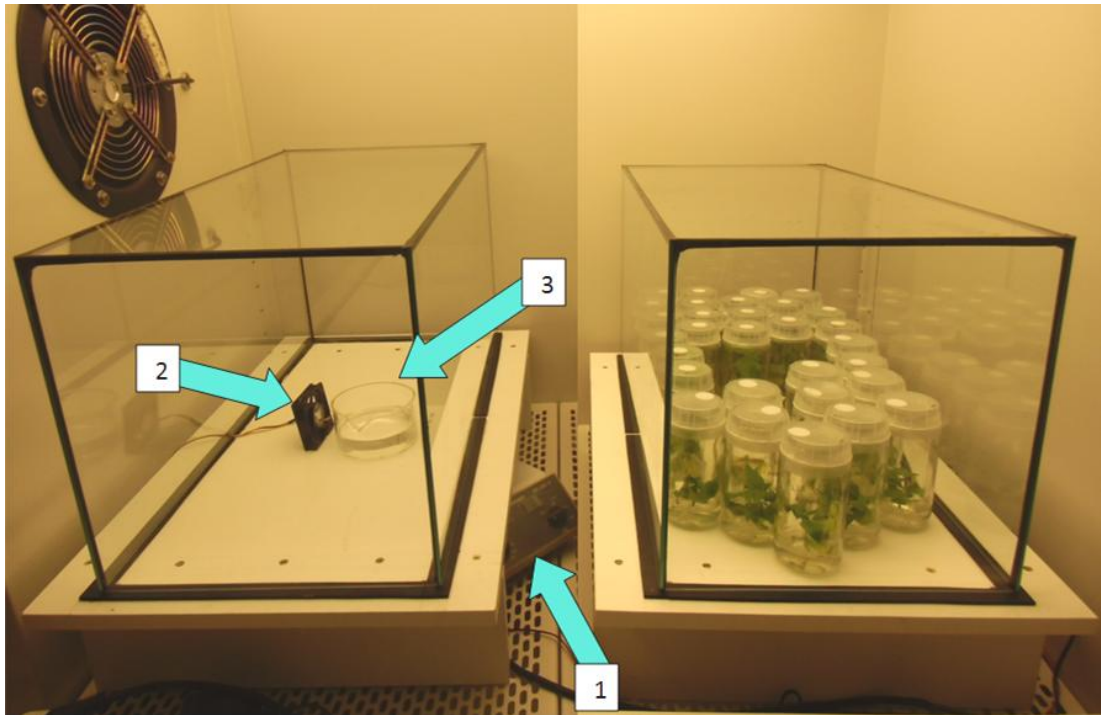


Abbildung 2 links: Kultursystem für erhöhten CO₂ Partialdruck (1) Magnetrührer, (2) Ventilator, (3) Kristallisierschale mit Puffer und Magnetrührstäbchen; rechts: Aquarium mit Kulturen

Alle Kulturen wurden acht Wochen lang in Heraeus®-Schränken bei einer Lichtintensität von 40, 100 oder 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF, einer 16 stündigen Lichtperiode und einer Temperatur von 25 ± 1 °C inkubiert.

2.4. Kulturauswertung

Während der 8 wöchigen Versuchsdauer wurden die Kulturen wöchentlich fotografiert und kontrolliert.

Am Ende der Kulturperiode erfolgte die Auswertung unter sterilen Bedingungen im Laminar flow, da die neu gebildeten Nodien sofort zur weiteren Vermehrung auf frisches $\frac{1}{2}$ LS Medium mit 20 g l^{-1} Saccharose überführt wurden. Von jedem neu gewachsenen Spross wurden die folgenden Daten erhoben:

- **Sprosslänge**

Nachdem der neu gebildete Spross vom ursprünglichen Explantat und den Wurzeln getrennt wurde, ermittelten wir die Sprosslänge.

- **Frischgewicht**

Dazu wurde der Spross ohne Wurzeln, aber mit den Blättern abgewogen.

- **Blattzahl pro Spross**

Die Blätter wurden möglichst knapp an der Blattspreite vom Stiel abgetrennt und deren Anzahl notiert.

- **Blattfläche**

Um die Blattflächen mit der Software Image J® (National Institute of Health, USA) vermessen zu können, mussten die Blätter zunächst in der Reihenfolge, in der sie am Spross gewachsen waren, in einer durchsichtigen Folie eingescannt werden. Umknicken der Blätter wurde dabei soweit wie möglich vermieden.

- **Chlorophyllgehalt der Blätter**

Mit Hilfe eines Handmessgerätes, dem Chlorophyllmeter SPAD-502 (Konica Minolta, Japan), wurde der Chlorophyllgehalt der Blätter in SPAD-Units ermittelt. Diese Einheit wurde vom Gerätehersteller festgelegt und

korreliert mit dem tatsächlichen Chlorophyllgehalt. Die Absorption von Licht durch das Chlorophyll wird bei 2 verschiedenen Wellenlängen (650 und 940 nm) ermittelt. Das Gerät berechnet dann aus den erhaltenen Werten die SPAD-Units (Konica Minolta, 2009). Pro Blatt wurde an 5 verschiedenen Stellen gemessen und der Durchschnittswert notiert. Die Messung des Chlorophyllgehaltes wurde durchgeführt, als sich die Blätter noch in der Folie befanden (siehe oben). Da sich die Werte mit Folie und ohne Folie unterscheiden, wurde von 25 Blättern aus in vitro-Pappelkulturen der Mittelwert ohne und mit Folie gemessen. Da der Wert ohne Folie um 0,128 größer war als der Wert mit Folie, wurde bei der Auswertung der Versuche von den ermittelten Chlorophyllwerten 0,128 subtrahiert.

- **Nodienzahl pro Spross**

Die neu gebildeten Nodien wurden gezählt und deren Anzahl notiert.

Mit dem Programm Statistica® (StatSoft Inc., USA, Version 6.1) wurden die erhaltenen Daten statistisch aufbereitet. Dabei wurden der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet und mehrfaktorielle Varianzanalysen (Signifikanzniveau 0,05) durchgeführt. Weiters kam der multiple Spannweitentest nach Duncan beim Analysieren der Daten zum Einsatz.

3. Ergebnisse

In den folgenden Unterkapiteln wird auf den Einfluss von Lichtintensität, Saccharosekonzentration im Nährmedium und CO₂-Gehalt der Atmosphäre auf die Sprosslänge, das Frischgewicht, die Nodienzahl pro Spross, die Blattfläche, den Chlorophyllgehalt der Blätter und die Blattzahl pro Spross eingegangen.

In jedem Unterkapitel werden zu Beginn die Auswirkungen der unterschiedlichen Lichtintensitäten (40, 100 und 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF) in Kombination mit den verschiedenen Saccharosekonzentrationen (0, 10, 20 oder 30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) zunächst bei 5 % CO₂ und dann bei 0 % CO₂ beschrieben. In weiterer Folge wird der Einfluss der beiden CO₂-Konzentrationen in Kombination mit dem unterschiedlichen Saccharosegehalt im Nährmedium bei jeder der drei Lichtintensitäten näher betrachtet.

Im ersten Unterkapitel werden die Auswirkungen der Kulturbedingungen auf die Sprosslänge beschrieben. Die Sprosslänge ist vor allem für die weitere in vitro-Vermehrung von Bedeutung: Je kürzer ein Spross ist, umso enger liegen die Nodien beieinander und können so nur mehr schwer geschnitten werden. Deshalb ist ein langer Spross mit vielen Nodien wünschenswert.

3.1. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Sprosslänge

Betrachtet man, wie in Abbildung 3 (S. 15) dargestellt, den Einfluss der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 5 % CO₂ auf die durchschnittliche Sprosslänge, so ist festzustellen, dass die Sprosse ohne Saccharose im Medium und bei einer Lichtstärke von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF mit 8,60 cm am längsten waren, während sie bei derselben Lichtintensität und dem höchsten Gehalt an Saccharose im Nährmedium (3 %) am kürzesten waren. Die erstgenannte Gruppe mit den längsten Sprossen unterschied sich von allen anderen bei 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF signifikant. Unter den beiden anderen Lichtstärken (40 und 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF) hatte der Zuckergehalt im Medium keinen nennenswerten Einfluss auf die Sprosslänge. Inner-

halb der einzelnen Gruppen mit gleicher Saccharosekonzentration waren die Auswirkungen der Lichtintensitäten nicht signifikant.

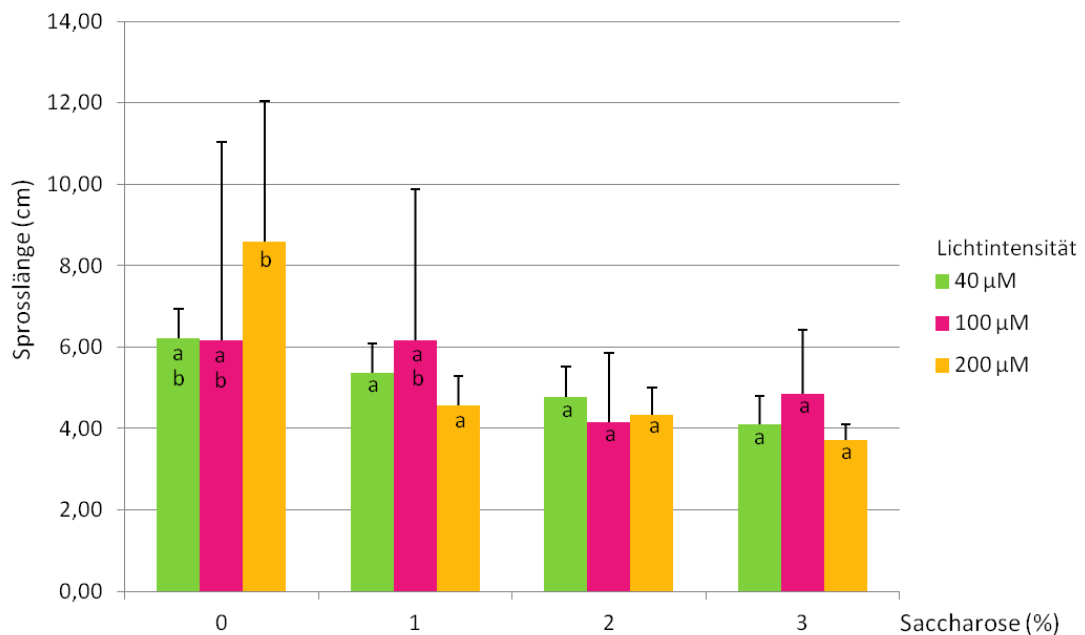


Abbildung 3 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 5 % CO₂ auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Vergleicht man den Einfluss von Lichtstärke und Saccharosekonzentration bei 0 % CO₂ auf die Sprosslänge, waren die Sprosse bei einer Lichtintensität von 200 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF und 0 % Saccharose im Nährmedium mit 8,53 cm am längsten (siehe Abbildung 4, S. 16). Diese Sprosse unterschieden sich von jenen signifikant, die bei der gleichen Lichtstärke und 2 % oder 3 % Saccharose gewachsen waren. Auch bei 100 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF bzw. 40 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF waren die Sprosse bei Abwesenheit von Zucker im Nährmedium signifikant länger als bei 2 oder 3 % Saccharose. Bei 1 % Saccharose rangierten die Sprosse im Hinblick auf die Länge im Mittelfeld, unterschieden sich jedoch nicht signifikant von den anderen Gruppen. Die Lichtintensitäten hatten bei gegebener Saccharosekonzentration keinen Einfluss auf das Längenwachstum der Sprosse.

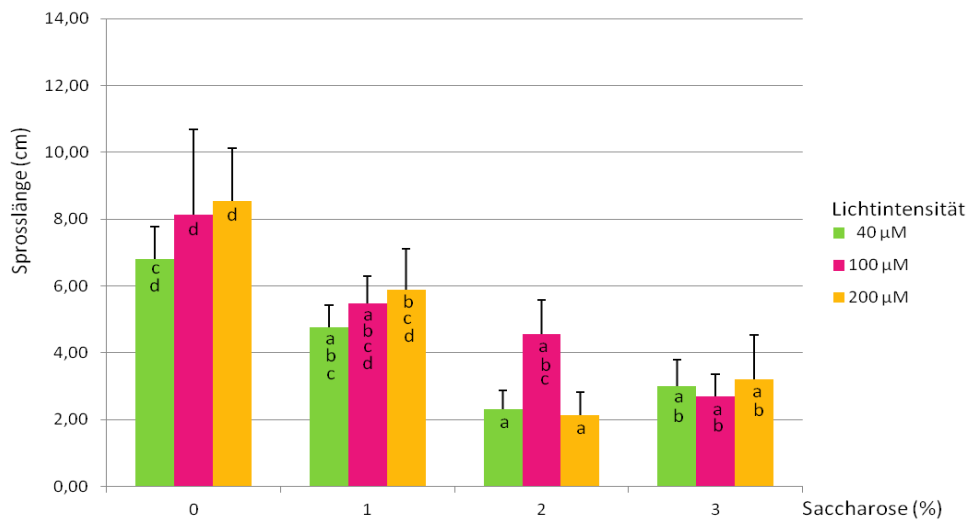


Abbildung 4 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 0 % CO₂ auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Werden die Auswirkungen der unterschiedlichen Saccharose- und CO₂-Konzentrationen bei einer Lichtintensität von 40 μM·m⁻²·s⁻¹ PPF unabhängig von den beiden anderen Lichtstärken verglichen (siehe Abbildung 5, S. 17), ist zu bemerken, dass bei 5 % CO₂ und steigender Saccharosekonzentration die Sprosslänge tendenziell abgenommen hat. Ohne Saccharose wurden mit 6,80 cm die längsten und bei 2 % Saccharose mit 2,31 cm die kürzesten Sprosse unter 0 % CO₂ gemessen. Diese beiden Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander. Nur bei 2 % Saccharose waren die Sprosse bei 5 % CO₂ signifikant länger als bei 0 %. Bei den anderen Zuckerkonzentrationen hatten die CO₂-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Sprosslänge.

