



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Klonale Vermehrung der mongolischen Arzneipflanze
Lancea tibetica Hook. f. et Thoms.“

verfasst von

Katrin Prenner

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

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Ass. Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie die stets freundliche und kompetente Betreuung bedanken.

Großer Dank gebührt Herrn Mag. Florian Gössnitzer, der mich in die Arbeitstechniken der pflanzlichen Gewebekultur einführte und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden und meiner Familie, die durch ihren seelischen Beistand großen Anteil am Abschluss dieses Studiums haben.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MS	Murashige und Skoog (1962)
½ MS	Medium nach Murashige und Skoog (1962) mit halber Konzentration an Makroelementen
MMS	modifiziertes MS-Medium
BAP	6-Benzylaminopurin
KIN	Kinetin
IAA	Indol-3-Essigsäure
IBA	Indol-3-Buttersäure
NAA	α-Naphthylessigsäure
TDZ	Thidiazuron
IVS	in vitro soil-less

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Material und Methoden.....	5
2.1.	Pflanzenmaterial	5
2.2.	Nährmedien	6
2.3.	Kulturbedingungen.....	7
2.4.	Kulturauswertung	8
3.	Ergebnisse	12
3.1.	Einfluss der Cytokinine auf verschiedene Genotypen	12
3.1.1.	<i>Einfluss von Benzylaminopurin</i>	12
3.1.2.	<i>Einfluss von Kinetin</i>	20
3.1.3.	<i>Kultivierungsdauer und Vermehrungsrate</i>	27
3.2.	Versuche zur Sprossbewurzelung	32
3.2.1.	<i>Versuche auf Medien mit Naphthylelessigsäure</i>	33
3.2.2.	<i>Versuche mittels Pulsbehandlung</i>	36
3.3.	Vorversuche zur Akklimatisierung	41
4.	Diskussion.....	44
5.	Zusammenfassung	52
6.	Summary	54
7.	Literaturverzeichnis	56
	Curriculum Vitae	61

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Bei *Lancea tibetica* Hook. f. et Thoms. handelt es sich um eine mehrjährige Krautdroge, die unter anderem in der Mongolei, China und Indien beheimatet ist. Von Mai bis August ist sie leicht an ihren charakteristischen violett bis bläulichen Blüten zu identifizieren (Abb. 1). Einerseits scheint die Art feuchte Gebiete wie Sümpfe oder Moore zu bevorzugen, andererseits ist sie auch auf Weideflächen zu finden, da die nicht schmackhaften Blätter von den Tieren gemieden werden. Ob die Pflanze wirklich Feuchtigkeit braucht ist noch unklar, da sie auch häufig auf eher trockenen und sandigen Böden zu entdecken ist (Kletter und Kriechbaum, 2001). Seit kurzem gehört sie gemeinsam mit *Lancea hirsuta* (Su et al., 1999) der Familie der Mazaceae an, wobei beide Arten alleinige Vertreter dieser Familie sind. Davor zählten sie zu den Scrophulariaceae.



**Abbildung 1: *Lancea tibetica*,
Hengduan Mountains Region (China)
Credit: Harvard University Herbaria**

In der traditionellen tibetischen Medizin ist sie *L. tibetica* unter dem Namen "SPA YAG RTSA BAG" bekannt und findet in der Volksmedizin breite Anwendung, sowohl in der Prävention als auch in der Therapie zahlreicher Erkrankungen. Die gesamte Pflanze und speziell die Blätter werden beispielsweise zur innerlichen und auch äußerlichen Wundheilung eingesetzt. Die Wurzel unterstützt die Heilung von Lungenerkrankungen. Die Früchte werden als effektiv in der Behandlung von Erkrankungen des Herzens betrachtet (Kletter und Kriechbaum, 2001).

Phytochemische Untersuchungen führten zur Identifizierung zahlreicher Inhaltsstoffe wie z.B. Phenylpropane, Lignane, Flavonoide, Terpenoide und Steroide. Die pharmakologischen Effekte werden hauptsächlich den Phenylpropanglykosiden und Lignan zugeordnet (Song et al., 2011).

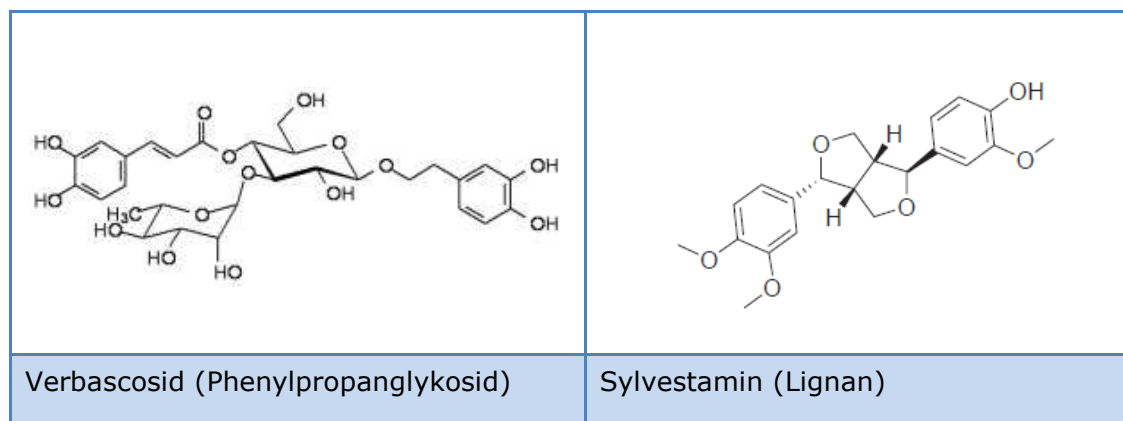


Abbildung 2: Wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe von *L. tibetica*

Studien zeigen, dass das Phenylpropanglykosid Verbascosid (Abb. 2) starke antitumorale Wirkung besitzt (Li et al., 2008). Das aus der Pflanze isolierte Sylvestamin zeigt ebenfalls antitumorale und außerdem antioxidative Aktivität in vitro (Miao et al., 2004; Su et al., 1999).

Gegenwärtig intensiv phytochemisch untersucht, kam es in jüngster Zeit zur Isolation eines neuen Trehaloseester (Liu et al., 2014). Im Vergleich mit Cisplatin als Positivkontrolle zeigte dieser Inhaltsstoff eine ausgeprägte Zytotoxizität gegen Zellen der NCI-H460 Linie mit einem IC_{50} Wert von 16.2 mM (Cisplatin: 29.6 mM).

Aufgrund der vielfachen Verwendungsmöglichkeiten und da der Großteil des Drogenmaterials aus Wildsammlung stammt, nehmen die natürlichen Bestände der in ihrer Heimat äußerst begehrten Pflanze ab. Weiters führen menschliche und umweltbedingte Einflüsse wie vermehrte Besiedlung, Klimawandel, Eingriffe in das

Ökosystem etc. zum Verlust von Habitaten. Die Pflanze befindet sich bereits seit längerer Zeit in der Kategorie „*Critically Endangered*“ der Roten Liste der Mongolei (Mongolian Red List of Plants, 2011).

Daher ist es von großer Bedeutung, die natürlichen Bestände zu schützen und nachhaltig zu nutzen. Neben der GAPD-konformen Wildsammlung (GAPD - Good Agricultural and Collection Practice, Leitlinie für die gute Praxis des Anbaus und der Wildsammlung; World Health Organization, 2003) bietet sich die kontrollierte Feldkultur an. Die pflanzliche Biotechnologie ermöglicht hierbei eine schnelle Vermehrung im großen Maßstab zur Produktion von Setzlingen für die Kultivierung.

Den Grundstein zur Mikrovermehrung von *Lancea tibetica* legte Dr. Davaakhuu Gaamaa (Department of Biology, National University of Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolei) im Sommersemester 2013. Sie keimte in der Mongolei gesammelte Samen am Department der Pharmakognosie der Universität Wien unter sterilen Bedingungen und etablierte die erhaltenen Pflänzchen auf verschiedenen Nährmedien. Diese Vorversuche brachten erste wichtige Erkenntnisse zur in vitro-Kultivierung von *L. tibetica*. Nachfolgend arbeiteten Nguyen (2015) und Osmen (2015) an der Ausarbeitung eines Vermehrungsprotokolls. In der vorliegenden Arbeit sollten einerseits weitere Untersuchungen zur in vitro-Vermehrung unternommen, und andererseits auch Versuche zur Sprossbewurzelung und Akklimatisierung durchgeführt werden. Die Versuche zu Vermehrung und Sprossbewurzelung sollten auf den Ergebnissen von vorangegangenen Arbeiten basieren. Dort hatte sich gezeigt, dass verschiedene Genotypen unterschiedlich auf die eingesetzten Wachstumsstoffe reagieren. Dieser Umstand sollte in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden. Da Bewurzelungsversuche mit den Auxinen Indolylbuttersäure (IBA)

und Indolylessigsäure (IAA) bislang nicht erfolgreich waren (Nguyen, 2015; Osmen, 2015), sollte diesbezüglich die 1-Naphthylelessigsäure (NAA), ein stärkeres Auxin, zum Einsatz kommen. Erstmals sollte auch eine Akklimatisierung von in vitro-gezogenen Pflanzen durchgeführt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 PFLANZENMATERIAL

Das Pflanzenmaterial wurde von Dr. Davaakhuu Gaamaa (Department of Biology, National University of Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolei) zur Verfügung gestellt. Samen aus der Provinz Huvsvugal Aimag in der Mongolei waren nach Oberflächensterilisation in vitro gekeimt und die so erhaltenen Pflänzchen auf Nährmedien nach Murashige und Skoog (MS) mit unterschiedlichen Cytokinin in verschiedenen Konzentrationen etabliert worden. Die besten Ergebnisse bezüglich Wachstum und Vermehrung wurden auf einem Medium mit 1 μ M Kinetin erhalten, dieses diente daher als vorläufiges Standardmedium zur Weitervermehrung (siehe Abb. 3).

In der vorliegenden Arbeit wurden mit den Klonen 5b, 9b, 9c, 11a und 11b Versuche durchgeführt.



Abbildung 3: Stammkultur *Lancea tibetica*

2.2 NÄHRMEDIEN

Die Kultivierung erfolgte auf dem MS-Standardnährmedium nach Murashige und Skoog (1962).

Die Zusammensetzung der Nährmedien wurde durch Zugabe von Wuchsstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen variiert.

Für die Versuche zur Vermehrungsrate wurden die Cytokinine Kinetin und Benzylaminopurin (BAP), welche das Sprosswachstum induzieren, zugesetzt. Hier wurden als Explantate Nodien verwendet, die Stichprobengröße betrug $n = 15$ für jedes Nährmedium. Jedes Cytokinin wurde in Konzentrationen von 0,5, 1 und 5 μM getestet, ein wuchsstofffreies MS-Medium diente als Kontrolle.

Die Bewurzelungsversuche wurden auf Medien mit 1-Naphthyllessigsäure (NAA) in Konzentrationen von 1 oder 5 μM durchgeführt, die Stichprobengröße betrug wiederum $n = 15$, als Explantate dienten dabei etwa 15 mm lange Sprossspitzen.