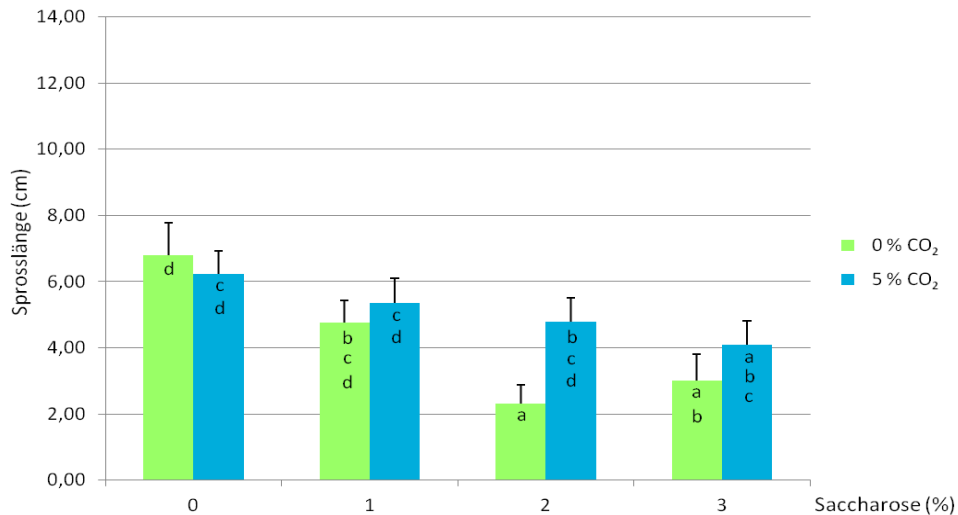


Abbildung 5 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Betrachtet man den Einfluss der unterschiedlichen Saccharose- und CO₂-Konzentrationen unter $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF unabhängig von den beiden anderen Lichtintensitäten (siehe Abbildung 6, S. 18), erkennt man, dass die Sprosslängen bei 0 % CO₂ mit zunehmender Saccharosekonzentration trendmäßig abnahmen, wobei nur jene mit 0 % Zucker im Nährmedium signifikant länger waren (8,14 cm) als die kürzesten mit 2,69 cm bei 3 % Saccharose. Bei 5 % CO₂ war kein Unterschied zwischen den Saccharosekonzentrationen bezüglich der Wachstumsförderung zu verzeichnen. Vergleicht man die beiden CO₂-Konzentrationen bei jedem einzelnen Saccharosegehalt, so war ebenfalls kein bedeutender Einfluss der CO₂-Gehalte auf das Längenwachstum der Sprosse festzustellen.

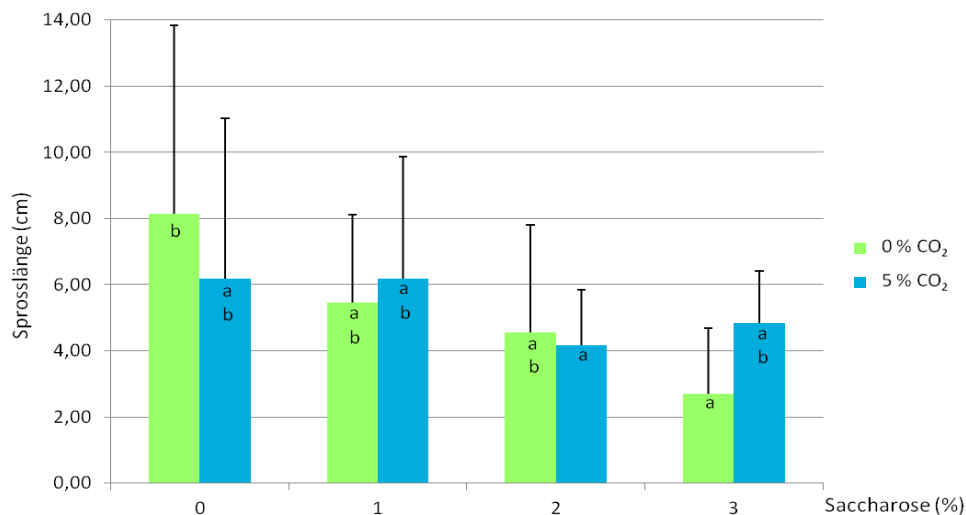


Abbildung 6 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Wie in Abbildung 7 dargestellt wird, waren bei näherer Betrachtung der Sprosslängen unter $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF unabhängig von den beiden anderen Lichtintensitäten bei beiden CO₂-Konzentrationen und ohne Saccharose im Nährmedium die Sprosse mit 8,53 und 8,60 cm signifikant länger als auf zuckerhaltigem Medium. Innerhalb der einzelnen Saccharosekonzentrationen zeigte der CO₂-Gehalt keinen signifikanten Einfluss auf das Längenwachstum der Sprosse.

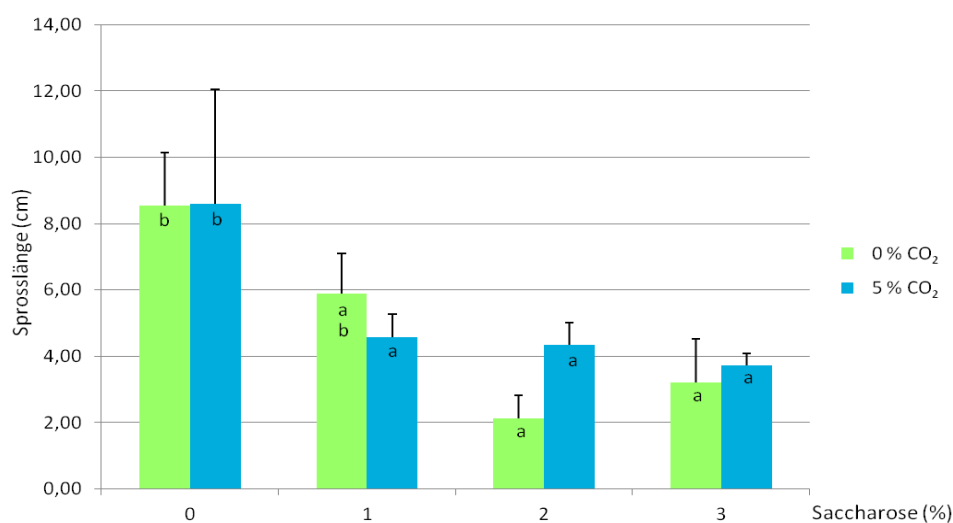


Abbildung 7 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Das folgende Unterkapitel beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Kulturbedingungen auf das Frischgewicht, welches ein Maß für das Wachstum der Kulturen ist.

3.2. Einfluss der Kulturbedingungen auf das Frischgewicht

Die Betrachtung der Auswirkungen der unterschiedlichen Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 5 % CO₂ auf das Frischgewicht zeigt deutlich, dass das Frischgewicht mit 0,64 g bei 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und ohne Saccharose im Nährmedium am höchsten war, gefolgt von 0,47 g bei 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 1 % Saccharose (siehe Abbildung 8, S. 20). Der höchste Wert unterschied sich zwar nicht vom zweithöchsten, aber von allen anderen Werten signifikant. Das Frischgewicht war unter einer Lichtintensität von 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF bei allen Saccharosekonzentrationen am geringsten. Bei einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF hatte keine der vier Zuckerkonzentrationen einen Einfluss auf das Frischgewicht. Hingegen unterschieden sich die Werte bei 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 0 % Saccharose im Medium im Vergleich zu den anderen Saccharosekonzentrationen bei gleicher Lichtintensität signifikant. Nur ohne Saccharose im Nährmedium war das Frischgewicht bei 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF signifikant höher als bei den beiden anderen Lichtintensitäten. Bei einer Saccharosekonzentration von 1, 2 und 3 % hatte keine der Lichtintensitäten einen Einfluss auf das Frischgewicht.

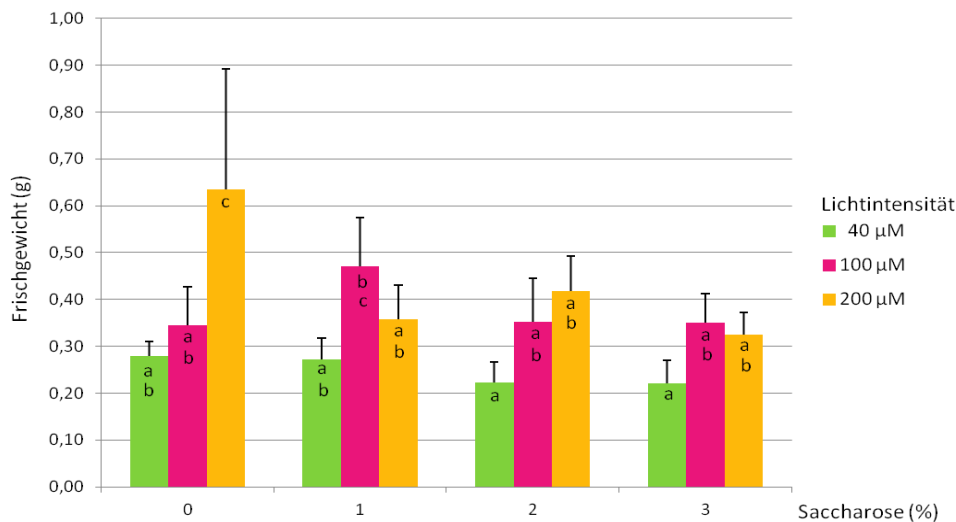


Abbildung 8 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 5 % CO₂ auf das Frischgewicht, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Wie in Abbildung 9 (S. 21) dargestellt, ist bei Betrachtung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen im Nährmedium unter 0 % CO₂ das Frischgewicht mit 0,61 g unter den Bedingungen 200 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF/1 % Saccharose signifikant höher als das geringste Frischgewicht von 0,16 g, das bei 40 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF und 2 % Saccharose erzielt wurde. Innerhalb der einzelnen Versuchsreihen mit gleichem Zuckergehalt im Medium unterschied sich nur das Frischgewicht bei 1 % Saccharose und 40 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF von jenem Frischgewicht, das unter den beiden anderen Lichtintensitäten zu verzeichnen war. Bei 0, 2 und 3 % Saccharose waren keine Auswirkungen der Lichtintensitäten auf das Frischgewicht festzustellen.

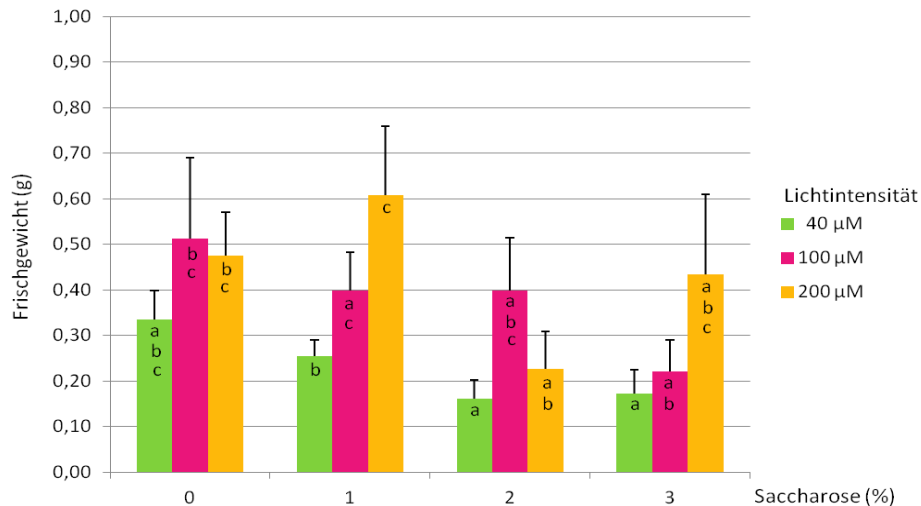


Abbildung 9 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 0 % CO₂ auf das Frischgewicht, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Unter einer Lichtintensität von 40 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF nahm das Frischgewicht bei beiden CO₂-Konzentrationen mit steigender Saccharosekonzentration tendenziell ab (siehe Abbildung 10, S. 22). Das höchste Frischgewicht (0,34 g), das ohne Saccharose im Medium und bei 0 % CO₂ erreicht wurde, unterschied sich nur von jenen Werten signifikant, die sich bei den Kombinationen von 0 % CO₂ mit 2 bzw. 3 % Saccharose ergaben. Unter 5 % CO₂ hatte keine der Saccharosekonzentrationen einen wesentlichen Einfluss auf das Frischgewicht. Die Auswirkungen der beiden CO₂-Konzentrationen auf das Frischgewicht waren bei keiner der vier Saccharosekonzentrationen von Bedeutung.

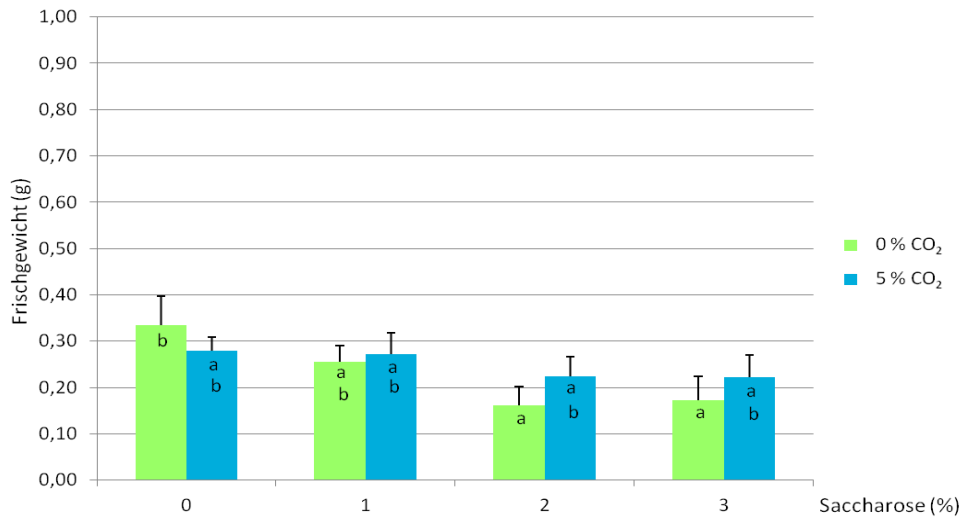


Abbildung 10 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf das Frischgewicht, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Abbildung 11 zeigt deutlich, dass unabhängig von den beiden anderen Lichtstärken unter $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF das Frischgewicht bei 0 % CO₂ mit steigender Saccharosekonzentration tendenziell abnahm. Unter 5 % CO₂ war das Frischgewicht mit 1 % Zucker im Medium am höchsten und bei den drei anderen Zuckerkonzentrationen in etwa gleich. Jedoch hatten weder Saccharose- noch CO₂-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf das Frischgewicht.

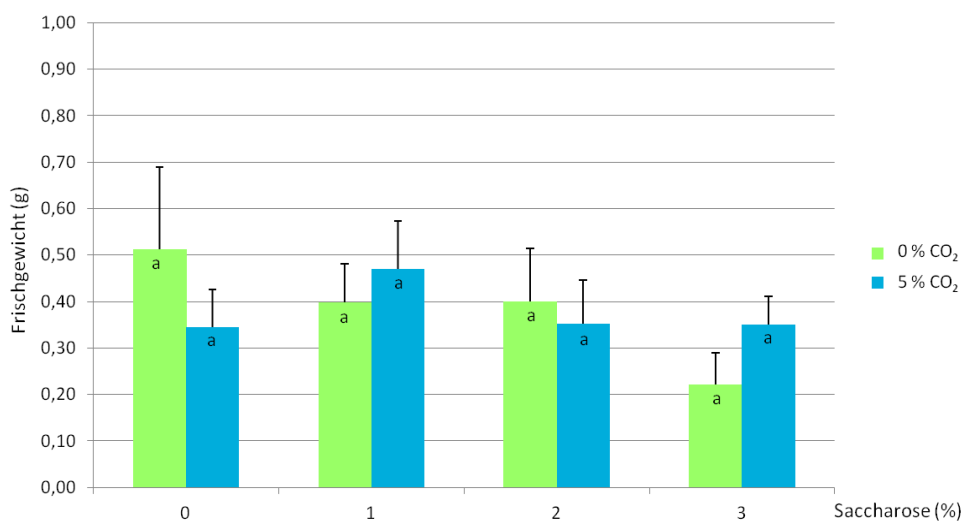


Abbildung 11 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf das Frischgewicht, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Betrachtet man die Lichtstärke von $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF unabhängig von den beiden anderen Lichtintensitäten, unterschied sich das höchste Frischgewicht von 0,64 g (keine Saccharose/5 % CO_2) vom niedrigsten mit 0,23 g (2 % Saccharose/0 % CO_2) signifikant (siehe Abbildung 12). Die Versuchsreihen mit 0 % Saccharose im Nährmedium und jene mit 1 % Saccharose/0 % CO_2 erzielten die höchsten Werte für das Frischgewicht und waren zu den restlichen Versuchsreihen signifikant unterschiedlich. Die beiden CO_2 -Konzentrationen zeigten bei gleichem Saccharosegehalt im Medium keinen Einfluss auf das Frischgewicht der einzelnen Sprosse.

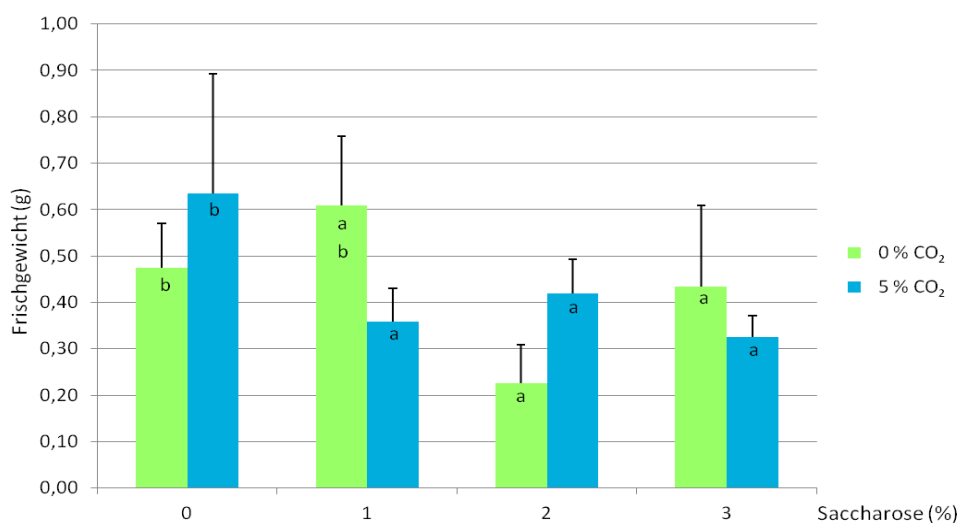


Abbildung 12 Auswirkung der unterschiedlichen CO_2 - und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf das Frischgewicht, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Das nun folgende Unterkapitel thematisiert die Auswirkungen der Kulturbedingungen auf die Nodienzahl. Da jedes Nodium als Explantat verwendet werden kann, ist die Nodienzahl ein Maß für die Vermehrung.

3.3. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Nodienzahl

Sieht man sich die Auswirkungen der unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen und Lichtintensitäten bei 5 % CO₂ auf die Nodienzahl an, ist festzustellen, dass bei einer Lichtstärke von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 0, 1 oder 2 % Saccharose im Medium signifikant mehr Nodien gebildet wurden als bei den beiden anderen Lichtintensitäten (siehe Abbildung 13). Bei 40 und 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF ist kein Einfluss der Saccharosekonzentration auf die Nodienzahl zu erkennen. 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF führten bei einem Saccharoseangebot von 3 % im Medium zur Bildung von mehr Nodien als bei 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF. Auch bei den restlichen drei Zuckergehalten wurden unter 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF mehr Nodien gebildet als bei den beiden anderen Lichtstärken.

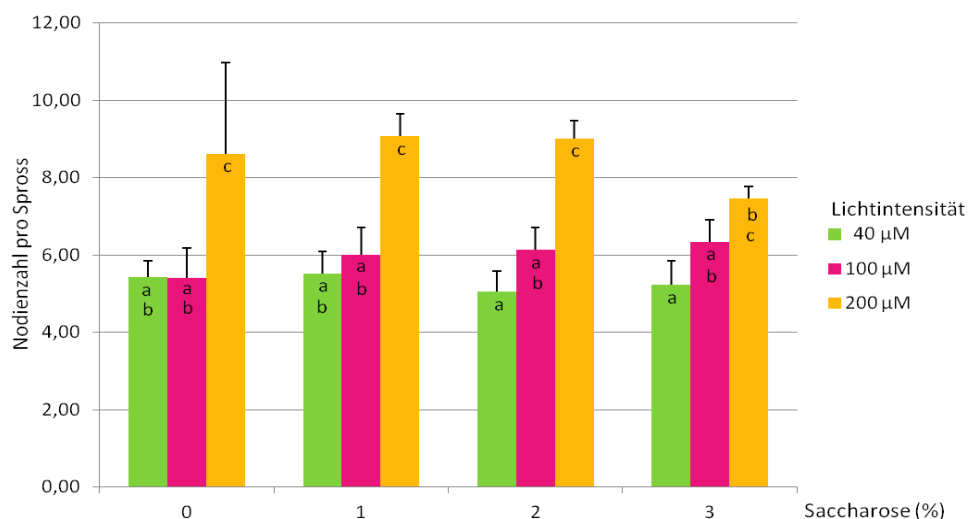


Abbildung 13 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 5 % CO₂ auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Bei Betrachtung der Auswirkungen von Saccharosekonzentration und Lichtintensität bei 0 % CO₂ auf die Nodienzahl pro Spross, wie in Abbildung 14 (S. 25) dargestellt, nimmt bei jeder Lichtstärke die Nodienzahl mit steigendem Saccharosegehalt im Medium tendenziell ab. Unter einer Lichtstärke von 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF ist dieser Trend jedoch nicht von Bedeutung. Bei einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF ist die Nodienzahl bei 0 % Saccharose im Nährmedium signifikant höher als bei 3 % Saccharose. Die höchsten Nodienzahlen

(10,08 und 9,58) wurden bei einer Lichtstärke von $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 0 % bzw. 1 % Saccharose im Medium erreicht. Diese Werte waren signifikant höher als jene Werte, die bei der gleichen Lichtintensität bei 2 und 3 % Saccharose erreicht wurden. Innerhalb der einzelnen Versuchsreihen mit gleicher Saccharosekonzentration unterschieden sich nur die Nodienzahlen bei $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 0 % sowie 1 % Saccharose signifikant von den beiden anderen Lichtintensitäten.

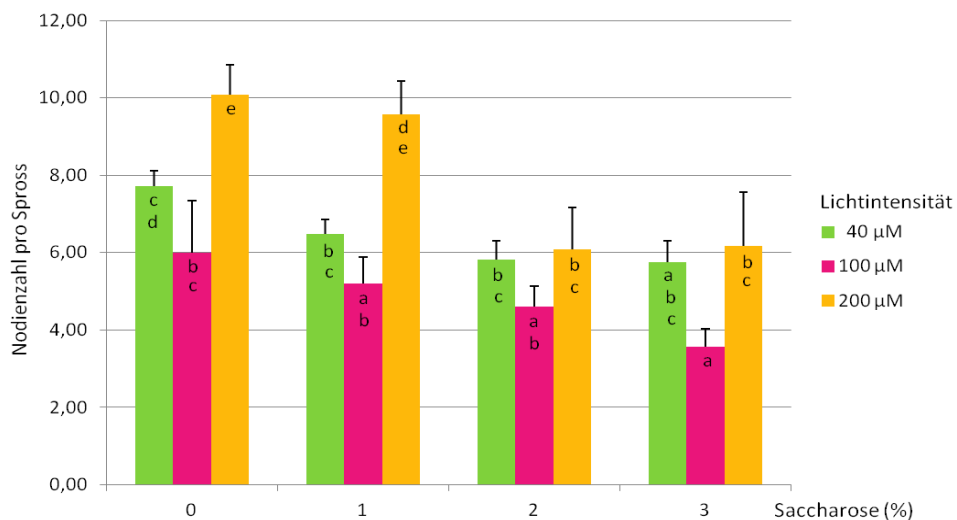


Abbildung 14 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 0 % CO_2 auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Die Darstellung der verschiedenen Saccharose- und CO_2 -Konzentrationen bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF in Abbildung 15 (S. 26) zeigt, dass bei 0 % CO_2 und ohne Saccharose im Medium durchschnittlich 7,71 Nodien gebildet wurden. Dieser höchste Wert unterscheidet sich zwar nicht von der mit 5 % CO_2 und 0 % Saccharose im Medium erreichten Nodienzahl, unterscheidet sich aber signifikant von allen anderen Werten. Bei gleichem Saccharosegehalt hatte keine der beiden CO_2 -Konzentrationen einen bedeutsamen Einfluss auf die Bildung neuer Nodien.

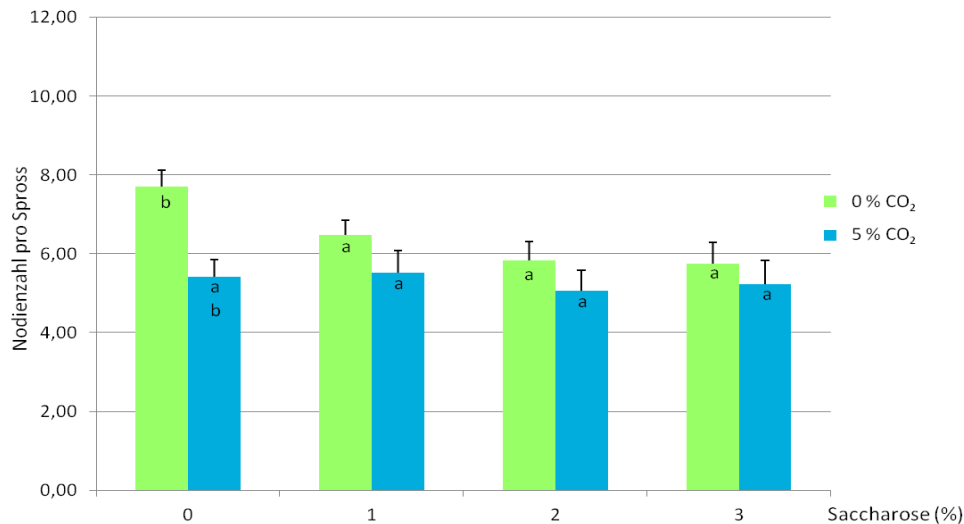


Abbildung 15 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Unter $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF hat die Nodienzahl bei 0 % CO₂ mit steigender Saccharosekonzentration tendenziell abgenommen, wobei sich hier der höchste Wert (6,00) ohne Saccharose im Nährmedium vom kleinsten (3,56) mit 3 % Saccharose signifikant unterscheidet (siehe Abbildung 16, S. 27). Bei 5 % CO₂ stieg die Nodienzahl nur trendmäßig mit steigendem Saccharosegehalt an. Sowohl die meisten als auch die wenigsten Nodien wurden bei 3 % Saccharose gebildet, wobei hier bei 5 % CO₂ signifikant mehr Nodien zu verzeichnen waren als bei 0 % CO₂. Bei den anderen Saccharosekonzentrationen hatte der CO₂-Gehalt keinen Einfluss auf die Nodienbildung.

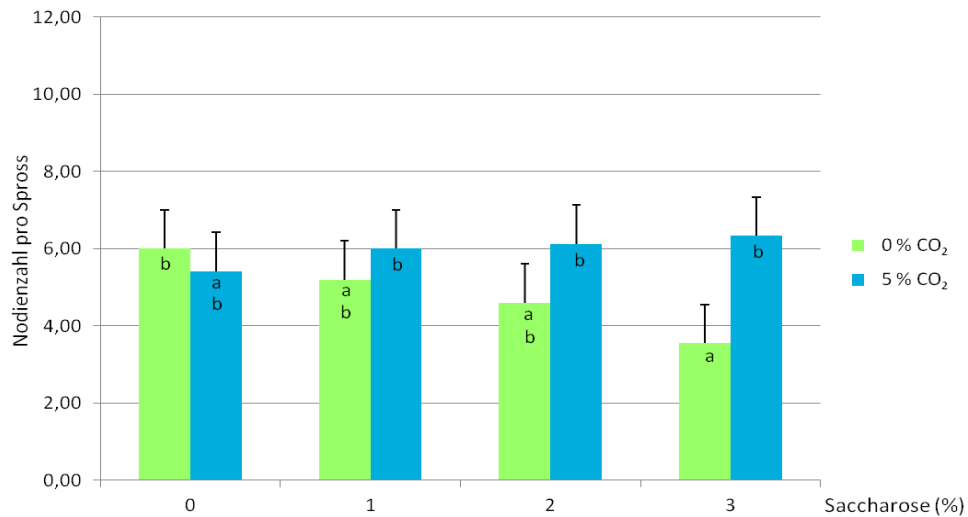


Abbildung 16 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von 100 µM·m⁻²·s⁻¹ PPf auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Die verschiedenen Saccharosekonzentrationen hatten unter 200 µM·m⁻²·s⁻¹ PPf und 5 % CO₂ keine bedeutsamen Auswirkungen auf die Nodienzahl (siehe Abbildung 17). Hingegen wurden bei 0 % CO₂ ohne und mit 1 % Saccharose im Medium signifikant mehr Nodien gebildet als mit 2 und 3 % Saccharose. Innerhalb der Versuchsreihen mit 2 und 3 % Saccharose war die Nodienzahl bei 5 % CO₂ höher. Bei den beiden anderen Zuckerkonzentrationen war kein Einfluss der CO₂-Konzentrationen zu verzeichnen.

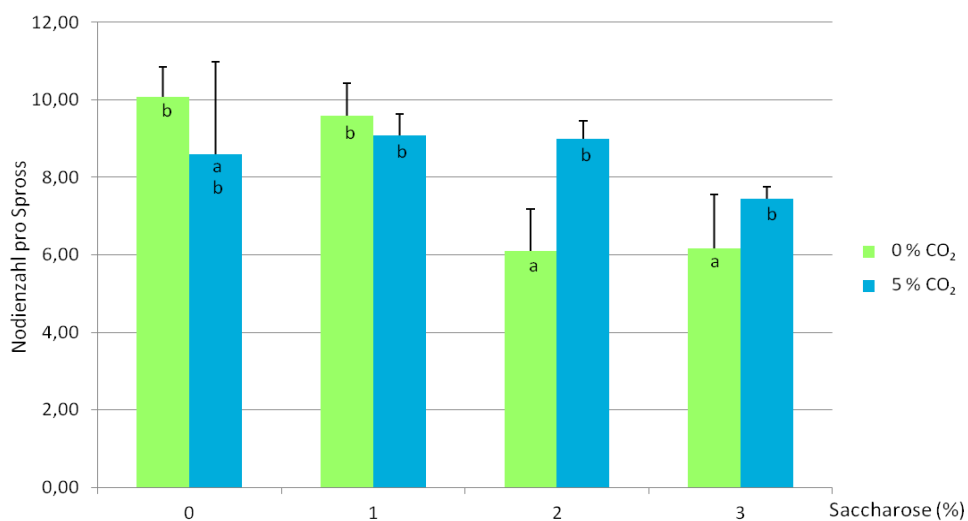


Abbildung 17 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von 200 µM·m⁻²·s⁻¹ PPf auf die Nodienzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Im nächsten Unterkapitel werden die Auswirkungen der Kulturbedingungen auf die Blattfläche näher beschrieben. Die Blattfläche gibt Aufschluss über den Einfluss der CO_2 -Konzentration und der Lichtintensität auf die Photosynthese.