Zur Bewurzelung über Pulsbehandlung wurden Sprosse für 30 s in eine 10 mM wässrige Lösung von IBA oder NAA getaucht und anschließend auf $\frac{1}{2}$ MS Medium (MS Medium mit halber Konzentration an Makroelementen) ohne Wuchsstoffe inokuliert. Die Hälfte der Nährmedien wurde mit dabei mit 1 % Aktivkohle versetzt. Auch hier betrug die Stichprobengröße $n = 15$.

Bei der Herstellung der Nährmedien wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zuerst wurde bidestilliertes Wasser in einen Erlenmeyerkolben gefüllt und die anorganischen Komponenten sowie Vitaminlösung und Spurenelemente in Form von Stammlösungen dazu pipettiert. Anschließend wurden die festen Komponenten wie myo-Inosit und Saccharose darin gelöst. Der entsprechende Wachstoffs wurde ebenfalls in Form einer Stammlösung zugesetzt. Zuletzt gab man nach und nach Gelrite[®] (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) dazu und achtete darauf, dass sich dieses homogen verteilte. Abschließend stellte man den pH-Wert mit KOH bzw. HCl auf $5,7 \pm 0,1$ ein. Jeweils 40 ml Nährmedium wurden in Kulturgefäße abgefüllt und diese 20 min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert.

Zur Akklimatisierung wurden bewurzelten Sprosse in ein Gemisch aus Torf + Perlit (Hordiculture grade P500, Korngröße 3-6 mm) im Verhältnis von 4+1 (v/v) in Multitopfplatten (Topfdurchmesser 46 mm) eingepflanzt.

2.3 KULTURBEDINGUNGEN

Die Kultivierung erfolgte in Gläsern der Firma Hipp, diese waren 95 mm hoch und hatten einen Durchmesser von 60 mm (siehe Abb. 4, S. 8). Verschluss wurden die Gläser mit Magenta B-Caps[®] der Firma Sigma.



Abbildung 4: Hipp-Glas mit 40 ml Nährmedium

Pro Glas wurden 3 Explantate inokuliert, pro Wachstoffsstoffkonzentration wurden 5 Gläser beimpft. Der Stichprobenumfang betrug demzufolge $n = 15$.

Die Kultivierung erfolgte in einer Klimakammer bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sylvana Gro-Lux© Lampen) bei einem Langtag von 16 h.

Die Akklimationisierung erfolgte bei einer anfänglichen relativen Luftfeuchtigkeit von 80 %. Nach einer Periode von 2 Wochen wurde die relative Luftfeuchtigkeit auf 60 % abgesenkt.

2.4 KULTURAUSWERTUNG

Die Auswertung erfolgte je nach Versuch geringfügig unterschiedlich.

AUSWERTUNG DER VERSUCHE ZUR VERMEHRUNGSRATE

Die Nodienkulturen wurden nach einer Kulturperiode von 7 Wochen ausgewertet. Falls sich Cluster, also Aggregate zahlreicher Sprosse (siehe Abb. 5, S. 9), gebildet hatten, wurden diese zuerst zerteilt (Abb. 6, S. 9). Anschließend wurde die Länge der einzelnen Sprosse vermessen, die Sprossanzahl bestimmt sowie Nodien und

eventuell gebildete Wurzeln gezählt. Sprossspitzen galten dabei nicht als Nodien. Auch die Länge der Wurzeln wurde bestimmt, etwaige Seitenwurzeln wurden dabei nicht berücksichtigt.



Abbildung 5:
Clusterbildung aus einem
Nodienexplantat von *L. tibetica*
nach 7 Wochen auf MS-Medium mit
5 µM Kinetin (Klon 5b)

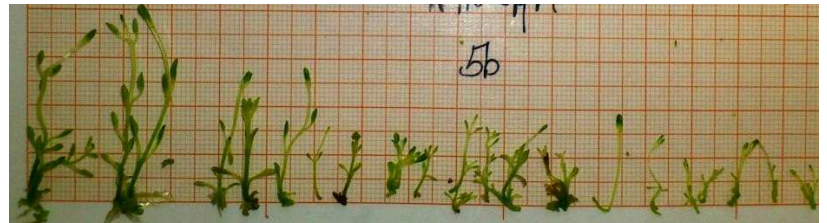


Abbildung 6: Zerteilter Cluster von *L. tibetica*

Da es öfter zur Kallusbildung (Abb. 7) kam, wurde der Durchmesser vermessen, um die Auswirkung der eingesetzten Wuchsstoffe darauf nachvollziehen zu können. Weiters wurde vermerkt, ob die Sprosse hyperhydratisiert waren. Merkmale sind beispielsweise glasige Sprosse (Abb. 8). Diese morphologische Störung (Debergh und Maene, 1984), welche hauptsächlich die Blätter betrifft, beeinträchtigt Photosynthese und Gasaustausch, wodurch die Pflänzchen eine Akklimatisierung nicht überleben würden.



Abbildung 7: Kallusbildung
(dedifferenziertes Gewebe) an einem
Sprosssegment von *L. tibetica* nach
5 Wochen auf MS + 1 µM NAA
(Klon 5b)



Abbildung 8:
hyperhydratisierter
Spross von *L. tibetica*
nach Pulsbehandlung
mit NAA und 5 wöchiger
Kultivierung auf ½ MS

Zusammenfassend wurden folgende Merkmale erfasst:

positive Merkmale:	✗ Sprosszahl ✗ Nodienzahl ✗ Sprosslänge ✗ Wurzelbildung
negative Merkmale:	✗ Hyperhydratisierung ✗ Kallus ✗ Kallusdurchmesser

AUSWERTUNG DER VERSUCHE ZU BEWURZELUNG UND AKKLIMATISIERUNG

Die Sprosskulturen wurden nach einer Kultivierungsdauer von 5 Wochen ausgewertet. Neben Vermessung der Länge von Spross und Hauptwurzeln wurde auch die Anzahl der Wurzeln bestimmt und vermerkt, ob es zur Hyperhydratisierung oder Kallusbildung kam.

In einem ersten Vorversuch wurden die Sprosse bereits nach 2 Wochen Kultivierungsdauer ausgewertet.

positive Merkmale:	✗ Sprosslänge ✗ Wurzelzahl ✗ Wurzellänge
negative Merkmale:	✗ Hyperhydratisierung ✗ Kallus ✗ Kallusdurchmesser

Die statistische Auswertung aller Versuche erfolgte mit dem Programm Statistica (Version 6.1.) der Firma StatSoft Inc., USA. Es wurden Mittelwerte und Standardfehler berechnet, die Varianz ermittelten wir mittels einer mehrfaktoriellen Analyse und anschließend Duncan´s Multiple Range Test.

3. ERGEBNISSE

3.1 EINFLUSS DER CYTOKININE AUF VERSCHIEDENE GENOTYPEN

3.1.1 EINFLUSS VON BENZYLAMINOPURIN

Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Wochen erfolgte die Auswertung der Nodienkulturen. Die nachfolgenden Abbildungen 9-12 (Seite 13) zeigen die Kulturen von Klon 9c auf dem Kontrollmedium (MS) sowie auf den Medien mit BAP in den Konzentrationen von 0,5 – 5 μ M.

Die Abbildungen 13-16 auf Seite 14 zeigen die Kulturen von Klon 11a nach einer Kultivierungsdauer von 7 Wochen auf den oben genannten Medien.

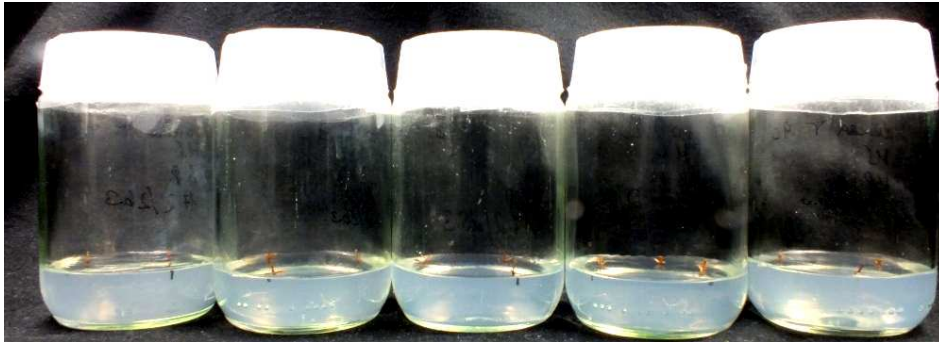


Abbildung 9: Nodienexplantate von Klon 9c nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS (ohne BAP)



Abbildung 10: Nodienexplantate von Klon 9c nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 0,5 µM BAP



Abbildung 11: Nodienexplantate von Klon 9c nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 1 µM BAP



Abbildung 12: Nodienexplantate von Klon 9c nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 5 µM BAP



Abbildung 13: Nodienexplantate von Klon 11a nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS (ohne BAP)



Abbildung 14: Nodienexplantate von Klon 11a nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 0,5 µM BAP



Abbildung 15: Nodienexplantate von Klon 11a nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 1 µM BAP



Abbildung 16: Nodienexplantate von Klon 11a nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 5 µM BAP

Bei beiden Klonen starben die Nodien auf wachstoffsreifen Medien innerhalb kurzer Zeit ab (siehe Diagramm 1). Das lässt darauf schließen, dass bei Nodienexplantaten zugesetzte Wachstumsstoffe in den Medien für das Sprosswachstum essentiell sind.

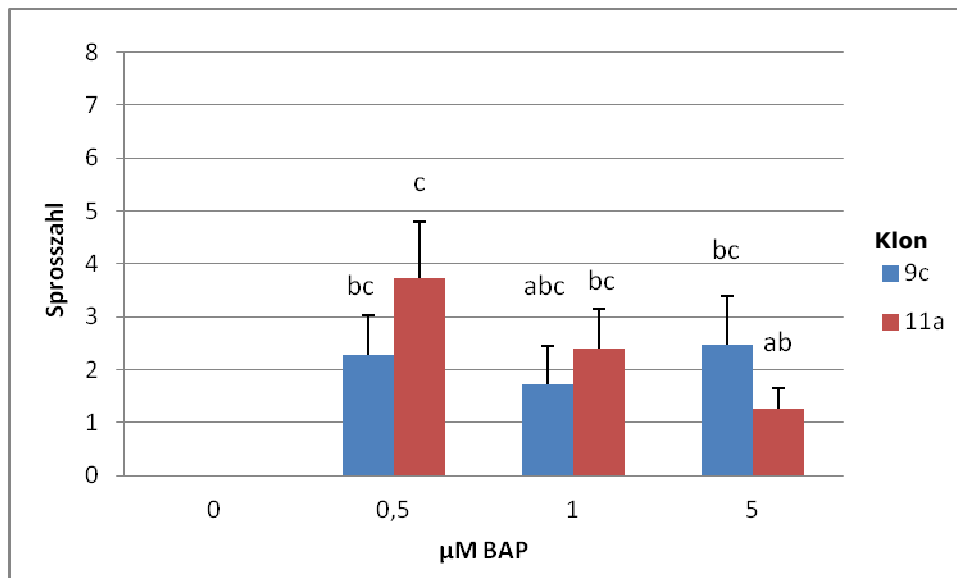


Diagramm 1: Durchschnittliche Anzahl neu gebildeter Sprosse auf BAP-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Bei Klon 11a konnte auf Medium mit 0,5 µM Kinetin die höchste Zahl an Sprossen (3,73 pro Explantat) generiert werden. Auf den anderen Medien blieb die Sprosszahl jeweils unter 3 pro Explantat. Die besonders für die Weitervermehrung relevante Zahl der gebildeten Nodien war ebenfalls mit durchschnittlich unter 2 Nodien pro Explantat (siehe Diagramm 2, Seite 16) nicht besonders hoch.