3.4. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Blattfläche

Betrachtet man den Einfluss der verschiedenen Saccharosekonzentrationen und Lichtintensitäten bei 5 % CO_2 auf die Blattfläche, so hatte bei keiner der drei Lichtstärken der Saccharosegehalt Auswirkungen auf die Blattfläche (siehe Abbildung 18). Richtet man das Hauptaugenmerk auf die Kulturen mit gleichem Zuckergehalt im Nährmedium, so war die Blattfläche bei 1 % Saccharose und einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF signifikant kleiner als bei den beiden anderen Lichtstärken. Sowohl bei 2 als auch bei 3 % Saccharose war die Blattfläche bei $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF größer als bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF. Auf zuckerfreiem Nährmedium hatte die Lichtintensität keine Auswirkung auf die Blattfläche.

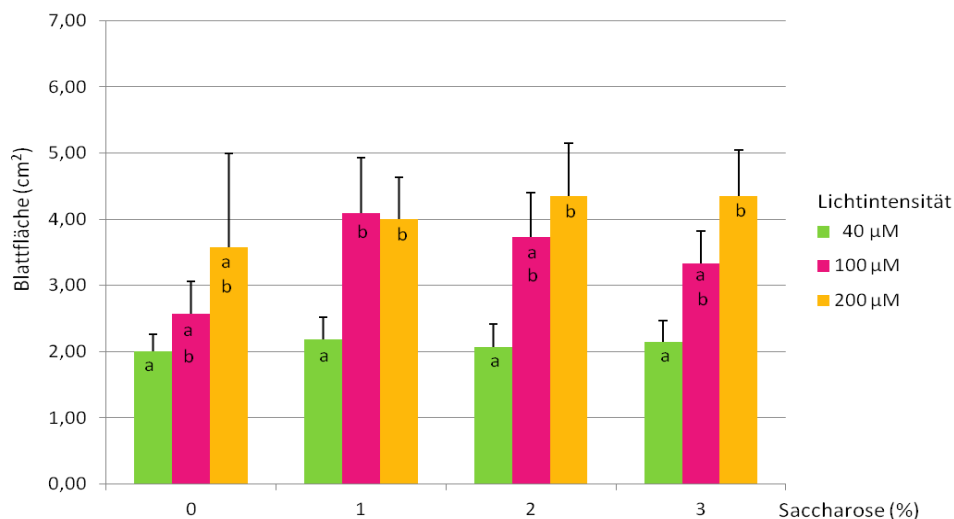


Abbildung 18 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 5 % CO_2 auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Vergleicht man bei 0 % CO_2 die Auswirkungen der drei Lichtintensitäten unabhängig voneinander bei jeder der vier Saccharosekonzentrationen auf die Blattfläche, so

hatte der Zuckergehalt im Medium keinen nennenswerten Einfluss auf die Blattfläche (siehe Abbildung 19). Die größte Blattfläche von $4,59 \text{ cm}^2$ bei 2 % Saccharose und einer Lichtstärke von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF unterschied sich signifikant von der kleinsten Blattfläche ($1,82 \text{ cm}^2$) bei 2 % Saccharose und einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF. Bei den anderen Saccharosekonzentrationen hatte die Lichtstärke einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Blattfläche.

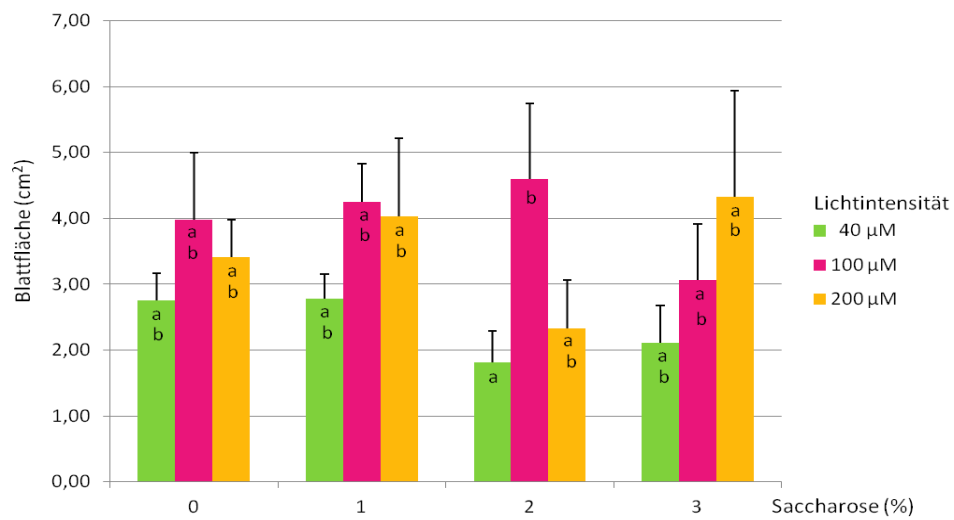


Abbildung 19 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei **0 % CO₂** auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Auf die Auswirkungen von 0 und 5 % CO₂ in Kombination mit 0, 1, 2 und 3 % Saccharose im Nährmedium bei den verschiedenen Lichtintensitäten von 40, 100 und $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF wird hier nicht näher eingegangen, da die Blattflächen bei keiner der möglichen Kombinationen einen signifikanten Unterschied aufwiesen.

Im folgenden Unterkapitel werden die Auswirkungen der Kulturbedingungen auf den Chlorophyllgehalt der Blätter näher behandelt. Auch dieser Parameter gibt wie die Blattfläche Aufschluss über den Einfluss der CO₂-Konzentration und der Lichtintensität auf die Photosynthese.

3.5. Einfluss der Kulturbedingungen auf den Chlorophyllgehalt

Unter den verschiedenen Saccharosekonzentrationen und Lichtintensitäten bei 5 % CO₂ wurde, wie in Abbildung 20 dargestellt, der höchste Chlorophyllgehalt von 34,03 SPAD bei 3 % Saccharose und einer Lichtintensität von 100 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF gemessen. Dieser höchste Wert unterschied sich vom geringsten Chlorophyllgehalt (11,22 SPAD bei 0 % Saccharose im Medium und 200 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF) signifikant. Weiters besteht zwischen dem kleinsten gemessenen Wert und allen anderen Messergebnissen ein signifikanter Unterschied. Bei steigender Saccharosekonzentration war trendmäßig bei allen Lichtintensitäten auch der Chlorophyllgehalt der Blätter höher. Keine der Lichtstärken führte bei 1 und 3 % Saccharose zu bedeutenden Unterschieden im Chlorophyllgehalt der Blätter. Bei 0 % und 2 % Saccharose war der Chlorophyllgehalt bei 200 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF signifikant niedriger als unter den beiden anderen Lichtintensitäten.

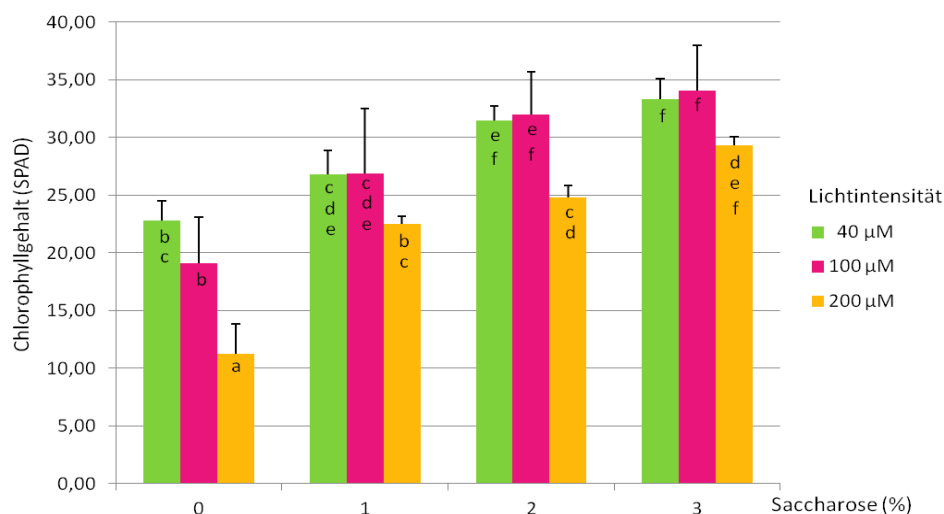


Abbildung 20 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 5 % CO₂ auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Auch bei näherer Betrachtung der unterschiedlichen Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen im Nährmedium bei 0 % CO₂ war der Chlorophyllgehalt unter 100 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF und 3 % Saccharose im Medium am höchsten und unterschied sich signifikant vom kleinsten Wert bei 200 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF und 0 % Saccharose im Nährmedium (siehe Abbildung 21, S. 31). Betrachtet man die

einzelnen Lichtintensitäten getrennt voneinander bei den verschiedenen Saccharosekonzentrationen, so war der Chlorophyllgehalt bei 100 oder 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF ohne Saccharose niedriger als bei höherem Zuckergehalt. Innerhalb der Versuchsreihen mit gleicher Saccharosekonzentration war nur bei 0 % Saccharose im Medium der Chlorophyllgehalt bei 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF signifikant niedriger als bei 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF. Bei den drei anderen Saccharosekonzentrationen waren keine signifikanten Einflüsse der Lichtintensitäten auf den Chlorophyllgehalt festzustellen.

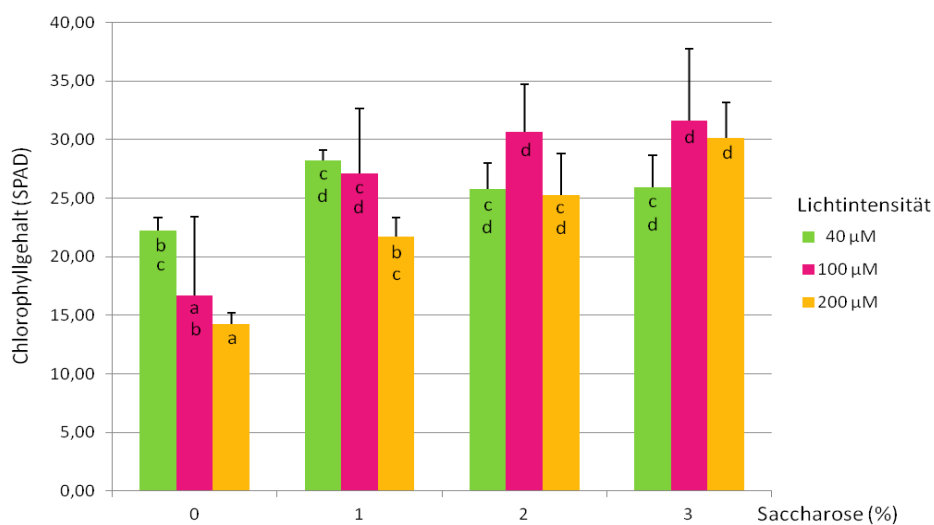


Abbildung 21 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 0 % CO_2 auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Abbildung 22 (S. 32) zeigt, dass unter 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF Licht bei 5 % CO_2 der Chlorophyllgehalt mit steigender Saccharosekonzentration trendmäßig zunimmt und der höchste Wert im Vergleich zum kleinsten Wert bei dieser CO_2 -Konzentration signifikant höher ist. Bei 0 % CO_2 war nur der Unterschied zwischen dem Chlorophyllgehalt, der bei 0 % Saccharose im Nährmedium gemessen wurde, und jenem bei 1 % Saccharose von Bedeutung. Mit einem Saccharosegehalt von 2 oder 3 % war der Chlorophyllgehalt bei 5 % CO_2 signifikant höher als bei 0 %. Bei den beiden anderen Zuckerkonzentrationen hatte der CO_2 -Gehalt der Atmosphäre keinen Einfluss auf den Chlorophyllgehalt der Blätter.

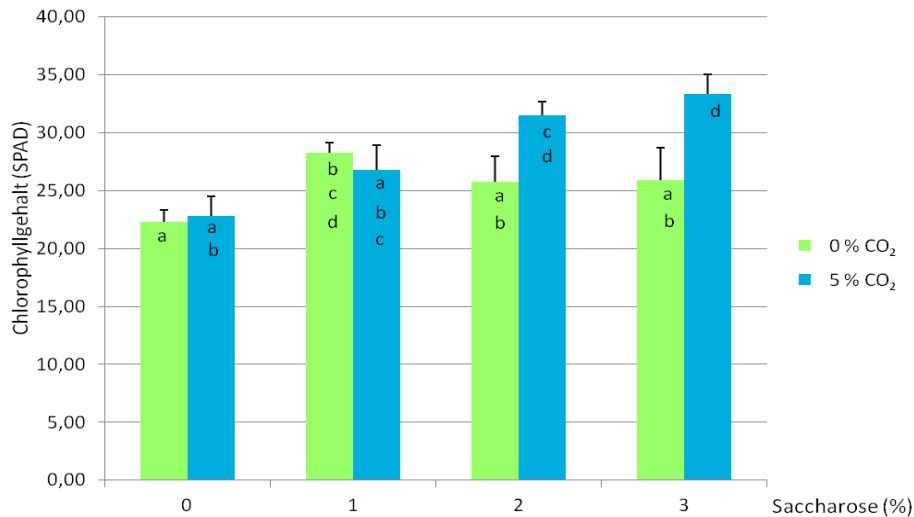


Abbildung 22 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Unter einer Lichtstärke von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF nahm der Chlorophyllgehalt bei beiden CO₂-Konzentrationen mit steigender Saccharosekonzentration zu, wobei sich aber nur die niedrigsten Werte, die ohne Saccharose im Nährmedium erzielt wurden, von den anderen signifikant unterschieden (siehe Abbildung 23). Betrachtet man die Saccharosekonzentrationen einzeln für sich, so hatte die CO₂-Konzentration keinen Einfluss auf den Chlorophyllgehalt der Blätter.

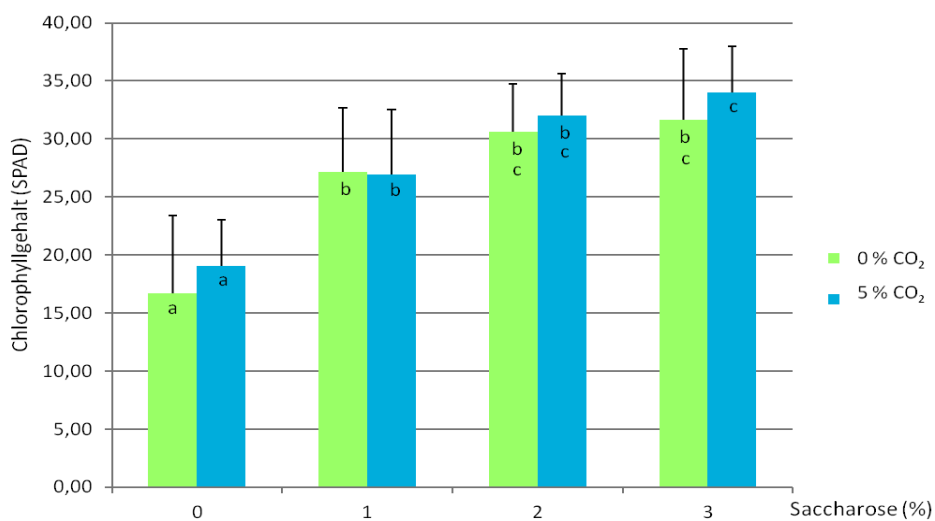


Abbildung 23 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Auch bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF zeigte sich ein ähnliches Bild wie vorhin beschrieben (siehe Abbildung 24). Mit steigender Saccharosekonzentration stieg auch bei beiden CO_2 -Konzentrationen der Chlorophyllgehalt der Blätter. Der geringste Chlorophyllgehalt von 11,22 SPAD war bei 0 % Saccharose im Nährmedium zu verzeichnen und unterschied sich vom höchsten Wert (30,15 SPAD bei 3 % Saccharose) signifikant. Weiters war der Chlorophyllgehalt unter beiden CO_2 -Konzentrationen bei 3 % Saccharose signifikant höher als bei 1 % Saccharose. Die unterschiedlichen CO_2 -Konzentrationen hatten bei gleichem Zuckergehalt im Medium keinen nennenswerten Einfluss auf den Chlorophyllgehalt der Blätter.

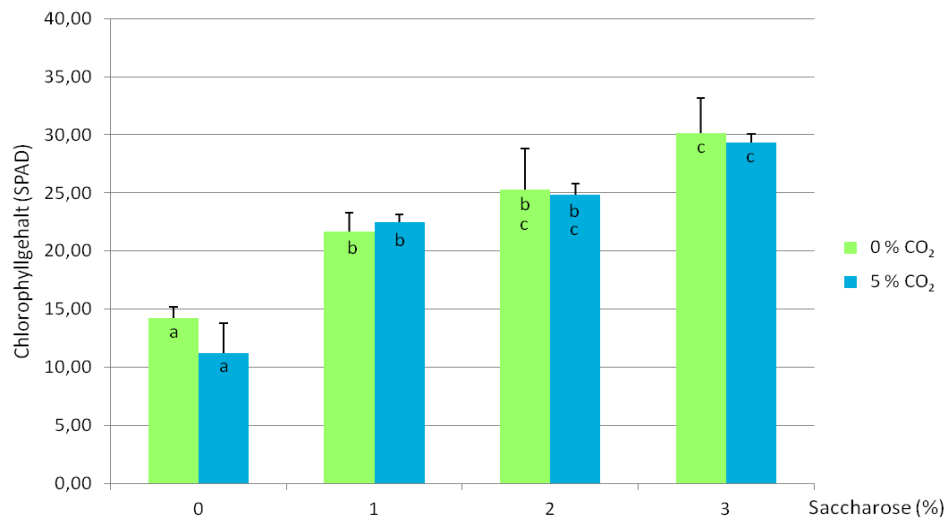


Abbildung 24 Auswirkung der unterschiedlichen CO_2 - und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Im letzten Unterkapitel werden die Auswirkungen der Kulturbedingungen auf die Blattzahl beschrieben.

3.6. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Blattzahl

Bei Betrachtung des Einflusses der verschiedenen Saccharosekonzentrationen und Lichtintensitäten (siehe Abbildung 25) bei 5 % CO₂ auf die durchschnittliche Blattzahl pro Spross ist zu erkennen, dass mit steigendem Zuckergehalt unter 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF die Blattzahl trendmäßig gesunken, unter 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF gestiegen und unter 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF bis 2 % Saccharose gestiegen, bei 3 % aber am geringsten war. Allerdings zeigte keine der möglichen Kombinationen signifikante Auswirkungen auf die Blattzahl pro Spross.

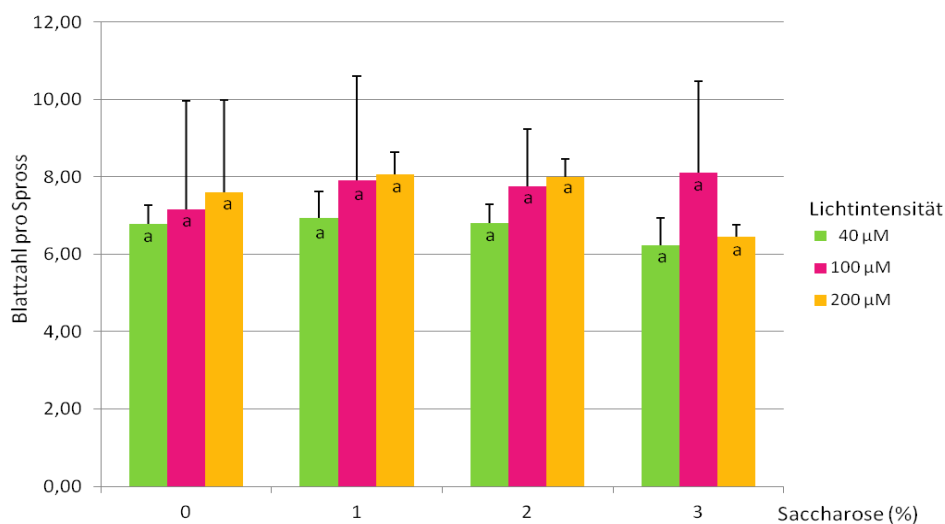


Abbildung 25 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 5 % CO₂ auf die Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Betrachtet man die Auswirkungen von Lichtintensität und Saccharosekonzentration bei 0 % CO₂ auf die Blattzahl (siehe Abbildung 26, S. 35), so ist festzustellen, dass mit steigendem Zuckergehalt im Medium die Blattzahl bei allen Lichtstärken tendenziell sank. Die meisten Blätter (9,08 und 9,07) wurden unter den Konditionen 0 % Saccharose/40 oder 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF gebildet. Die wenigsten Blätter waren bei 3 % Saccharose und 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF zu zählen. Der höchste und der niedrigste Wert unterschieden sich dabei signifikant. Bei einer Lichtstärke von 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF war die Blattzahl ohne Saccharose im Medium höher als bei 2 und 3 % Saccharose. Unter 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF wurden bei 0 % Saccharose im Medium mehr Blätter gebildet als bei 3 % Saccharose. 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF führten schließlich

zu einer signifikant niedrigeren Blattzahl bei 2 und 3 % Saccharose im Medium. Innerhalb der Versuchsreihen mit gleicher Saccharosekonzentration hatten die Lichtintensitäten keinen Einfluss auf die Blattzahl.

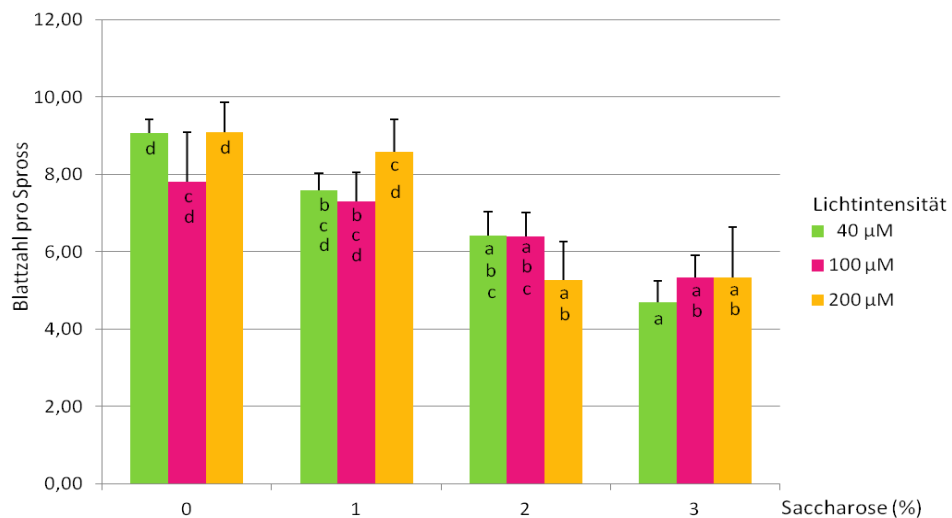


Abbildung 26 Auswirkung der Lichtintensitäten und Saccharosekonzentrationen bei 0 % CO₂ auf die Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Abbildung 27 (S. 36) zeigt die Auswirkungen von Saccharose- und CO₂-Konzentration bei einer Lichtintensität von 40 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF. Fehlende Saccharose im Nährmedium führte bei 0 % CO₂ zu signifikant höheren Blattzahlen als 2 und 3 % Saccharose. Unter 5 % CO₂ war zwischen den verschiedenen Zuckergehalten im Medium kaum ein Unterschied festzustellen. Betrachtet man die Saccharosekonzentrationen getrennt, so war nur ohne Saccharose im Medium die Blattzahl bei 0 % CO₂ signifikant höher als bei 5 % CO₂. Bei den anderen Zuckerkonzentrationen hatte der CO₂-Gehalt keinen bedeutsamen Einfluss auf die Blattzahl pro Spross.

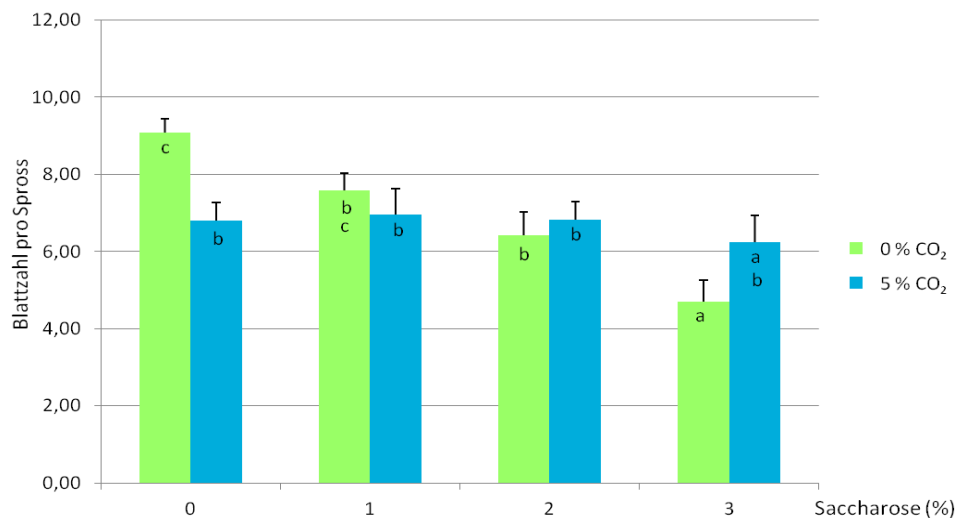


Abbildung 27 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf die Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Die folgende Abbildung 28 (S. 37) veranschaulicht den Einfluss von Saccharose- und CO₂-Konzentration bei $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf die Blattzahl pro Spross. Bei Abwesenheit von Saccharose im Medium und 0 % CO₂ war die Blattzahl signifikant höher als bei 3 % Saccharose. Unter 5 % CO₂ hatte keine der Saccharosekonzentrationen einen wesentlichen Einfluss auf die Blattzahl. Betrachtet man jeden unterschiedlichen Saccharosegehalt für sich, so war nur bei 3 % Saccharose die Blattzahl unter 5 % CO₂ signifikant höher als bei 0 % CO₂. Bei den anderen Saccharosekonzentrationen zeigten die beiden CO₂-Konzentrationen keine Auswirkungen auf die Blattzahl.

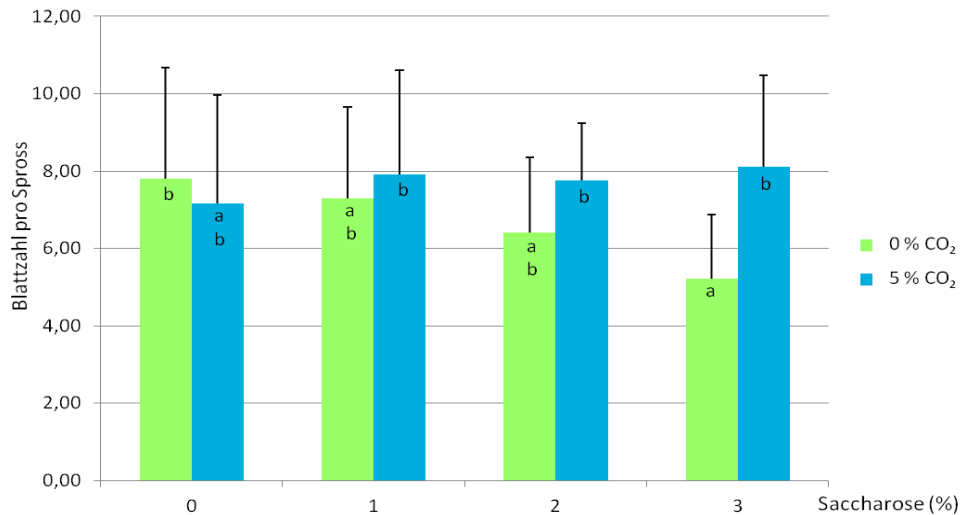


Abbildung 28 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf die Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Betrachtet man den Einfluss von Saccharose- und CO₂-Konzentration auf die Blattzahl pro Spross bei $200 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF (siehe Abbildung 29, S. 38), so ist festzustellen, dass bei 0 % CO₂ die Blattanzahl bei 0 und 1 % Saccharose im Medium signifikant höher war als bei 2 und 3 % Saccharose. Bei 5 % CO₂ war kein wesentlicher Unterschied in den Blattzahlen bei verschiedenem Saccharosegehalt im Medium festzustellen. Zwischen den beiden CO₂-Konzentrationen waren keine signifikanten Auswirkungen bei den jeweiligen Saccharosekonzentrationen zu sehen.

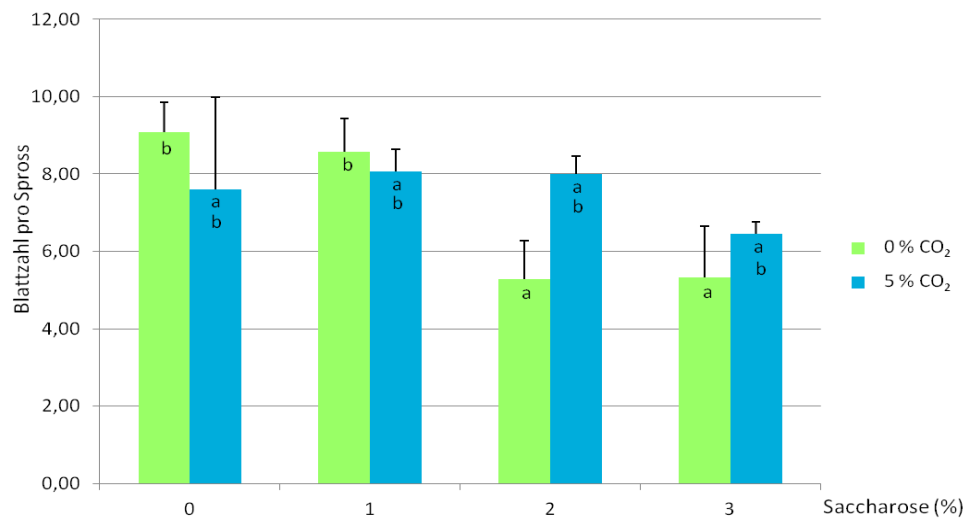


Abbildung 29 Auswirkung der unterschiedlichen CO₂- und Saccharosekonzentrationen bei einer Lichtintensität von **200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPf** auf die Blattzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Variierung einiger Kulturparameter durchgeführt, um photoautotrophe in vitro-Kulturen des Pappel-Hybrids 741 zu etablieren.