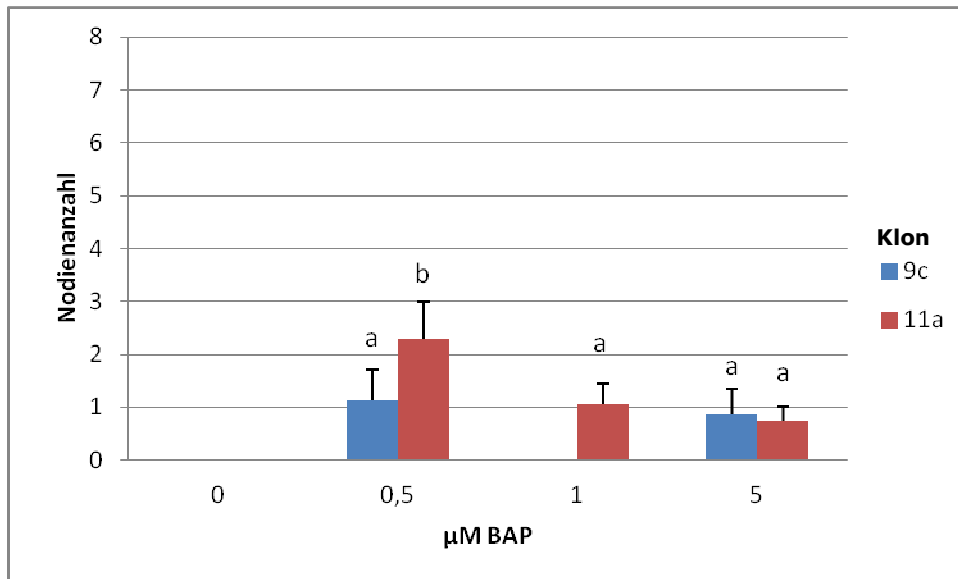


Diagramm 2: Anzahl gebildeter Nodien auf BAP-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Der Großteil der gebildeten Nodien wäre aufgrund der glasigen, filigranen Konsistenz ungeeignet für eine weitere Subkultivierung gewesen. Diese wurden daher nicht miteinbezogen. Nur Klon 11a erreichte auf dem Medium mit 0,5 µM BAP signifikant die höchste Zahl an Nodien (2,33 Nodien / Explantat, siehe Diagramm 2). Bei Klon 9c unterschied sich die Anzahl der gebildeten Nodien auf den verschiedenen Medien mit BAP nicht signifikant, bei einer Konzentration von 1 µM wurden keine verwertbaren Nodien gebildet.

Die gebildeten Sprosse wiesen nach 7 Wochen eine nur geringe Länge von durchschnittlich unter 10 mm auf (siehe Diagramm 3).

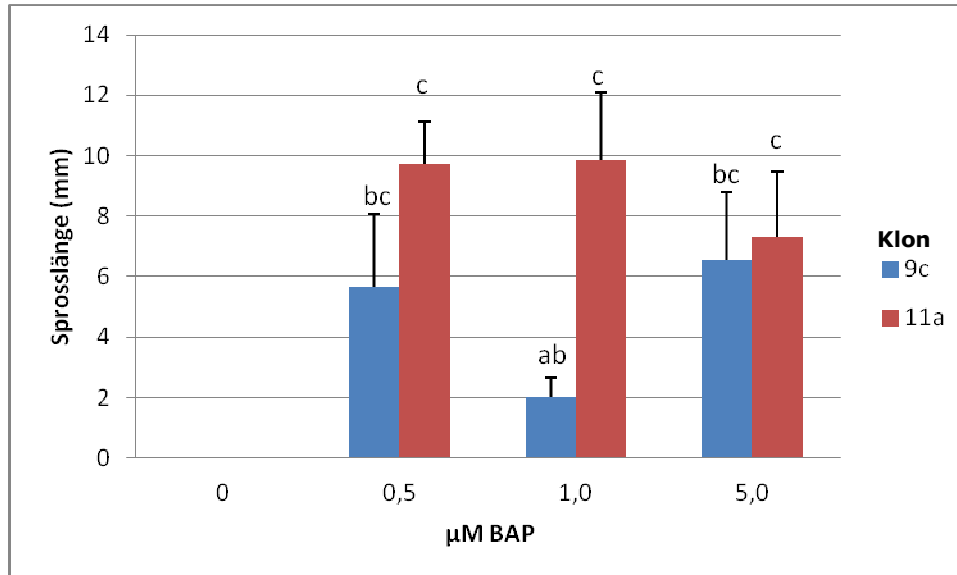


Diagramm 3: Durchschnittliche Länge der neu gebildeten Sprosse auf BAP-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen betrug sowohl bei Klon 9c als auch bei Klon 11a bei einer Konzentration von 1 µM BAP über 90 % (siehe Diagramm 4, Seite 18).

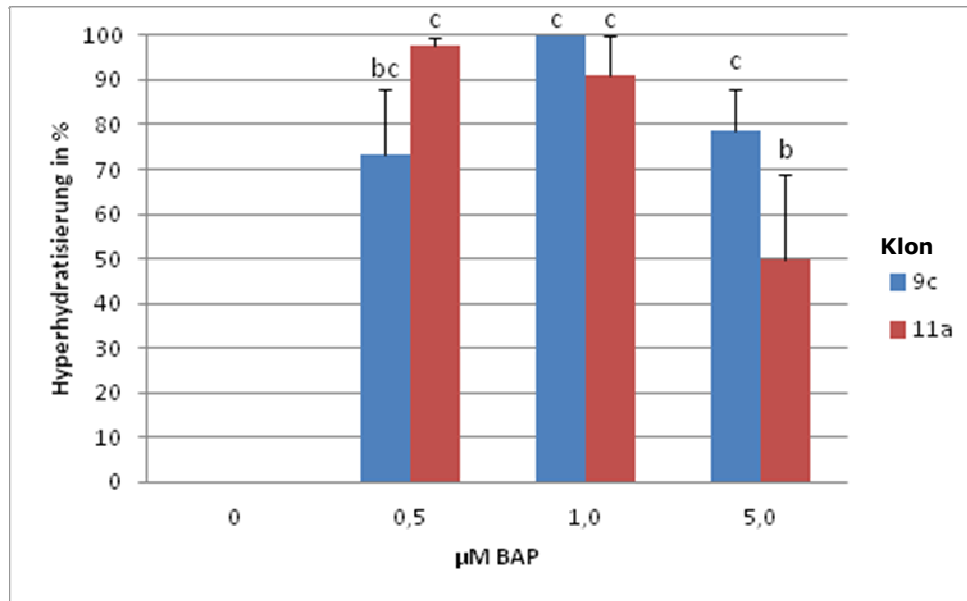


Diagramm 4: Anteil hyperhydratisierter Sprossen in % (BAP-Medien), Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Lediglich bei Nährmedien mit 5 µM BAP traten beim Klon 11a signifikant weniger häufig hyperhydratisierte Sprosse auf. Aber auch hier war der Anteil mit mindestens 50 % sehr hoch (Diagramm 4).

Auffallend bei der Auswertung der Medien mit BAP war, dass es zu fast keinem Sprosswachstum kam, sich jedoch häufig Kalli mit relativ großem Durchmesser bildeten (siehe Diagramm 5, Seite 19).

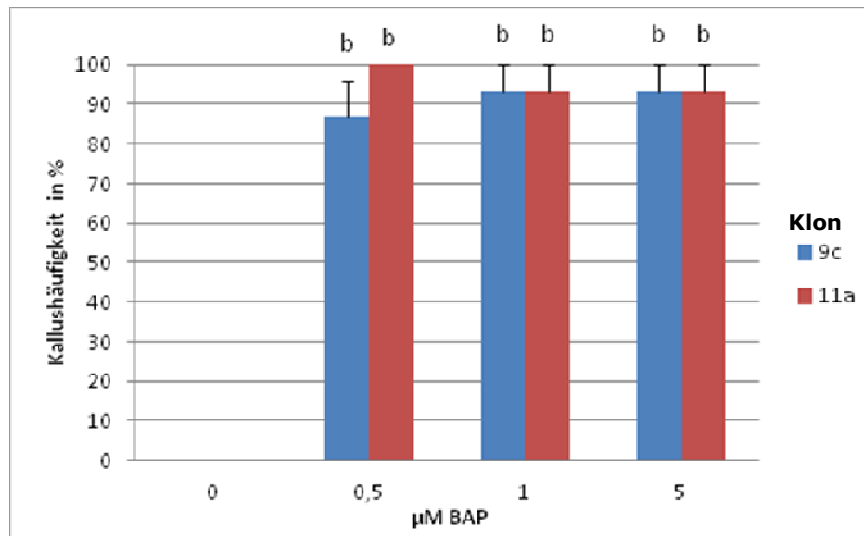


Diagramm 5: Anteil an Explantaten mit Kallusbildung auf BAP-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Diagramm 5 verdeutlicht, dass die Bildung von Kalli auf jedem der BAP-Medien bei nahezu 100 % lag, wobei der Durchmesser der Kallusaggregate relativ groß war (siehe Diagramm 6 und Abb. 17, S. 20).

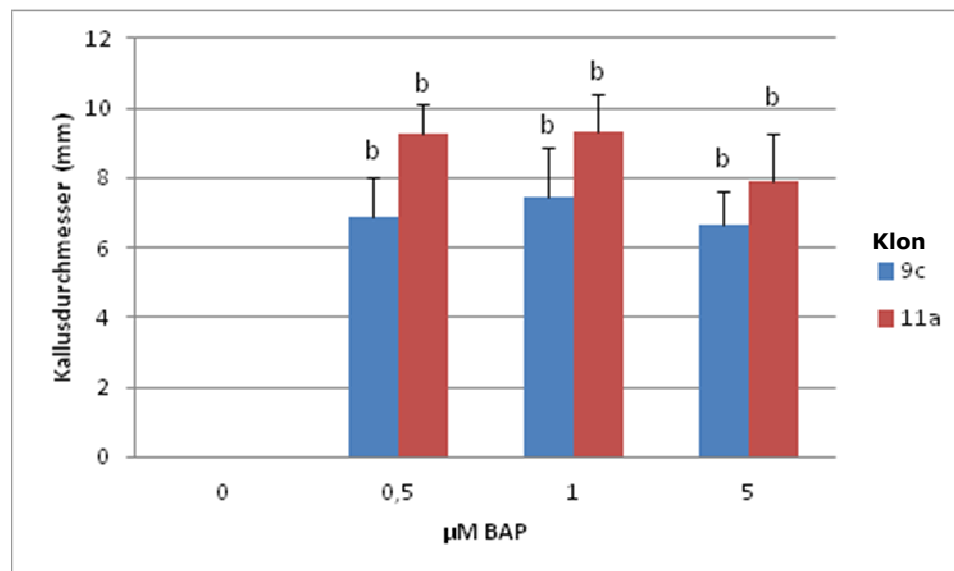


Diagramm 6: Durchschnittlicher Durchmesser der Kalli auf BAP-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die Kallusdurchmesser unterschieden sich auf den Medien mit den verschiedenen BAP-Konzentrationen nicht signifikant, sie betrugen durchschnittlich 6-9 mm. Aufgefallen ist hier, dass es trotz Braunfärbung und nachfolgendem Absterben der Nodien trotzdem häufig zur Kallusbildung kam (Abb. 17).



Abbildung 17: Kallusbildung an einem abgestorbenen Nodienexplantat von *L. tibetica* auf MS-Medium mit 1 µM BAP

3.1.2 EINFLUSS VON KINETIN

Während Nguyen Nodien der Klone 9b und 5b auf BAP hältige Medien inokuliert hatte (Nguyen, 2015), wurden die beiden Klone in Rahmen dieser Arbeit auf Kinetin hältige Medien gesetzt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden die Kulturen nach einer Kultivierungsdauer von 7 Wochen ausgewertet.

Die Abbildungen 18-21 auf Seite 21 zeigen die Pflänzchen des Klons 5b nach einer Kultivierungsperiode von 7 Wochen auf dem Kontrollmedium (MS) sowie auf den Medien mit Kinetin. Die Abbildungen 22-25 auf Seite 22 zeigen die entsprechenden Kulturen von Klon 9b.



Abbildung 18: Nodienexplantate von Klon 5b nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS (ohne Kinetin)



Abbildung 19: Nodienexplantate von Klon 5b nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 0,5 µM Kinetin



Abbildung 20: Nodienexplantate von Klon 5b nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 1 µM Kinetin



Abbildung 21: Nodienexplantate von Klon 5b nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 5 µM Kinetin



Abbildung 22: Nodienexplantate von Klon 9b, nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS (ohne Kinetin)



Abbildung 23: Nodienexplantate von Klon 9b nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 0,5 µM Kinetin



Abbildung 24: Nodienexplantate von Klon 9b nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 1 µM Kinetin



Abbildung 25: Nodienexplantate von Klon 9b nach 7 wöchiger Kultivierung auf MS + 5 µM Kinetin

Auf Medien mit Kinetin wurden durchschnittlich mehr Sprosse als auf den BAP-Medien gebildet.

Während bei Klon 5b die Medien mit 1 und 5 μM Kinetin in einer signifikant höheren Sprosszahl resultierten als die die beiden anderen Medien, gab es diesbezüglich beim Klon 9b keinen Unterschied (Diagramm 7).

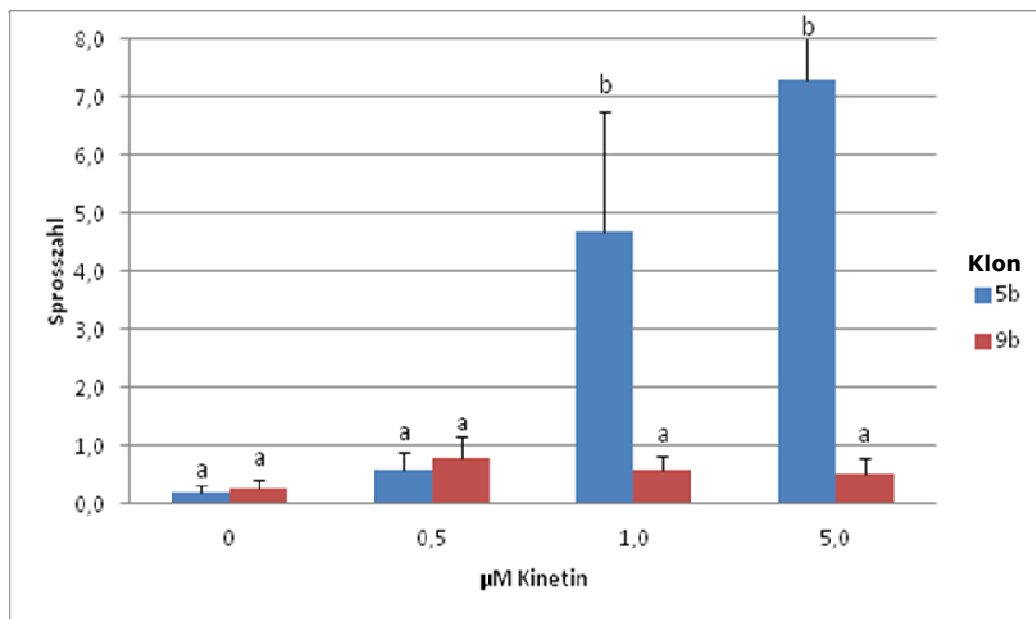


Diagramm 7: Durchschnittliche Sprosszahl auf Medien mit Kinetin, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

In einem Parallelversuch zeigte sich, dass die Kultivierungsdauer mit 7 Wochen noch zu kurz war. Darauf wird in Kapitel 3.1.3. (Seite 27) genauer eingegangen.

Da vor allem für die Weitervermehrung die Anzahl der gebildeten Nodien essentiell ist, wurde dies ebenfalls ausgewertet (Diagramm 8, Seite 24).

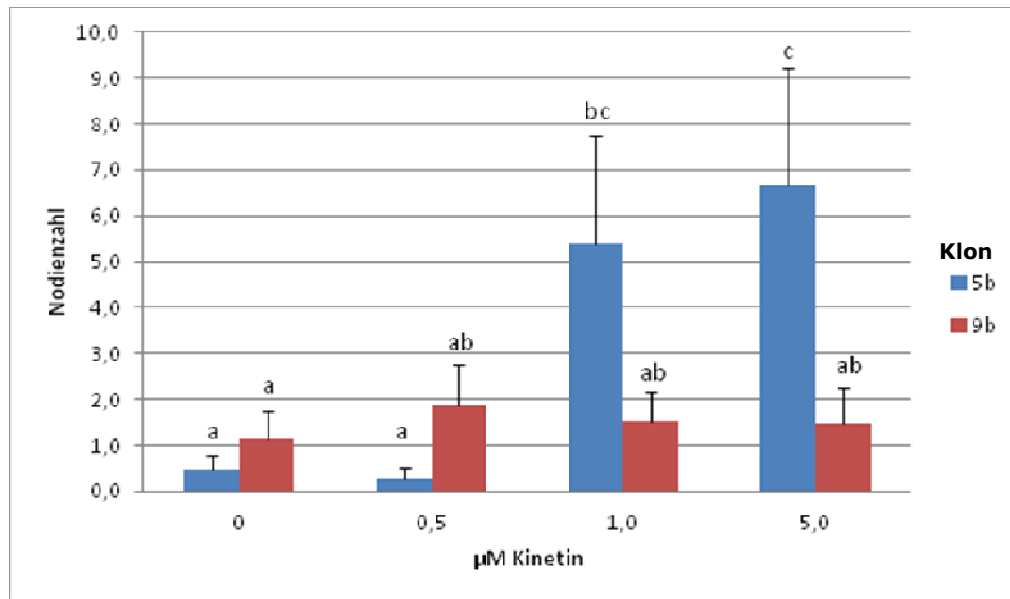


Diagramm 8: Anzahl durchschnittlicher gebildeter Nodien auf Medien mit Kinetin, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Da die Nodien auf hyperhydratisierten Sprossen oft zu filigran für das Überimpfen gewesen wären, wurden diese bei der Auswertung außer Acht gelassen. Bei Klon 9b ergab sich ein ähnliches Bild wie zuvor bei der Sprosszahl. Die auf den verschiedenen Kinetin-Medien ermittelte Nodienzahl unterschied sich nicht signifikant voneinander. Auf MS-Medium mit 5 µM Kinetin war bei Klon 5b mit 6,67 Nodien / Explantat signifikant die höchste Zahl an gebildeten Nodien erreicht worden (siehe Diagramm 8).

Die längsten Sprossen bildeten sich sowohl bei Klon 9b als auch bei Klon 5b auf MS ohne Kinetin (siehe Diagramm 9, S. 25).

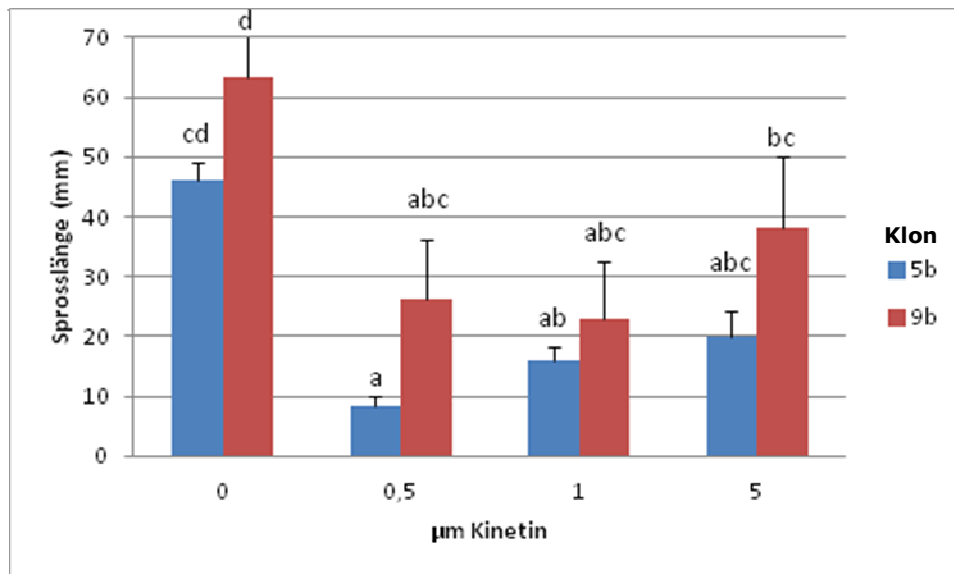


Diagramm 9: Durchschnittliche Länge von Sprossen auf Medien mit Kinetin, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Durchschnittlich erreichten die Sprosse auf den Kinetin-Medien eine Länge von 20 mm, also doppelt so lang wie auf den Medien mit BAP. Die Sprosse, die sich auf dem Kontrollmedium gebildet haben, waren mit einer Länge von über 45 mm signifikant am längsten.

Auch Kinetin induzierte bei *Lancea tibetica* eine hohe Hyperhydratisierungsrate (Diagramm 10, S. 26).

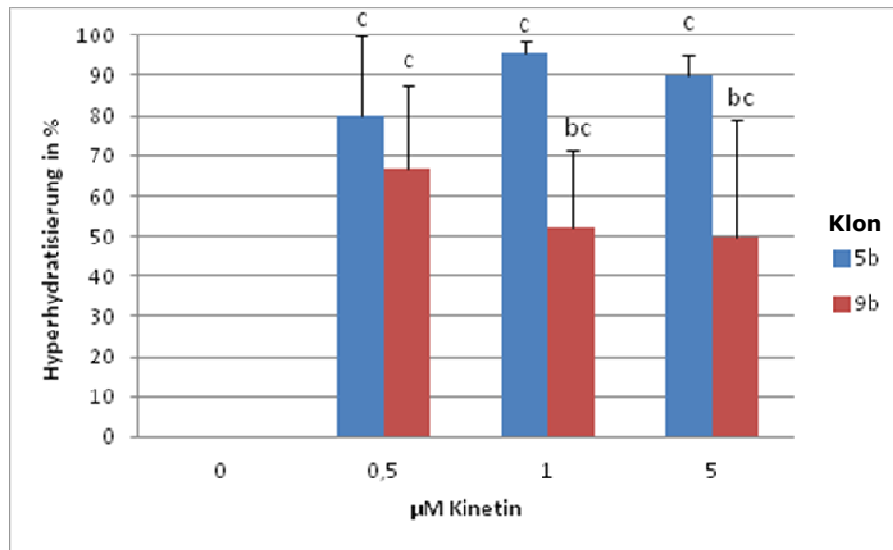


Diagramm 10: Anteil hyperhydratisierter Sprosse in % (Kinetin-Medien), Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die Kinetinkonzentration war dabei wieder unerheblich: Auf allen Medien betrug der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen bei beiden Klonen mehr als 50 %.