Pappeln werden der Familie der Salicaceae zugeordnet und sind schnellwachsende Bäume. Nicht nur wegen ihres schnellen und üppigen Wachstums, sondern auch aufgrund der großen Anpassungsfähigkeit an ihre Umgebung ist die Verwendung von Pappeln in der Holz- und Papierindustrie weit verbreitet (Hamzeh et al., 2004). Darüber hinaus haben Pappeln auch auf dem Gebiet der Biomassettechnologien als erneuerbare Energieträger der Zukunft einen hohen Stellenwert erlangt (Djomo et al., 2011).

Die steigende Bedeutung der Pappel für Industrie und Wissenschaft hat eine große Nachfrage zur Folge, die es zu decken gilt. Viele Pappelarten können zwar durch Stecklingsvermehrung in großen Mengen produziert werden, allerdings ist diese Vermehrungsart im Hinblick auf die Fähigkeit der Stecklinge, Adventivwurzeln zu bilden, limitiert (Zhao et al., 2014). Durch in vitro-Kultivierung der Pappel im Rahmen der konventionellen Gewebekultur kann die Bewurzelung von mikrovermehrten Sprossen deutlich verbessert werden. Deshalb ist die in vitro-Vermehrung eine wichtige Technik, um hohe Vermehrungsraten zu erzielen und genetisch identisches Material zu gewinnen (Thach Phan et al., 2004). Da die konventionelle in vitro-Kultivierung aber auch einige Nachteile hat (siehe Kap. 1, S. 2), wurde die photoautotrophe in vitro-Kultivierung etabliert (Kozai, 2005). Mit dieser Technik wird durch die Verwendung eines saccharosefreien Nährmediums eine mögliche Kontamination mit Mikroorganismen gering gehalten. Weiters bleibt im Gegensatz zur konventionellen Gewebekultur durch eine geringere relative Luftfeuchte im Kulturgefäß die Funktion der Stomata erhalten, was wiederum zur Folge hat, dass es ex vitro bei der Akklimatisierung zu weniger Ausfällen kommt.

Dies sind nur einige Vorteile der photoautotrophen in vitro-Kultivierung, weitere Vorteile wurden eingangs (Kap. 1, S. 6) erläutert (Kubota, 2001).

Etwa 50 Pflanzenarten wurden bislang erfolgreich photoautotroph kultiviert (Xiao et al., 2011), darunter finden sich auch einige Holzgewächse wie zum Beispiel *Acacia mangium*, *Coffea arabusta*, *Pinus radiata* oder *Paulownia fortunei* (Kozai und Kubota, 2001). Wie der Literatur zu entnehmen ist, werden Studien zur in vitro-Vermehrung von Pappeln allerdings meistens über konventionelle Gewebekultur durchgeführt (Ziauka et al., 2013; Noël et al., 2002).

Die vorliegende Arbeit hatte die Zielsetzung, vorteilhafte Kulturbedingungen zur Etablierung einer photoautotrophen in vitro-Kultur der Pappel-Hybride 741 zu finden. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf den Einfluss verschiedener Saccharosekonzentrationen im Nährmedium, höheren Lichtintensitäten und einem erhöhten CO₂-Angebot im Kulturgefäß auf das Pappelwachstum gelegt. Die sechs Parameter Sprosslänge, Frischgewicht, Nodienzahl, Blattfläche, Chlorophyllgehalt der Blätter und Blattzahl wurden bei der Auswertung ermittelt. Diese Parameter wurden in vergleichbaren Versuchen meist zur Beurteilung des Pflanzenwachstums verwendet (Cha-Um et al., 2010; Badr et al., 2011; Cha-Um et al., 2014).

Hanak (2014) zeigte in ihren Versuchen, dass sich die Pappel-Hybride 741 am besten auf einem ½ LS-Medium ohne weiteren Zusatz von Wachstumshormonen entwickelt. Deshalb kam auch in der vorliegenden Arbeit halbkonzentriertes LS-Medium zum Einsatz.

Dass der Gelbildner Gelrite® eine gute Alternative zum viel verwendeten Agar darstellt, wurde schon 1997 von Veramendi et al. erkannt. Da Gelrite® auch in den Versuchen von Kang et al. (2009) positive Auswirkungen auf das Pappelwachstum zeigte, wurde dieser Gelbildner auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Kulturgefäße wurden mit Magenta® B-Caps verschlossen, die eine Bohrung aufwiesen, um wie bei Kozai und Kubota (2001) beschrieben eine bessere Belüftung der Gefäße zu gewährleisten. Eine gasdurchlässige Membranfilterscheibe über der Bohrung sollte mögliche Kontaminationen mit Mikroorganismen verhindern. Mit

derartigen Verschlüssen (keine, 1 oder 2 Bohrungen) führte auch Schnur (2013) Versuche mit der Pappel-Hybride 741 durch und konnte zeigen, dass mit verbesserter Belüftung Blattfläche, Frischgewicht und Chlorophyllgehalt der Blätter anstiegen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses verschiedener Lichtintensitäten auf die Entwicklung der Explantate. Dazu wurden Lichtstärken von 40, 100 und 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF verwendet. Ähnliche Lichtintensitäten (25, 50, 100 und 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF) verwendeten auch Zhang et al. (2009), als sie photoautotrophe und konventionelle in vitro-Kulturen von *Momordica grosvenori* verglichen. Ein weiterer Untersuchungsaspekt waren die Auswirkungen verschiedener Saccharosekonzentrationen im Nährmedium auf das Pappelwachstum. Es kamen Medien mit einem Gehalt von 0, 1, 2 und 3 % Saccharose zur Anwendung. Diese Zuckerkonzentrationen wurden auch von Deng und Donnelly (1993) in ihren Versuchen mit *Rubus idaeus* L. verwendet. Ähnliche Konzentrationen (1, 2, 3 %) wurden auch von Nathiya et al. (2013) zur in vitro-Vermehrung von *Withania somnifera* eingesetzt. Meistens werden jedoch in entsprechenden Studien nur 0 % Saccharose für photoautotrophe und 3 % Saccharose für konventionelle Kulturbedingungen verwendet (Sha Valli Khan et al., 2002; Morini und Melai, 2003; Shin et al., 2013).

Der dritte Gegenstand der Untersuchungen war der Einfluss zweier CO_2 -Konzentrationen auf das Wachstum der Explantate. Die eine Hälfte der Kulturen wurde unter einer normalen atmosphärischen Konzentration von 0,039 % CO_2 gehalten, die andere Hälfte unter einer erhöhten CO_2 -Konzentration von 5 %. In einer Studie von Tisserat et al. (1997,) in der die Auswirkungen von unterschiedlichen CO_2 -Konzentrationen und Zuckergehalten im Medium auf das Wachstum von Zitrusfrüchten und einigen Gemüsesorten untersucht wurden, kamen unter anderem 5 % CO_2 zur Anwendung. Buddendorf-Joosten und Woltering (1996) sowie Tisserat und Silman (2000) verwendeten ebenfalls 5 % CO_2 . Cournac et al. (1991) führten ihre Versuche mit *Solanum tuberosum* unter 2 % CO_2 durch. Ansonsten werden bei Vergleichen von photoautotrophen und konventionellen Gewebekulturen meist atmosphärische CO_2 -Konzentrationen und CO_2 -

Konzentrationen unter 1 % verwendet (Deng und Donnelly, 1993; Pruski et al., 2002; Xiao et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der Auswertung unter anderem die **Sprosslänge** der einzelnen Explantate bestimmt. Betrachtet man die beiden Einflussfaktoren Saccharose im Medium und Lichtstärke bei 5 % CO₂, ist festzustellen, dass die Sprosse unter den Konditionen 0 % Saccharose/200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF am längsten waren. Die Kombination von Saccharosekonzentration und Lichtintensität unter 0 % CO₂ zeigte ebenfalls die längsten Sprosse bei Fehlen von Saccharose im Medium. Die Lichtintensität scheint hier keinen Einfluss auf das Sprosswachstum zu haben. Bei Betrachtung von CO₂- und Zuckerkonzentration bei jeder einzelnen Lichtstärke ist zu bemerken, dass bei einer Lichtstärke von 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF die Sprosse unter den Konditionen 0 % CO₂ und 2 % Saccharose am kürzesten waren. Nur bei diesem Zuckergehalt hatte die CO₂-Konzentration nennenswerten Einfluss auf die Sprosslänge. Die Sprosse waren bei atmosphärischer CO₂-Konzentration und einem Zuckergehalt von 0 und 1 % signifikant länger als bei 2 und 3 % Saccharose. Bei 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF waren die Sprosse unter atmosphärischer CO₂-Konzentration ohne Saccharose im Medium deutlich länger als bei 3 % Zucker. Die unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen hatten hier jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum der Sprosse. Die Sprosse waren bei einer Lichtstärke von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF bei beiden CO₂-Konzentrationen ohne Saccharose im Medium signifikant länger als bei den anderen Saccharosekonzentrationen. Auch hier zeigten die verschiedenen CO₂-Konzentrationen keine Auswirkungen auf die Sprosslänge. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Abwesenheit von Zucker im Nährmedium einen positiven Einfluss auf die Sprosslänge hat. Tendenziell ist eine Lichtstärke von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF vorteilhaft. Die unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen zeigen weniger Auswirkung auf die Sprosslänge.

Auch Xiao und Kozai (2004) konnten in ihren Versuchen mit der Holzpflanze *Cunninghamia lanceolata* zeigen, dass die Sprosse unter photoautotrophen Bedingungen ohne Saccharose im Medium länger werden als unter konventionellen Bedingungen mit 3 % Saccharose im Medium. Beim Vergleich von

photoautotrophen und konventionellen in vitro-Kulturen von *Solanum tuberosum* beobachteten Badr et al. (2011) ebenfalls signifikant längere Sprosse auf Nährmedium ohne Zucker. Ebenso verzeichneten Cournac et al. (1991) in ihren Untersuchungen die längsten Sprosse auf saccharosefreiem Nährmedium. Allerdings war hier eine erhöhte CO₂-Konzentration vorteilhaft für die Sprosslänge. Ein gegenteiliges Ergebnis liegt von Saldanha et al. (2013) vor. In deren Versuchen mit brasilianischem Ginseng waren die Sprosse bei einer Lichtintensität von 60 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 3 % Saccharose im Nährmedium deutlich länger. Dass unter höherem Zuckergehalt im Nährmedium die Sprosse länger sind, konnten auch Arigita et al. (2010), Pruski et al. (2002) und Mohamed und Alsadon (2010) bestätigen. In einer Studie von Mitra et al. (1998) konnte andererseits kein Einfluss der Saccharose auf die Sprosslänge gefunden werden.

Weiters wurde bei der Auswertung das **Frischgewicht** bestimmt. Betrachtet man die Auswirkungen von Saccharosekonzentration und Lichtintensität auf das Frischgewicht bei 5 % CO₂, so ist zu erkennen, dass das Frischgewicht ohne Zucker im Nährmedium und bei 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF Lichtstärke signifikant am höchsten war. Weder die beiden anderen Lichtstärken noch die drei anderen Zuckerkonzentrationen hatten einen Einfluss auf das Frischgewicht. Kombiniert man die Saccharosekonzentrationen und die Lichtstärken bei 0 % CO₂, war unter den Konditionen 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF/1 % Saccharose das größte Frischgewicht zu verzeichnen. Unter 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF war das Frischgewicht bei 1 % Zucker signifikant höher als bei 2 und 3 % Saccharose. Die Lichtintensitäten waren nur bei 1 % Saccharose von Bedeutung, wobei hier das Frischgewicht bei den beiden höheren Lichtintensitäten anstieg. Die Betrachtung der CO₂- und Zuckerkonzentrationen bei jeder Lichtstärke für sich zeigt bei 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF keinen Einfluss der CO₂-Gehalte auf das Frischgewicht. Das höchste Frischgewicht war bei atmosphärischer CO₂-Konzentration und 0 % Saccharose im Medium zu verzeichnen. Bei einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF zeigten weder CO₂- noch Saccharosekonzentrationen Auswirkungen auf das Frischgewicht. 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF führten ohne Zucker im Nährmedium zum höchsten Frischgewicht. Die beiden CO₂-Konzentrationen hatten hier jedoch keinen Einfluss

auf das Wachstum. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass sich keine oder wenig Saccharose im Nährmedium sowie höhere Lichtstärken vorteilhaft auf das Frischgewicht auswirken. Die CO₂-Konzentrationen haben keinen Einfluss auf das Frischgewicht.

Auch Xiao und Kozai (2004) erreichten in ihren Kulturen mit *Cunninghamia lanceolata* ohne Saccharose im Nährmedium ein höheres Frischgewicht als mit 3 % Saccharose. Weiters wurde auch von Couceiro et al. (2006) beim Vergleich von konventionellen und photoautotrophen Kulturen von *Hypericum perforatum* ein höheres Frischgewicht bei Fehlen von Zucker im Medium, erhöhter Lichtintensität und erhöhter CO₂-Konzentration festgestellt. Versuche von Kitaya et al. (1995) mit unterschiedlichen Lichtintensitäten zeigten, dass das Frischgewicht mit zunehmender Lichtstärke anstieg.

Ein kontroverses Ergebnis liegt von Nguyen und Kozai (2001) vor. In deren Versuchen war das Frischgewicht unter einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 3 % Saccharose im Medium höher als unter photoautotrophen Bedingungen. Ebenso war das Frischgewicht in Studien von Mitra et al. (1998) und Mohamed und Alsadon (2010) unter Verwendung eines Nährmediums mit 2 % Saccharose deutlich höher als ohne Saccharose. Untersuchungen von Deng und Donnelly (1993) und Buddendorf-Joosten und Woltering (1996) zeigten, dass unter erhöhter CO₂-Zufuhr das Frischgewicht signifikant höher war als unter atmosphärischer CO₂-Konzentration. In einer Studie von Tisserat und Silman (2000) war das Frischgewicht von Gartensalat mit 3 % Saccharose im Medium höher als mit saccharosefreiem Nährmedium, weiters stieg das Frischgewicht bei Erhöhung der CO₂-Konzentration bis 3 % an; bei 5 % CO₂ sank das Frischgewicht wieder.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war die Ermittlung der **Nodienzahl** pro Spross. Betrachtet man die Auswirkungen von Saccharosekonzentration und Lichtintensität auf die Nodienzahl bei 5 % CO₂, so ist klar zu erkennen, dass eine Lichtstärke von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF bei allen Saccharosekonzentrationen zu den größten Nodienzahlen führte. Die einzelnen Zuckerkonzentrationen im Medium und die beiden anderen Lichtintensitäten zeigten keinen Einfluss auf die Nodienbildung. Kombiniert man die Saccharosekonzentrationen und die

Lichtstärken bei 0 % CO₂, war die Nodienzahl bei 0 und 1 % Saccharose im Nährmedium unter einer Lichtstärke von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF am größten. Auch bei den beiden anderen Lichtintensitäten nahm die Nodienzahl mit zunehmender Saccharosekonzentration im Medium tendenziell ab. Die Betrachtung der CO₂- und Zuckerkonzentrationen bei jeder Lichtstärke für sich zeigt bei 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF die meisten neu gebildeten Nodien ohne Saccharose und unter atmosphärischer CO₂-Konzentration. Die beiden CO₂-Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Nodienbildung. Unter einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF wurden bei 3 % Saccharose und 5 % CO₂ signifikant mehr Nodien gebildet als bei 0 % CO₂. Die Saccharosekonzentrationen zeigten keine Auswirkungen auf die Nodienzahl. Unter einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF wurden bei atmosphärischer CO₂-Konzentration und 0 bzw. 1 % Saccharose mehr Nodien gebildet als bei den beiden anderen Saccharosekonzentrationen. Der Zuckergehalt hatte bei erhöhter CO₂-Konzentration jedoch keinen Einfluss auf die Nodienzahl. Bei 2 und 3 % Saccharose im Medium hatten 5 % CO₂ die Bildung von mehr Nodien zur Folge. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass ohne oder mit wenig Saccharose im Nährmedium sowie unter einer hohen Lichtintensität mehr Nodien gebildet werden. Die CO₂-Konzentration hat nur bei höherer Zuckerkonzentration einen Einfluss auf die Nodienbildung, wobei hier 5 % CO₂ von Bedeutung sind.