Bei Klon 9b kam es bei einer Konzentration von 0,5 µM Kinetin zur signifikant niedrigsten Kallushäufigkeit (siehe Diagramm 11).

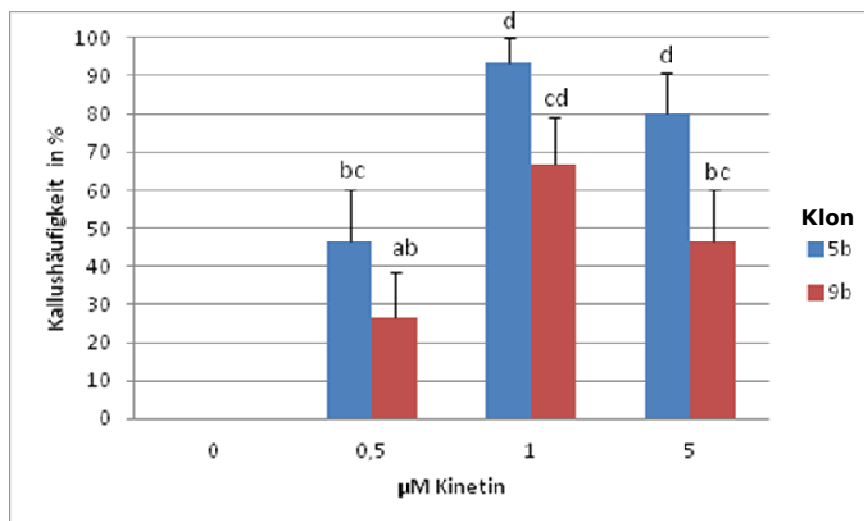


Diagramm 11: Anteil an Explantaten mit Kallusbildung auf Kinetin-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die gebildeten Kalli waren durchschnittlich 4 – 12 mm groß. Der signifikant größte Durchmesser von 12 mm wurde bei Klon 5b auf Medium mit 5 μ M Kinetin gebildet (Diagramm 12).

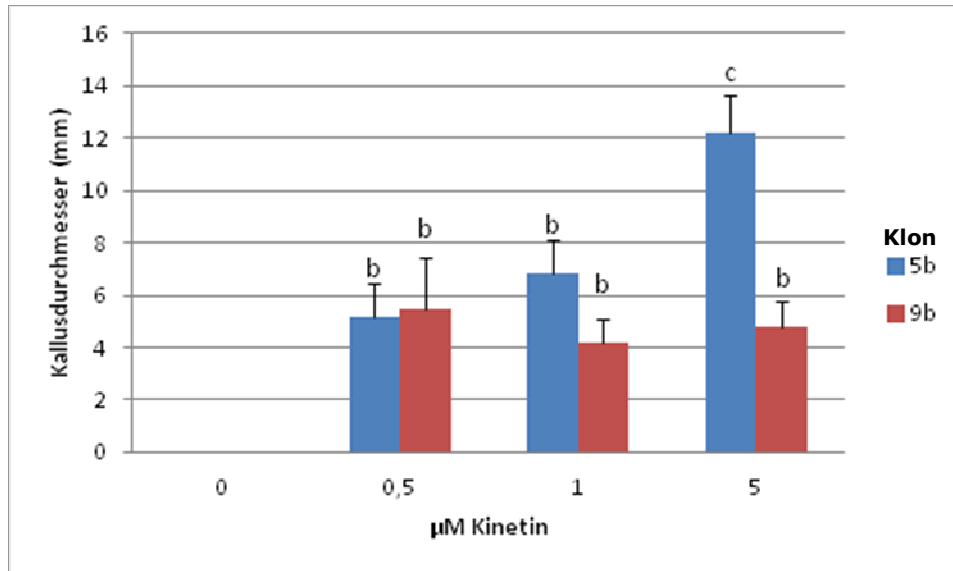


Diagramm 12: Durchschnittlicher Durchmesser der Kalli auf Kinetin-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

3.1.3 KULTIVIERUNGSDAUER UND VERMEHRUNGSRATE

Da die Sprosszahl nach einer Kultivierungsdauer von 7 Wochen noch nicht besonders hoch war, wurde das Wachstum während einer verlängerten Versuchsdauer weiter beobachtet. Nach 11 Wochen erfolgte wieder die Auswertung. Die Abbildungen 26-29 auf Seite 28 zeigen Kulturen des Klons 9b nach einer verlängerten Kultivierungsperiode auf dem MS-Kontrollmedium sowie auf den Medien mit 0,5 – 5 μ M Kinetin.



Abbildung 26: Nodienexplantate von Klon 9b nach 11 wöchiger Kultivierung auf MS (ohne Kinetin)



Abbildung 27: Nodienexplantate von Klon 9b nach 11 wöchiger Kultivierung auf MS + 0,5 µM Kinetin



Abbildung 28: Nodienexplantate von Klon 9b nach 11 wöchiger Kultivierung auf MS + 1 µM Kinetin



Abbildung 29: Nodienexplantate von Klon 9b nach 11 wöchiger Kultivierung auf MS + 5 µM Kinetin

Optisch sofort ersichtlich war die deutlich höhere Sprosszahl, die sich aufgrund vermehrter Clusterbildung ergab (siehe Abb. 30).

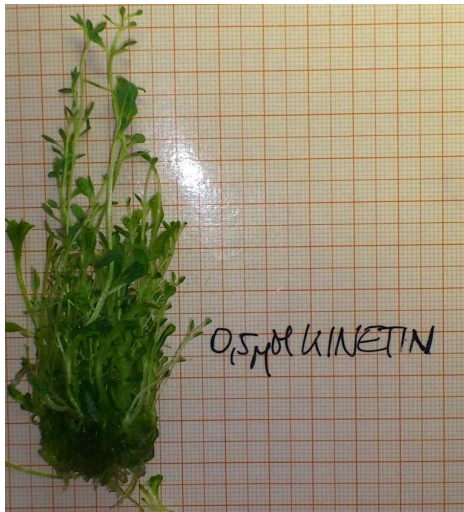


Abbildung 30: Clusterbildung (Aggregat aus zahlreichen Sprossen) aus einem Nodienexplantat von Klon 9b nach 11 wöchiger Kultivierung auf MS + 0,5 µM Kinetin

Grundsätzlich konnte die Dauer einer Passage nach mehreren Subkultivierungen auf den Medien verlängert werden. Während es zu Beginn bereits nach 7 Wochen nötig gewesen war, die Explantate auf frisches Medium zu transferieren, konnten diese nach mehreren Zyklen bis zu 11 Wochen auf den Medien belassen werden.

Es bildeten sich signifikant mehr Sprosse als nach einer Kultivierungsdauer von 7 Wochen (siehe Diagramm 13, Seite 30). Die Konzentration von Kinetin spielte dabei keine Rolle. Die Anzahl an Sprossen, die auf den verschiedenen Kinetin-Medien gebildet worden waren, unterschied sich nicht signifikant (5-8 Sprosse / Explantat).

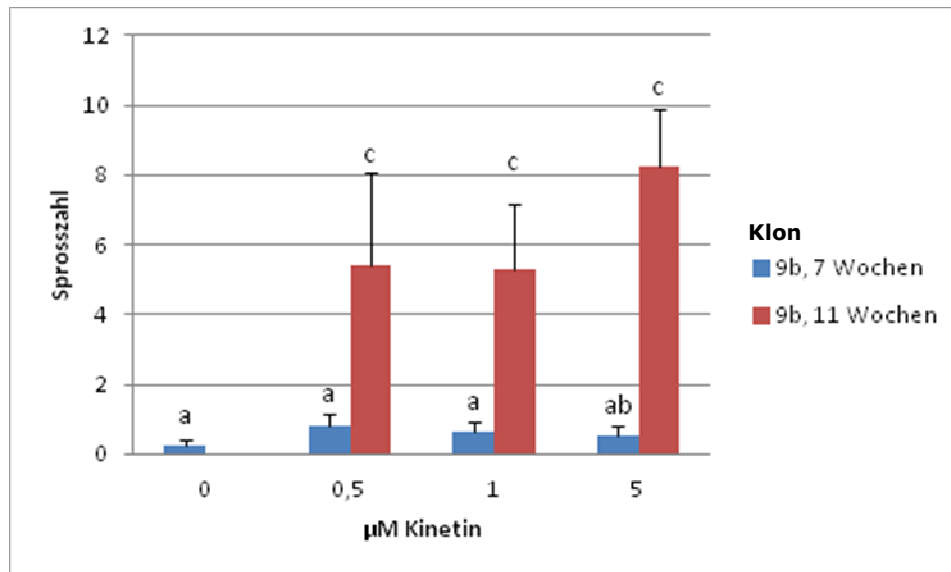


Diagramm 13: Vergleich der Sprosszahl nach 7 bzw. 11 Wochen auf Kinetin-Medien (Klon 9b), Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Auch die Nodienzahl war nach 11 Wochen deutlich höher (siehe Diagramm 14). Auf allen Medien mit Kinetin bildeten sich mindestens 8 Nodien, die für eine Subkultivierung verwendet werden konnten. Die Konzentration von Kinetin in den Medien hatte keine Auswirkung auf die Anzahl der gebildeten Nodien.

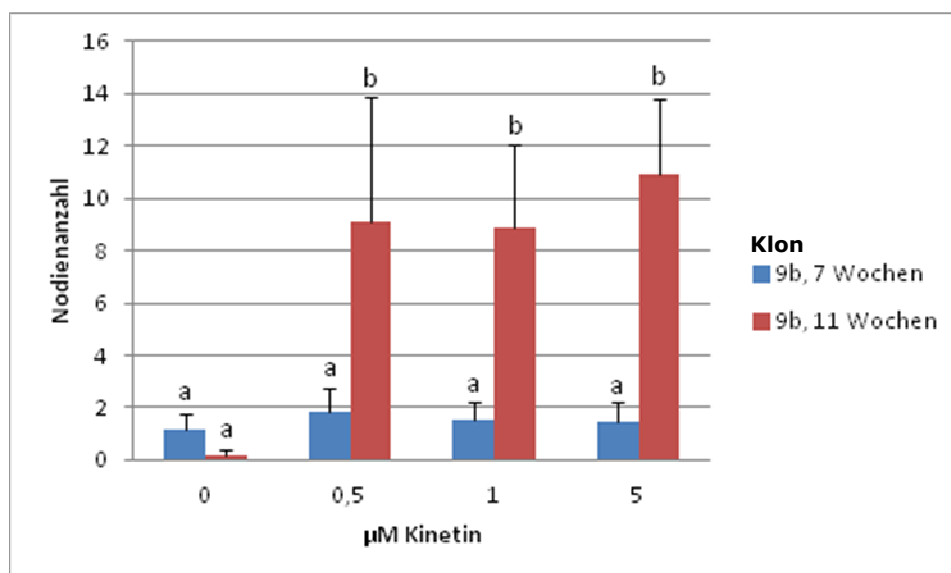


Diagramm 14: Vergleich der Nodienzahl nach 7 bzw. 11 Wochen auf Kinetin-Medien (Klon 9b), Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Die Länge der Sprosse unterschied sich auf den Kinetinmedien innerhalb der unterschiedlichen Kultivierungszeiträume nicht signifikant (siehe Diagramm 15).