Ein ähnliches Ergebnis liegt von Morini und Melai (2003) vor: Sie führten Versuche mit Apfelkulturen unter einer Lichtintensität von 210 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF durch und kamen zu dem Schluss, dass bei 3 % Saccharose im Nährmedium unter erhöhter CO₂-Konzentration mehr Nodien gebildet werden als bei atmosphärischer CO₂-Konzentration. Allerdings war bei den gleichen Versuchen das Ergebnis mit Nährmedium ohne Zucker kontrovers, da hier mit CO₂-Anreicherung deutlich mehr Nodien gebildet wurden als bei atmosphärischer CO₂-Konzentration. Weiters kamen auch Pruski et al. (2002) zu dem Schluss, dass unter hohen Zuckerkonzentrationen und zusätzlicher CO₂-Zufuhr die meisten Nodien gebildet werden.

Ein ebenfalls kontroverses Ergebnis liegt von Sha Valli Khan et al. (2002) vor: Sie stellten fest, dass bei Kulturen von *Eucalyptus tereticornis* Smith unter einer geringen Lichtstärke, einem hohen Zuckergehalt im Medium und keiner

zusätzlichen CO₂-Zufuhr die meisten Nodien gebildet werden. Wenn zum Verschließen der Kulturgefäße Deckel mit einer Bohrung verwendet werden, berichteten Mohamed und Alsadon (2010) von den meisten neu gebildeten Nodien bei 2 % Saccharose im Medium.

Als ein weiterer Parameter der Untersuchungen wurde die **Blattzahl** evaluiert. Betrachtet man die Auswirkungen von Saccharosekonzentration und Lichtintensität auf die durchschnittliche Blattzahl pro Spross bei 5 % CO₂, so ist zu erkennen, dass weder die Lichtintensitäten noch die Saccharosekonzentrationen einen Einfluss hatten. Kombiniert man die Zuckerkonzentrationen und die Lichtstärken bei 0 % CO₂, so war die Blattzahl ohne Saccharose im Nährmedium am höchsten, während sie mit steigender Saccharosekonzentration gesunken ist. Die Lichtintensitäten zeigten hier keine Auswirkungen. Die Betrachtung der CO₂- und Zuckerkonzentrationen bei jeder Lichtstärke für sich zeigt bei 40 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF ohne Saccharose im Medium unter atmosphärischer CO₂-Konzentration eine deutlich höhere Blattzahl als bei 3 % Zucker. Die beiden CO₂-Konzentrationen waren nur bei Fehlen von Saccharose im Medium von Bedeutung, wobei hier 0 % CO₂ zu einer höheren Blattzahl führte. Auch unter 100 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF wurden bei atmosphärischer CO₂-Konzentration ohne Saccharose im Medium mehr Blätter gebildet als bei 3 % Saccharose. Allerdings war hier die Blattzahl mit 5 % CO₂ bei 3 % Saccharose im Medium größer als mit 0 % CO₂. Bei einer Lichtintensität von 200 µM·m⁻²·s⁻¹ PPF spielten die unterschiedlichen CO₂-Konzentration keine wesentliche Rolle bei der Blattbildung. Kein oder 1 % Zucker im Medium führten unter atmosphärischer CO₂-Konzentration zu den größten Blattzahlen. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die meisten Blätter ohne oder mit wenig Saccharose im Medium gebildet werden. Unter 0 % CO₂ ist die Blattzahl ohne Saccharose, unter 5 % CO₂ mit 3 % Saccharose am größten. Die Lichtintensität hat keinen Einfluss auf die Blattzahl.

Badr et al. (2011) konnten in ihren Versuchen mit *Solanum tuberosum* ebenfalls zeigen, dass die meisten Blätter bei atmosphärischer CO₂-Konzentration unter Verwendung eines saccharosefreien Nährmediums gebildet werden. Auch Nguyen und Kozai (2001) erzielten mit einem Medium ohne Zucker eine höhere Blattzahl

bei *Musa* spp. Ebenfalls eine höhere Blattzahl mit saccharosefreiem Medium, allerdings unter erhöhter CO₂-Zufuhr, erreichten Mosalleanon et al. (2004).

Von einem kontroversen Ergebnis berichten Saldanha et al. (2013). Brasilianischer Ginseng bildet die meisten Blätter unter Verwendung eines Nährmediums mit 3 % Saccharose. Arigita et al. (2010) berichteten ebenfalls von einer höheren Blattzahl unter Verwendung von Nährmedien mit höherem Zuckergehalt. Im Gegensatz dazu konnten Mitra et al. (1998) keinen Zusammenhang von Saccharosekonzentrationen im Medium und Blattzahl feststellen. Dass mit steigender Lichtintensität auch die Blattzahl höher ist, zeigten Kitaya et al. (1995).

In einer Studie von Tisserat et al. (1997) wurde das Wachstum von Karotten, Zitrusfrüchten, Gemüsekohl, Gartensalat, Garten-Rettich und Paradeiser unter verschiedenen CO₂-Konzentrationen und unterschiedlichen Zuckergehalten im Nährmedium untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass unter allen CO₂-Konzentrationen ein Zuckergehalt von 5 % im Medium das Wachstum negativ beeinflusst. Da in der vorliegenden Arbeit die Parameter Nodienzahl, Blattzahl, Sprosslänge und Frischgewicht mit zunehmender Saccharosekonzentration im Medium abnehmen, könnte es möglich sein, dass ein höherer Zuckergehalt im Nährmedium auch auf das Pappelwachstum hemmend wirkt. Ein Versuch mit 4 oder 5 % Saccharose wäre deshalb empfehlenswert, um negative Auswirkungen der Saccharose auf das Pappelwachstum auszuschließen. Ein weiterer Grund für die Abnahme der oben genannten Parameter könnte die Akkumulation von Ethylen in den Kulturgefäßen sein. Buddendorf-Joosten und Woltering (1996) stellten in ihren Versuchen mit Zitrusfrüchten und Gemüse fest, dass eine Zugabe von Ethylen die Werte bestimmter Parameter senkte. Die Produktion von Ethylen durch *Populus tremula* in in vitro-Kulturen wurde in einer Studie von Gonzáles et al. (1997) bestätigt. Allerdings kann bei der Gattung *Populus* Ethylen je nach Konzentration im Kulturgefäß sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Entwicklung der Explantate haben. Um den Einfluss von Ethylen auf die verwendete Pappel-Hybride 741 zu untersuchen, wäre es sinnvoll, in weiterführenden Versuchen den Ethylengehalt im Kulturgefäß zu messen und dessen Auswirkung auf das Pappelwachstum näher zu betrachten.

Die **Blattfläche** war ein weiterer Parameter der Auswertung. Betrachtet man die Auswirkungen von Saccharosekonzentration und Lichtintensität auf die Blattfläche bei 5 % CO₂, so ist zu erkennen, dass bei jenen Explantaten, die auf Nährmedium mit Saccharose kultiviert wurden, eine Lichtintensität von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF zu signifikant größeren Blättern führte als 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF. Außerdem ist mit steigender Saccharosekonzentration auch die Blattfläche tendenziell gestiegen. Kombiniert man Saccharosekonzentrationen und Lichtstärken bei 0 % CO₂, war die Blattfläche mit 2 % Saccharose im Medium unter 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF signifikant größer als bei 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF. Die verschiedenen Saccharosekonzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Blattfläche. Die Betrachtung der CO₂- und Zuckerkonzentrationen bei jeder Lichtstärke für sich zeigte weder Auswirkungen von Saccharose noch von CO₂ auf die Blattfläche. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass für die Blattfläche nur die Lichtintensität von Bedeutung ist. Die größten Blattflächen werden unter 100 und 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf Nährmedium mit Saccharose erzielt.

So war auch bei Xiao und Kozai (2004) die Blattfläche von *Cunninghamia lanceolata* unter einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF auf Nährmedium mit 3 % Saccharose größer als unter 50 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und ohne Saccharose im Medium. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Kanechi et al. (1998), die im Vergleich von photoautotrophen und konventionellen Kulturen von *Brassica oleracea* unter 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF und 2 % Zucker im Medium die größten Blattflächen erzielten. Allerdings hatte hier eine niedrigere (atmosphärische) CO₂-Konzentration größere Blätter zur Folge. Dass die Lichtintensität Auswirkungen auf die Blattflächen hat, zeigten Kitaya et al. (1995) in ihrer Studie. Mit steigender Lichtintensität waren auch die Blattflächen größer.

Ein kontroverses Ergebnis liegt von Zhang et al. (2009) vor, bei deren Versuchen die Blattflächen unter einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF am kleinsten waren. Xiao und Kozai (2006), Mosaleeyanon et al. (2004) sowie Shin et al. (2013) berichteten ebenfalls von größeren Blattflächen bei Verwendung eines saccharosefreien Nährmediums. Buddendorf-Joosten und Woltering (1996) verzeichneten unter 5 % CO₂-Konzentration die größten Blätter.

Der **Chlorophyllgehalt** der Blätter war der letzte Parameter der Auswertung. Betrachtet man die Auswirkungen von Saccharosekonzentration und Lichtintensität auf den Chlorophyllgehalt der Blätter bei 5 % CO₂, so ist zu erkennen, dass bei allen Lichtstärken tendenziell mit steigendem Zuckergehalt im Medium auch der Chlorophyllgehalt der Blätter gestiegen ist. Die Lichtintensität von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF hatte bei allen Zuckerkonzentrationen einen geringeren Chlorophyllgehalt der Blätter zur Folge als die beiden anderen Lichtstärken. Kombiniert man die Saccharosekonzentrationen und die Lichtstärken bei 0 % CO₂, stieg der Chlorophyllgehalt der Blätter bei 100 und 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF mit steigender Saccharosekonzentration im Medium. Bei 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF hatte der Zuckergehalt keinen Einfluss auf den Chlorophyllgehalt. Die Lichtintensitäten spielten nur bei fehlender Saccharose im Medium eine Rolle. Hier war der Chlorophyllgehalt der Blätter bei der geringsten Lichtstärke signifikant höher als bei der höchsten Lichtstärke. Die Betrachtung der CO₂- und Zuckerkonzentrationen bei jeder Lichtstärke für sich zeigt bei 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF unter 5 % CO₂ bei 2 und 3 % Saccharose einen höheren Chlorophyllgehalt als bei atmosphärischer CO₂-Konzentration. Mit 3 % Saccharose war der Chlorophyllgehalt unter 5 % CO₂ signifikant höher als bei keiner Saccharose im Nährmedium. Die Lichtstärke von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF hatte bei beiden CO₂-Konzentrationen einen höheren Chlorophyllgehalt mit saccharosehaltigem Nährmedium zur Folge. Der Unterschied zwischen beiden CO₂-Konzentrationen war hier nicht signifikant. Dasselbe Bild zeigte sich auch bei einer Lichtstärke von 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass der Chlorophyllgehalt der Blätter von höheren Zuckerkonzentrationen im Medium, höheren CO₂-Konzentrationen und einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF positiv beeinflusst wird.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Kanechi et al. (1998), die bei Kulturen von *Brassica oleracea* unter höheren Lichtintensitäten, 2 % Saccharose im Medium und CO₂-Anreicherung den größten Chlorophyllgehalt zu verzeichnen hatten. Auch Cournac et al. (1991) haben den größten Chlorophyllgehalt von *Solanum tuberosum* unter Verwendung eines saccharosehaltigen Nährmediums gemessen. In Versuchen

von Guo et al. (2014) zeigte sich ebenfalls, dass der Chlorophyllgehalt mit erhöhter CO₂-Konzentration steigt.

Oft wirken sich Zuckerkonzentrationen, die sonst das Wachstum der in vitro-Kulturen unterstützen sollen, negativ auf den Chlorophyllgehalt aus. Dies ist von der verwendeten Pflanzenart abhängig. Beispielsweise ist der Chlorophyllgehalt von Karotten bei 2-8 % Saccharose im Nährmedium hoch, während der Chlorophyllgehalt von Spinat auf saccharosefreiem Medium am höchsten ist (Thorpe et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit scheint ein höherer Zuckergehalt im Medium einen positiven Einfluss auf den Chlorophyllgehalt von Pappelblättern zu haben.

In der Literatur ist auch von kontroversen Ergebnissen zu lesen: Zhang et al. (2009) stellten bei Vergleichen von photoautotrophen und konventionellen in vitro-Kulturen von *Momordica grosvenori* fest, dass der Chlorophyllgehalt unter Saccharosekonzentrationen von 3 % im Gegensatz zu Abwesenheit von Saccharose im Medium signifikant geringer ist. Auch Couceiro et al. (2006) beobachteten einen höheren Chlorophyllgehalt bei photoautotrophen *Hypericum perforatum* Kulturen. Zu dieser Erkenntnis kamen auch Xiao und Kozai (2006) in Versuchen mit *Limonium latifolium*. Mosalleanon et al. (2004) verzeichneten in Kulturen von *Samanea saman* Merr. ebenfalls einen höheren Chlorophyllgehalt mit weniger Saccharose im Nährmedium.

5. Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die photoautotrophe in vitro-Kultivierung einer Pappel-Hybride. Vertreter der Gattung *Populus* sind über die nördliche Hemisphäre weit verbreitete Holzpflanzen und zählen zur Familie der Salicaceae. Aufgrund ihres schnellen und üppigen Wachstums werden sie nicht nur in der Holz- und Papierindustrie verwendet, sondern werden auch als vielversprechende, erneuerbare Energieträger der Zukunft angesehen. Die in vitro-Kultivierung stellt eine gute Möglichkeit dar, die steigende Nachfrage das ganze Jahr über zu decken. Jedoch bringt die Methode der konventionellen Gewebekultur auch einige Nachteile mit sich, die durch die Etablierung der photoautotrophen in vitro-Kultivierung weitestgehend beseitigt wurden. So kommt es unter photoautotrophen Kulturbedingungen zu weniger physiologischen und morphologischen Fehlbildungen, höheren Bewurzelungsraten und höheren Überlebensraten ex vitro durch funktionsfähige Stomata.

Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit war die Findung optimaler Bedingungen zur Etablierung einer photoautotrophen in vitro-Kultur der Pappel-Hybride 741. Dazu wurden die Auswirkungen der Saccharosekonzentration im Nährmedium (0, 1, 2 oder 3 %), Lichtintensität (40, 100 und 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF) und CO_2 -Konzentration der Atmosphäre (0 oder 5 %) auf das Wachstum der Kulturen untersucht. Die sechs Parameter Sprosslänge, Frischgewicht, Nodienzahl, Blattzahl, Blattfläche und Chlorophyllgehalt der Blätter dienten zur Beurteilung der Kulturentwicklung.

Die beiden höheren Lichtintensitäten hatten einen positiven Einfluss auf Blattfläche, Nodienzahl und Frischgewicht. Weiters waren 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF für den Chlorophyllgehalt und 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF für die Sprosslänge vorteilhaft. Nur auf die Blattzahl hatte die Lichtstärke keine Auswirkungen. 5 % CO_2 -Gehalt der Atmosphäre hatte einen hohen Chlorophyllgehalt der Blätter, eine höhere Nodienzahl bei zuckerhaltigen Nährmedien sowie eine höhere Blattzahl bei 3 % Saccharose zur Folge. Hingegen war die Blattzahl bei 0 % CO_2 und saccharosefreiem

Medium am höchsten. Die unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen zeigten auf Blattfläche, Frischgewicht und Sprosslänge keine Auswirkungen. Keine oder wenig Saccharose wirkten sich positiv auf Blattzahl, Nodienzahl und Frischgewicht aus. Der Chlorophyllgehalt der Blätter war mit steigender Saccharosekonzentration am höchsten. Während die Sprosse ohne Saccharose im Nährmedium am längsten waren, war Saccharose für große Blattflächen essentiell.

Es konnten tendenziell aussichtsreiche Ergebnisse zur Etablierung von photoautotrophen in vitro-Kulturen des Pappel-Hybrids 741 erzielt werden, in erster Linie im Hinblick auf eine hohe Lichtintensität und eine höhere CO₂-Konzentration. Im Rahmen der Versuche wurden an allen Explantaten Wurzeln gebildet, die jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Möglicherweise haben photoautotrophe Kulturbedingungen Einfluss auf die Bewurzelung. Dies sollte in weiterführenden Versuchen analysiert werden. Weiters könnten höhere Saccharosekonzentrationen negative Auswirkungen auf das Pappelwachstum haben, deshalb wären entsprechende Versuche mit 4 oder 5 % Saccharose empfehlenswert. Es wäre schlussendlich auch interessant, den Einfluss des von den Explantaten produzierten Ethylens auf das Wachstum der Pappel-Hybride 741 zu untersuchen.

6. Summary

The topic of the present study is the photoautotrophic in vitro-cultivation of a poplar-hybrid. Members of the genus *Populus* belong to the Salicaceae family and are woody plants widely distributed over the northern hemisphere. Due to their fast and profuse growth poplars are not only used in the timber and paper industry, they are also considered as a renewable energy source of the future. The in vitro-cultivation represents a good possibility to supply the increasing demand for poplars. However, the conventional micropropagation has some disadvantages which have been eliminated as far as possible by the establishment of the photoautotrophic in vitro-cultivation. Under photoautotrophic culture conditions there are less physiological and morphological malformation, higher rooting rates and higher survival rates ex vitro due to functional stomata.

The object of the present study was the determination of optimal culture conditions for the establishment of a photoautotrophic in vitro-culture of the poplar-hybrid 741. Therefore the effects of sucrose concentration in the culture medium (0, 1, 2 or 3 %), light intensity (40, 100 or 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF) and CO_2 -concentration of the ambient atmosphere (0 or 5 %) on the growth of the cultures were investigated. The six parameters shoot length, fresh weight, number of nodes per shoot, number of leaves per shoot, leaf area and chlorophyll content of the leaves were used for the evaluation of the development of the cultures.

The two higher light intensities had a positive effect on leaf area, number of nodes per shoot and fresh weight. Moreover, 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF were advantageous for the chlorophyll content of the leaves and 200 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF for the shoot length. The light intensity had no effect on the number of leaves per shoot.

5 % CO_2 in the air resulted in higher chlorophyll content of the leaves, a higher number of nodes per shoot with sugar containing media as well as a higher number of leaves per shoot on media with 3 % sugar. Under 0 % CO_2 the number of leaves was highest by using sugar free medium. The different CO_2 concentrations had no effect on leaf area, fresh weight and shoot length.

Low or no sugar had a positive impact on number of leaves, number of nodes per shoot and fresh weight. The chlorophyll content of the leaves was higher with increasing sucrose concentration. While shoots with no sugar in the media were the longest, sucrose was essential for large leaf areas.

Promising results for the establishment of photoautotrophic in vitro-cultures of the poplar-hybrid 741 could be obtained primarily with regard to a high light intensity and higher CO₂-concentrations. Within the experiment all explants formed roots, which however were not analyzed more closely in the present study. Photoautotrophic culture conditions may have effects on rooting, this should be explored in a further study. Moreover, higher sucrose concentrations could have a negative impact on poplar growth. Therefore experiments with 4 or 5% sucrose are recommended. Finally, it would be interesting to investigate the influence of ethylene produced by the explants on the growth of poplar-hybrid 741.

7. Literaturverzeichnis

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 as a New Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 61-90

Arigita L., Cañal J., Tamés R. S., González A. (2010), CO₂-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the in vitro culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson), In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant **46**: 312-322

Badr A., Angers P., Desjardins Y. (2011), Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization, Plant Cell Tissue Organ Cult. **107**: 13-24

Buddendorf-Joosten J.M.C., Woltering E.J. (1996), Controlling the gaseous composition in vitro - description of a flow system and effects of the different gaseous components on in vitro growth of potato plantlets, Sci. Hortic. **65**: 11-23

Cha-um S., Somsueb S., Samphumphuang T., Kirdmanee C. (2014), Screening of Eight Eucalypt Genotypes (*Eucalyptus* sp.) for Water Deficit Tolerance Using Multivariate Cluster Analysis, Appl. Biochem. Biotechnol. **173**: 753-764

Cha-um S., Ashraf M., Kirdmanee C. (2010), Screening upland rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica) genotypes for salt-tolerance using multivariate cluster analysis, African J. Biotechnol. **9**: 4731-4740

Couceiro M.A., Afreen F., Zobayed S.M.A., Kozai T. (2006), Enhanced growth and quality of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic in vitro conditions, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant **42**: 278-282

Cournac L., Dimon B., Carrier P., Lohou A., Chagvardieff P. (1991), Growth and Photosynthetic Characteristics of *Solanum tuberosum* Plantlets Cultivated in Vitro in

Different Conditions of Aeration, Sucrose Supply, and CO₂ Enrichment, *Plant Physiol.* **97**: 112-117

Debbache-Benaida N., Atmani-Kilani D., Schini-Keirith V.B., Djebbli N., Atmani D. (2013), Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, antiinflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent, *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* **3**: 697-704

Deng R., Donnelly D.J. (1993), In Vitro Hardening of Red Raspberry by CO₂ Enrichment and Reduced Medium Sucrose Concentration, *Hortscience* **28**: 1048–1051

Djomo S., Kasmioui O., Ceulemans R. (2011), Energy and greenhouse gas balance of bioenergy production from poplar and willow: a review, *GCB Bioenergy* **3**: 181–197

Gindler N., Diplomarbeit, Univ. Wien, in Vorbereitung

González A., Arigita L., Majada J., Sánchez Tamés R. (1997), Ethylene involvement in in vitro organogenesis and plant growth of *Populus tremula* L., *Plant Growth Regul.* **22**: 1–6

Guo H., Sun Y., Li Y., Liu X., Zhang W., Ge F. (2014), Elevated CO₂ decreases the response of the ethylene signaling pathway in *Medicago truncatula* and increases the abundance of the pea aphid, *New Phytol.* **201**: 279-291

Hamzeh M., Dayanandan S. (2004), Phylogeny of *Populus* (Salicaceae) based on Nucleotide Sequences of Chloroplast TRNT-TRNF Region and nuclear rDNA, *Am. J. Bot.* **91**: 1398–1408

Hanak M. (2014), Studies on Poplar-Endophyte-Interactions with Plant-Growth-Promoting Effects, Dissertation, Univ. Wien

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

Kanechi M., Ochi M., Abe M., Inagaki N., Maekawa S. (1998), The Effects of Carbon Dioxide Enrichment, Natural Ventilation, and Light Intensity on Growth, Photosynthesis, and Transpiration of Cauliflower Plantlets Cultured in vitro Photoautotrophically and Photomixotrophic, J. Am. Soc. Hortic. Sci. **123**: 176-181

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

Kitaya Y., Fukuda O., Kozai T., Kirdmanee C. (1995), Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets in vitro, Sci. Hortic. **62**: 15-24

Konica Minolta (2009), Chlorophyllmeter SPAD-502 Instruction Manual, Konica Minolta, Japan

Kozai T., Koyama Y., Watanabe I. (1988), Multiplication of potato plantlets in vitro with sugar medium under high photosynthetic photon flux, Acta Hort. **230**: 121-127

Kozai T. (2005) Introduction, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 1-5

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

Kozai T., Kubota C. (2005a), Units and terminology use for the studies of photoautotrophic micropropagation, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 7-18

Kozai T., Kubota C. (2005b) Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.), Photoautotrophic

(sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 19-30

Kubota C. (2001), Concepts and background of photoautotrophic micropropagation, in Morohoshi N., Komamine A. (Hrsg.), Molecular Breeding of Woody Plants, Elsevier Science B.V., Amsterdam, S. 325-333

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

Lucchesini M., Montefori G., Mensuali-Sodi A., Serra G. (2006), Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different in vitro culture conditions, *Biol. Plant.* **50**: 161-168

McCown B.H. (1997), Poplar Shoot Cultures: Their Generation and Use in Biotechnology, USDA Forest Service General Technical Report RM-GTR-297, Chapter 1

Mitra A., Dey S., Sawarkar S.K. (1998), Photoautotrophic in vitro multiplication of the orchid *Dendrobium* under CO₂ enrichment, *Biol. Plant.* **41**: 145-148

Mohamed M. A.-H., Alsadon A.A. (2010), Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets, *Sci. Hortic.* **123**: 295–300

Morini S., Melai M. (2003), CO₂ dynamics and growth in photoautotrophic and photomixotrophic apple cultures, *Biol. Plant.* **47**: 167-172

Mosaleeyanon K., Cha-um S., Kirdmanee C. (2004), Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets in vitro under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium, *Sci. Hortic.* **103**: 51–63

Müller A., Volmer K., Mishra-Knyrim M., Polle A. (2013), Growing poplars for research with and without mycorrhizas, *Front. Plant Sci.* 4 (AUG), Article number 332

Nathiya S., Pradeepa D., Devasena T., Senthil K. (2013), Studies on the effect of sucrose, light and hormones on micropropagation and in vitro flowering of *Withania Somnifera* Var. JAWAHAR-20, *The Journal of Animal and Plant Science* **23**: 1391-1397

Nguyen Q.T., Kozai T. (2001), Growth of in vitro banana (*Musa* spp.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **37**: 824–829

Noël N., Leplé J.-C., Pilate G. (2002), Optimization of in vitro micropropagation and regeneration for *Populus x interamericana* and *Populus x euramericana* hybrids (*P. deltoides*, *P. trichocarpa*, and *P. nigra*), *Plant Cell Rep.* **20**: 1150-1155

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

Saldanha C.W., Otoni C.G., Notini M.M., Kuki K.N., Ferreira da Cruz A.C., Neto A.R., Dias L.L.C., Otoni W.C. (2013), A CO₂-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen], *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **49**: 433–444

Schnur P. (2013), Untersuchungen zur Etablierung von photoautotrophen in vitro-Kulturen der Pappel (*Populus* sp.), Diplomarbeit, Univ. Wien

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

Shin K.-S., Park S.-Y., Paek K.-Y. (2013), Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of in vitro plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant **49**: 445-454

Thach Phan C., Jörgensen J., Jouve L., Hausman J.-F., Polle A., Teichmann T. (2004), Micropropagation of *Populus euphratica* Olivier, Belg. J. Bot. **137**: 175-180

Thorpe T., Stasolla C., Yeung E.C., de Klerk G.-J., Roberts A., George E.F. (2005), The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems, in George E. F., Hall M. A., de Klerk G.-J. (Hrsg.), Plant Propagation by Tissue Culture, 3. Auflage, Springer, Dordrecht, S. 115-175

Tisserat B., Herman C., Silman R., Bothast R.J. (1997), Using ultra-high carbon dioxide levels enhances plantlet growth in vitro, HortTechnology **7**: 282-289

Tisserat B., Silman R. (2000), Interactions of culture vessels, media volume, culture density, and carbon dioxide levels on lettuce and spearmint shoot growth in vitro, Plant Cell Rep. **19**: 464–471

Veramendi J., Villafranca M.J., Sota V., Mingo-Castel A.M. (1997), Gelrite as an alternative to agar for micropropagation and microtuberization of *Solanum tuberosum* L. CV. Baraka, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant **33**: 195-199

Wang K., Zhang J., Ping S., Ma Q., Chen X., Xuan H., Shi J., Zhang C., Hu F. (2014), Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus × canadensis*), J. Ethnopharmacol. **155**: 300-311

Warburg O., Geissler A.-W., Lorenz S. (1962), Neue Methode zur Bestimmung der Kohlensäuredrucke über Bicarbonat-Carbonatgemischen, in Warburg O. (Hrsg.), Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden, Thieme, Stuttgart, S. 578-581

Xiao Y., Lok Y. H., Kozai T. (2003), Photoautotrophic growth of sugarcane plantlets in vitro as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **39**: 186–192

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 statice plantlets using sugar-free media, *Sci. Hortic.* **109**: 71–77

Xiao Y., Niu G., Kozai T. (2011), Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **105**: 149-158

Xu Q., Wang Y., Guo S., Shen Z., Wang Y., Yang L. (2014), Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*, *J. Ethnopharmacol.* **152**: 540-545

Zhang M., Zhao D., Ma Z., Li X., Xiao Y. (2009), Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity, *Hortscience* **44**: 757-763

Zhao X., Zheng H., Li S., Yang C., Jiang J., Liu G. (2014), The rooting of poplar cuttings: a review, *New For.* **45**: 21-34

Ziauka J., Kuusiene S., Silininkas M. (2013), Fast growing aspens in the development of a plant micropropagation system based on plant-produced ethylene action, *Biomass Bioenerg.* **53**: 20-28

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Silvia Schuhleitner

Geburtsort: Horn

Geburtsdatum: 8. April 1989

Staatsbürgerschaft: Österreich



Bildungsweg

1995 – 1999 Volksschule Maissau

1999 – 2003 Informatikhauptschule Ziersdorf

2003 – 2008 Bundeshandelsakademie Hollabrunn

seit Oktober 2008 Studium der Pharmazie, Universität Wien

März 2014 – Juli 2014 Durchführung der praktischen Arbeiten zur
Diplomarbeit, Department für Pharmakognosie