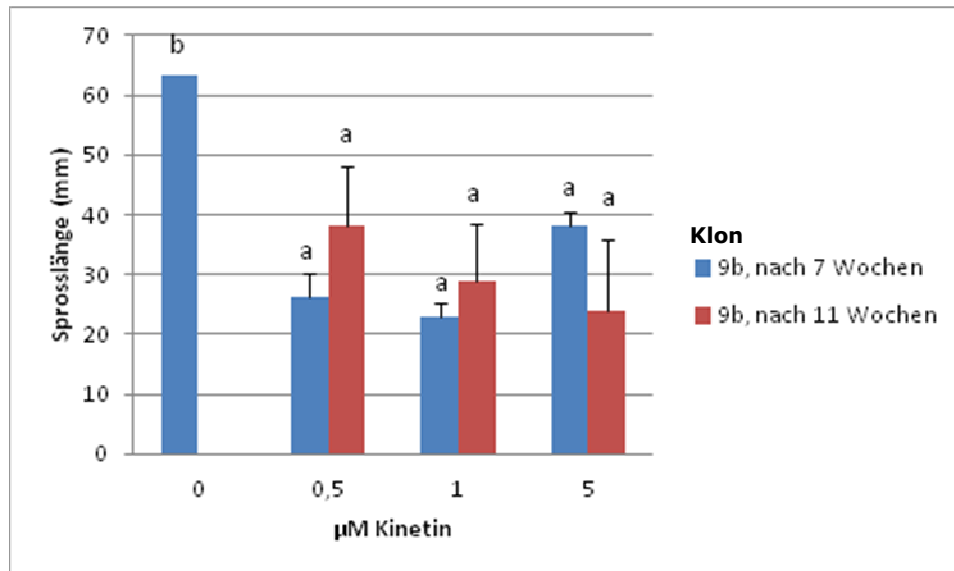


Diagramm 15: Sprosslängen (mm) nach 7 bzw. 11 Wochen auf Kinetin-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen war sowohl nach 7 als auch nach 11 Wochen mit über 50 % relativ hoch (siehe Diagramm 16, Seite 32).

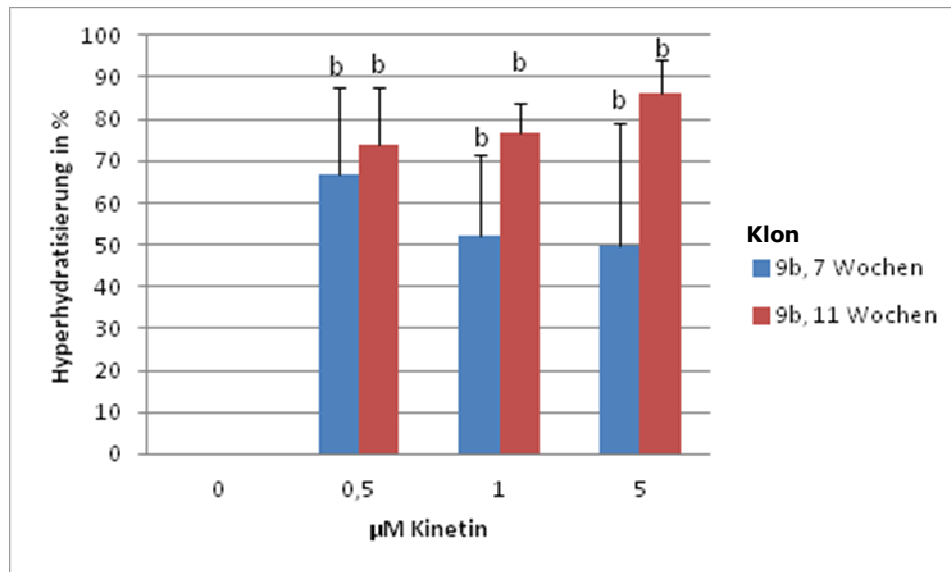


Diagramm 16: Anteil an hyperhydratisierten Sprossen nach 7 bzw. 11 Wochen auf Kinetin-Medien (Klon 9b), Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

3.2 VERSUCHE ZUR SPROSSBEWURZELUNG

In den vorangegangenen Arbeiten von Osmen (2015) und Nguyen (2015) hatte sich gezeigt, dass die Auxine Indolylbuttersäure (IBA) und Indolylelessigsäure (IAA) zur Bewurzelung von Sprossen nicht geeignet waren. In unseren Untersuchungen wurde daher das stärkere Auxin Naphthylelessigsäure (NAA) eingesetzt. Eine weitere Strategie war die Pulsbehandlung mit hochkonzentrierter Auxinlösung und anschließender Kultivierung auf Nährmedium ohne Wachstumsstoffe.

3.2.1 VERSUCHE AUF MEDIEN MIT NAPHTHYLESSIGSÄURE

Sprosse der Klone 9b, 5b und 11a wurden auf Medien mit NAA in den Konzentrationen von 1 und 5 μM inkubiert. Nach einer Kulturperiode von 5 Wochen erfolgte die Auswertung.

Bei den 3 Klonen kam es jeweils bei mehr als 40 % der Sprosse auf dem Kontrollmedium zur Wurzelbildung (siehe Diagramm 17).

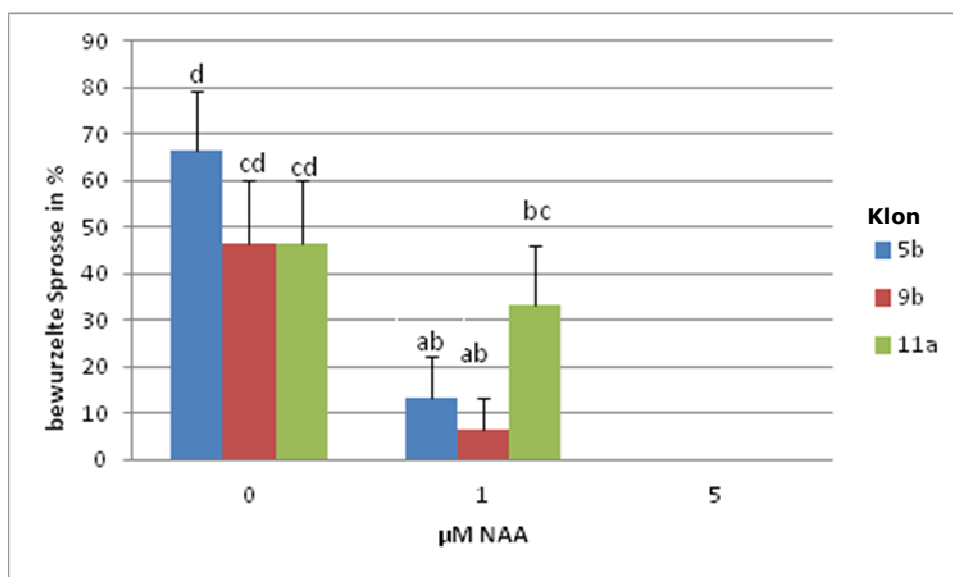


Diagramm 17: Prozentueller Anteil an bewurzelten Sprosse auf NAA-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Auch auf den Medien mit 1 μM NAA waren bewurzelte Sprosse zu finden, jedoch signifikant weniger als auf dem Medium ohne NAA. Eine Konzentration von 5 μM NAA schien bei *Lancea tibetica* nicht für die Wurzelinduktion geeignet zu sein: Es war keine einzige Wurzel gebildet worden, aber es kam häufig zur Kallusbildung.

Kalli bildeten sich in vergleichbarem Ausmaß auf den Medien mit 1 bzw. 5 μM NAA. Auf dem Kontrollmedium kam es bei allen 3 Klonen zur geringsten Kallusbildung (siehe Diagramm 18, S. 34).

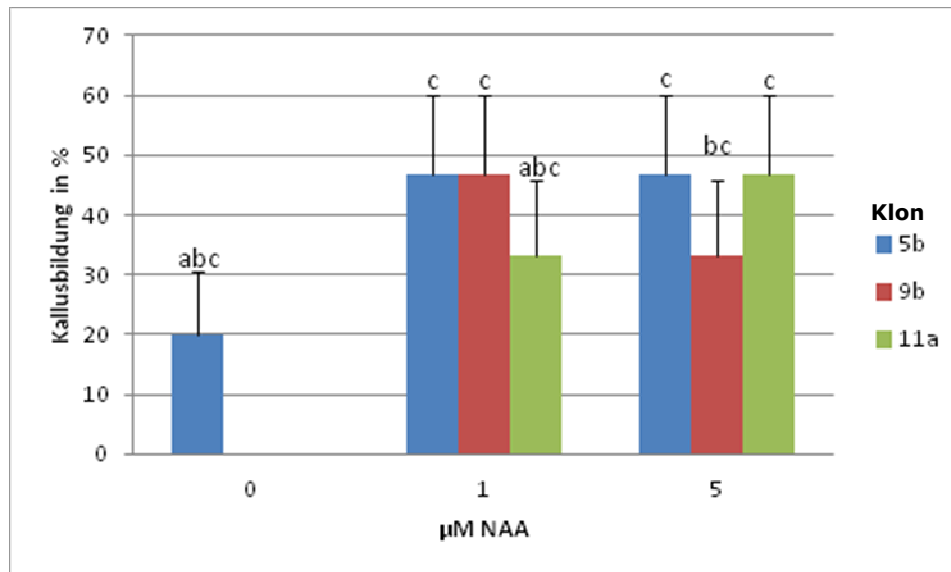


Diagramm 18: Prozentueller Anteil an Sprossen mit Kallusbildung auf NAA-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Nach einer Versuchsdauer von 5 Wochen waren die bewurzelten Sprosse auf dem Kontrollmedium bei allen 3 Klonen mit mindestens 80 mm signifikant am längsten (siehe Diagramm 19).

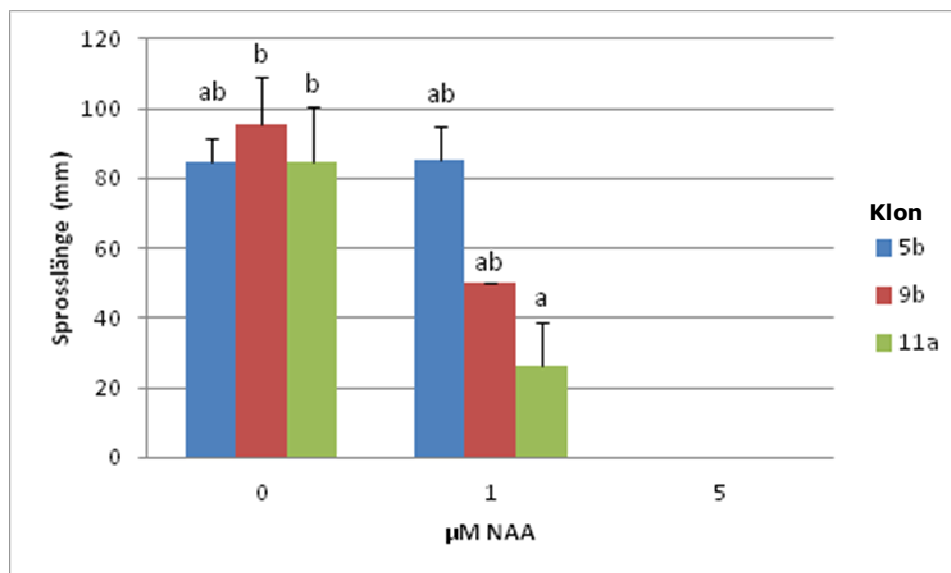


Diagramm 19: Durchschnittliche Länge der Sprosse auf NAA-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Die längsten Wurzeln mit durchschnittlich 18 – 25 mm bildeten sich auf dem MS-Medium ohne Wachstumsstoffe (siehe Diagramm 20, S. 35). Die Wurzeln, die sich auf Medien mit 1 µM NAA gebildet

haben, waren signifikant kürzer und wiesen einen größeren Durchmesser auf.

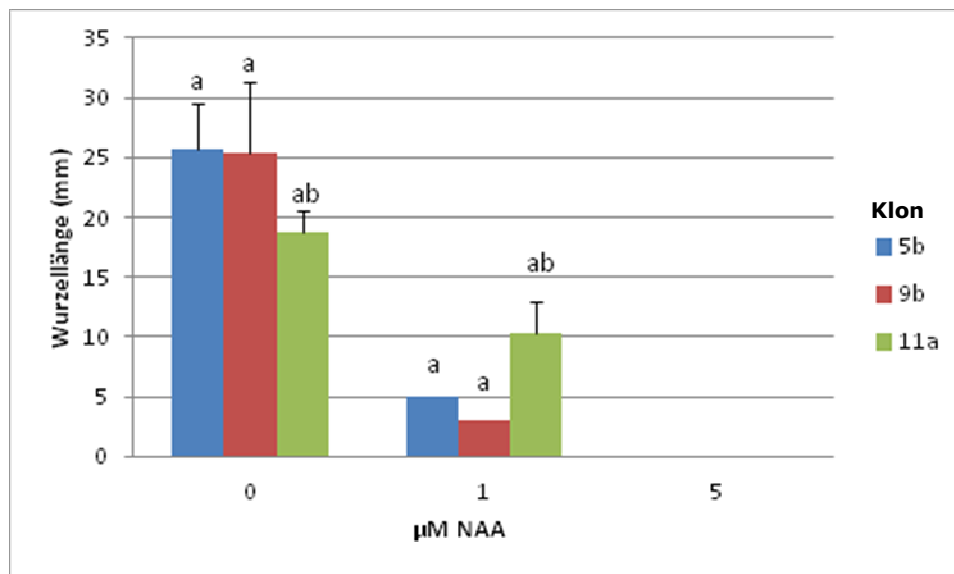


Diagramm 20: Durchschnittliche Länge der Wurzeln auf NAA-Medien, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Da auf dem MS-Kontrollmedium ohne Auxin eine gute Bewurzelungsrate erzielt worden war, erfolgte ein weiterer Versuch mit Sprossexplantaten des Klons 2c. 24 der 52 eingesetzten Sprossspitzen waren nach 2 Wochen bewurzelt (46 %). Es zeigte sich außerdem, dass die Sprosse die optimale Länge (ca. 30 mm) für die Akklimatisierung ebenfalls bereits nach 2 Wochen erreicht hatten (siehe Abb. 31, S. 36).



Abbildung 31: Sprossexplantate von *L. tibetica* Klon 2c nach 2 wöchiger Kultivierung auf MS-Medien

Die Wurzeln hatten durchschnittliche eine Länge von 15 mm, und pro Spross bildeten sich im Durchschnitt ca. 3 Wurzeln (Abb. 32).



Abbildung 32: Wurzelbildung an Sprossexplantaten von *L. tibetica* Klon 2c auf MS-Medien nach 2 wöchiger Kultivierung

3.2.2 VERSUCHE MITTELS PULSBEHANDLUNG

Eine Pulsbehandlung wurde mit den Klonen 11b und 9b durchgeführt, als Wachstumsstoffe kamen dabei IBA und NAA zum Einsatz. Vorgegangen wurde folgendermaßen: Sprossspitzen wurden jeweils 30 s in eine wässrige 10 mM Auxinlösung getaucht

und danach auf wuchsstofffreies $\frac{1}{2}$ MS-Medium inokuliert. Die Hälfte dieser Medien enthielt 1 % Aktivkohle.

PULSBEHANDLUNG MIT INDOLYL BUTTERSÄURE

Bei der Pulsbehandlung mit IBA zeigte sich, dass es bezüglich der Wurzelbildung keinen Unterschied machte, ob das Medium Aktivkohle enthielt oder nicht (siehe Diagramm 21).

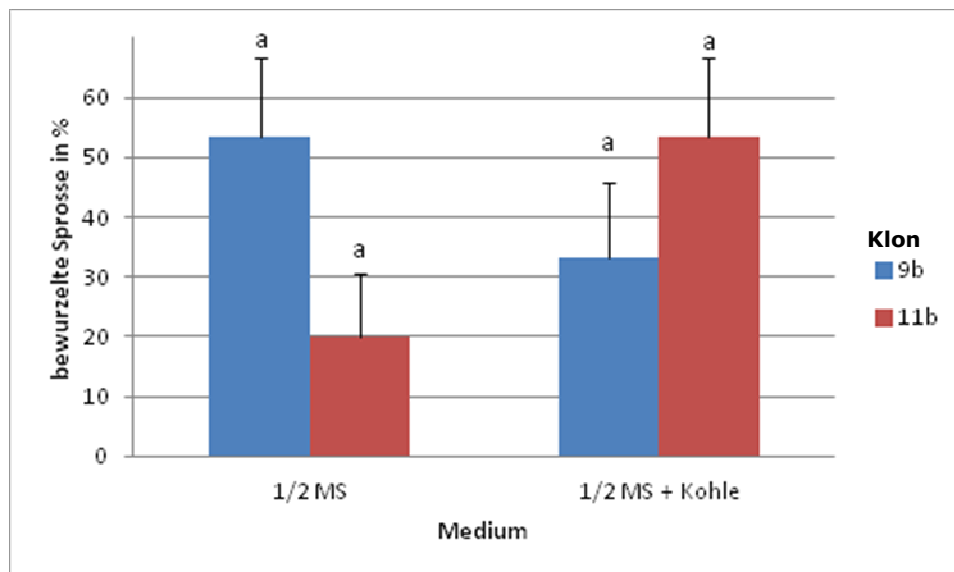


Diagramm 21: Prozentueller Anteil bewurzelter Sprosse auf MS-Medien mit und ohne Aktivkohle nach Pulsbehandlung mit 10 mM IBA, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Der prozentuelle Anteil an bewurzelten Sprossen unterschied sich nicht wesentlich von der Bewurzelungsrate auf MS-Medium.

Auf den Medien mit Aktivkohle bildeten sich zwar auch Wurzeln, die Sprosse verfärbten sich jedoch braun (Abb. 33).



Abbildung 33: 5 Wochen alte Sprosse von *L. tibetica* Klon 11b nach Pulsbehandlung mit NAA und Kultivierung auf 1/2 MS + 1 % Aktivkohle

Die Sprosse waren nach 5 Wochen kürzer als auf den MS Medien ohne Wuchsstoffe (siehe Diagramm 22).

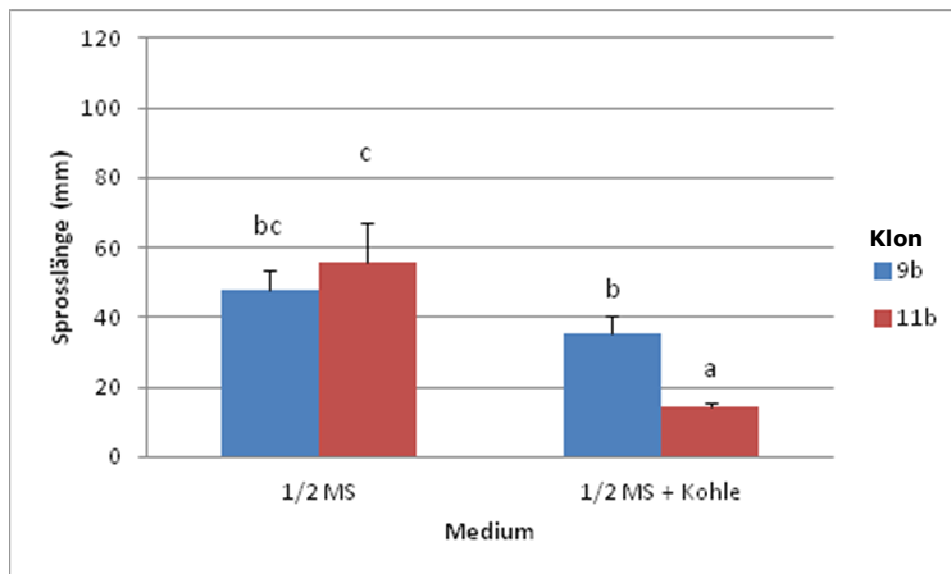


Diagramm 22: Durchschnittliche Sprosslänge auf MS-Medien mit und ohne Aktivkohle nach Pulsbehandlung mit IBA, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

Alle Sprosse wiesen eine Länge von < 60 mm auf, wobei die Sprosse auf den Medien ohne Aktivkohle bei Klon 11b signifikant länger waren als auf den Medien mit Aktivkohle (Diagramm 23, S. 39).

Die nach Pulsbehandlung mit IBA gebildeten Wurzeln waren mit durchschnittlich < 7 mm deutlich kürzer als die auf dem MS-Kontrollmedium regenerierten Wurzeln (siehe Diagramm 23).

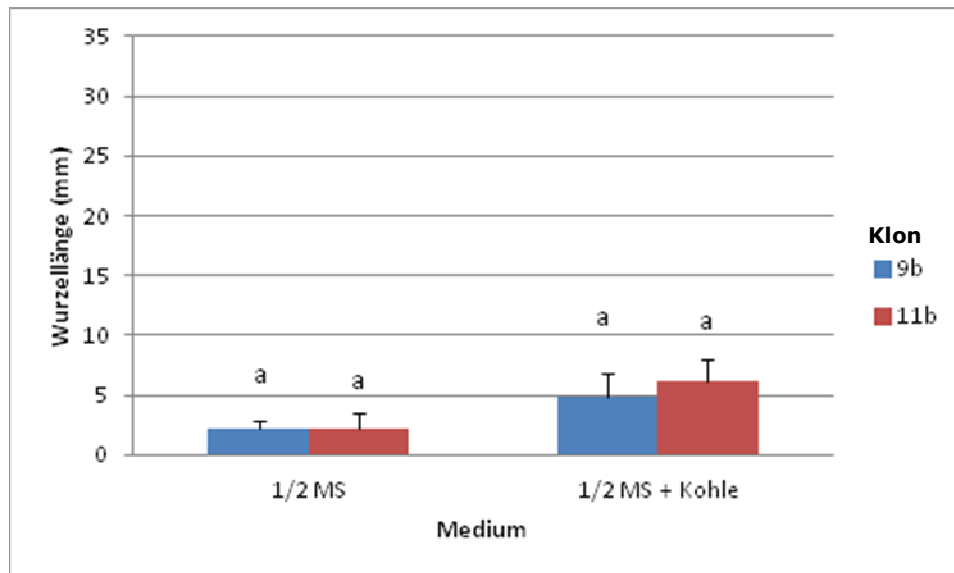


Diagramm 23: Durchschnittliche Wurzellänge auf MS-Medien mit und ohne Aktivkohle nach Pulsbehandlung mit IBA, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet (p=0,05)

Die Wurzeln waren generell so wie auf den Medien mit NAA etwas dicker als bei Bewurzelung auf Medium ohne Auxin.

PULSBEHANDLUNG MIT NAPHTHYLESSIGSÄURE

Nach Pulsbehandlung mit 10 mM NAA bildeten etwa 40 % der Sprosse auf den Medien ohne Aktivkohle Wurzeln aus, allerdings war der Großteil der Sprosse hyperhydratisiert (Abb. 34) und wies Kallus auf (Diagramm 24).

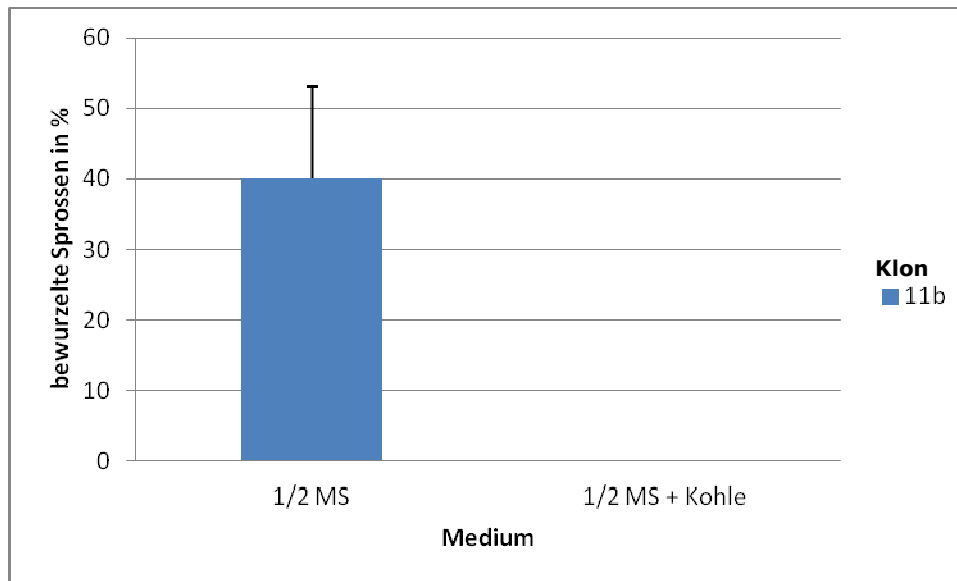


Diagramm 24: Prozentueller Anteil bewurzelter Sprosse auf MS-Medien nach Pulsbehandlung mit NAA, Mittelwerte und Standardfehler, nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit gleichem Kleinbuchstaben beschriftet ($p=0,05$)

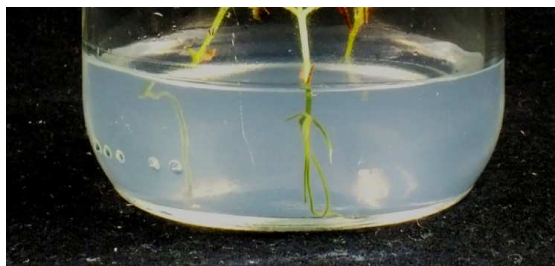
Auf den Medien mit Aktivkohle verbräunten die Sprosse bereits nach einer Kultivierungsdauer von 2 Wochen.



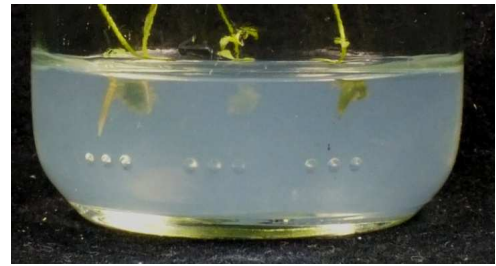
Abbildung 34: Hyperhydratisierter Spross nach Pulsbehandlung mit NAA und Kultivierung auf 1/2 MS (Klon 11b)

UNTERSCHIEDE IN DER WURZELMORPHOLOGIE

Die Wurzeln zeigten, je nachdem ob das Medium Auxine oder Cytokinine enthielt oder nicht, morphologische Unterschiede (Abb. 35). Ohne Einsatz von Wuchsstoffen bildeten sich Wurzeln mit durchschnittlich 15 - 25 mm Länge. Auf den Medien mit Auxinen oder Cytokininien waren die Wurzeln deutlich kürzer und dicker.



0 µM NAA



1 µM NAA

Abbildung 35: Unterschiede in der Wurzelmorphologie von *L. tibetica* auf MS Medien mit und ohne Wuchsstoffe

3.3 VORVERSUCHE ZUR AKKLIMATISIERUNG

Die in vitro bewurzelten Sprosse wurden nach 5 Wochen vorsichtig aus den Medien gezogen. Im handwarmen Wasserbad wurden Medienreste entfernt und nach Besprühen mit desinfizierender Chinosollösung (0,1 %) in ein Gemisch aus Torf und Perlite (4+1 v/v) in Multitopfplatten eingepflanzt. Sehr lange Sprosse wurden auf eine Länge von ca. 20 - 40 mm gekürzt.

Die Multitopfplatten wurden in einen Folientunnel (Abb. 36, S. 42) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 % platziert. Die Einstellung der Luftfeuchtigkeit sowie die Bewässerung der Kulturen erfolgte über feinen Wasserdampf. Nach 2 Wochen erfolgte eine Absenkung der relativen Luftfeuchtigkeit auf 60 %.

Bereits innerhalb der ersten Woche überlebte der Großteil der Pflanzen die Akklimation, und nach 2 Wochen gab es

keine lebenden Pflänzchen mehr. Deshalb wurde der Einsatz eines Mini-Gewächshauses getestet.



Abbildung 36: Multitopfpplatten mit *L. tibetica* bei der Akklimatisierung im Folientunnel

Das Mini-Gewächshaus (Abb. 37, S. 43) bietet den Vorteil, dass die Luftfeuchtigkeit manuell über entsprechende Belüftungsöffnungen reguliert werden kann. Außerdem fällt die Besprühung durch die Nebeldüsen weg. Einige auf MS-Medium ohne Wachstumsstoffe bewurzelte Sprosse wurden in das oben beschriebene Substrat in 6 cm-Töpfchen gepflanzt und in das Mini-Gewächshaus platziert. Die Überlebenszeit der Pflanzen war zwar mit 18 Tagen länger als im Akklimatisationsraum, doch auch hier konnte keine erfolgreiche Akklimatisierung durchgeführt werden.



Abbildung 37: Pflänzchen von *L. tibetica* bei der Akklimatisation im Mini-Gewächshaus

4. DISKUSSION

Bei *Lancea tibetica* Hook. f. et Thoms handelt es sich um eine in ihrer Heimat bedeutenden Heilpflanze. Da der Großteil des benötigten Pflanzenmaterials aus Wildsammlung stammt und durch menschliche und umweltbedingte Einflüsse der Bestand immer weiter abnimmt, befindet sich die Pflanze in der Mongolei in der Kategorie „Critically endangered“ auf der Roten Liste. Daher ist es notwendig, den Weiterbestand zu sichern. Über biotechnologische Methoden können in kurzer Zeit große Mengen genetisch einheitlicher Pflanzen für die nachfolgende Feldkultur produziert werden. Das Thema der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Ausarbeitung eines entsprechenden Vermehrungsprotokolls, wobei die Versuche auf den Ergebnissen von Osmen (2015) und Nguyen (2015) aufbauten.

Primäres Ziel eines Vermehrungsprotokolls ist zunächst die Auffindung eines Wuchsstoffes in geeigneter Konzentration, der hohe reproduzierbare Vermehrungsraten ermöglicht. Der ideale Wuchsstoff sollte außerdem keine unerwünschten Auswirkungen wie übermäßige Kallusbildung oder Hyperhydratisierung haben.

In den vorangegangenen Arbeiten wurde bereits der Einfluss der Cytokinine Kinetin, BAP, 2iP und Zeatin auf die Wachstumsrate ermittelt (Osmen, 2015; Nguyen, 2015). Dort zeigte sich, dass sich unterschiedliche Klone von *L. tibetica* sehr individuell auf eingesetzte Wuchsstoffe verhielten. Daher wurden die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Klone mit jeweils anderen als in den vorangegangenen Arbeiten getesteten Cytokinin kombiniert, um ein mögliches abweichendes Verhalten feststellen zu können.

Die Auswirkungen von BAP und Zeatin auf die Vermehrung in Nodienkulturen von *L. tibetica* wurden in der Arbeit von Nyguen

(2015) erstmals untersucht, wobei sie die Klone 9b, 5b und 2c eingesetzt hatte. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Wochen hatte sich gezeigt, dass das Sprosswachstum im Wesentlichen ausblieb. Besonders bei den Klonen 9b und 5b verbräunte der Großteil der Nodienexplantate und starb bereits nach kurzer Zeit ab. Die neu gebildeten Sprosse waren durchschnittlich nur etwa 10 mm lang, es konnte also kein zufriedenstellendes Wachstum festgestellt werden. Vereinzelt haben sich zwar Nodien gebildet, die Isolierung war jedoch größtenteils aufgrund der brüchigen Konsistenz und der kurzen, gestauchten Internodien nicht möglich, diese Nodien daher für eine Weitervermehrung nicht geeignet. Der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen war mit 68 % bei Klon 2c sehr hoch (Nyguen, 2015). Da sich die Klone sehr heterogen verhielten und um wirklich ausschließen zu können, dass BAP ungeeignet für die in vitro-Vermehrung von *L. tibetica* ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit nochmals BAP-hältige Medien verwendet und auf diese Nodienexplantate der Klone 9c und 11a inokuliert.

Es ergab sich ein ähnliches Bild wie in den Vorgängerarbeiten. Bei beiden Klonen hätten nur maximal 2 Nodien pro Explantat für eine Subkultivierung verwendet werden können. Der Anteil an Hyperhydratisierung war mit 50 % (MS + 5 µM BAP) bis 90 % (MS + 0,5 bzw. 1 µM BAP) sehr hoch. Auffallend war, dass sich, auch wenn die überimpften Nodien innerhalb weniger Tage verbräunten, Kalli mit großem Durchmesser (durchschnittlich 7 mm) bildeten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass BAP in den untersuchten Konzentrationen für eine effiziente Vermehrung von *L. tibetica* ungeeignet ist.

Der Einfluss der Cytokinine 2iP und Kinetin wurde in der Arbeit von Osmen (2015) untersucht. Sie setzte dabei die Klone 9c, 11a und 11b für Versuche mit Kinetin ein. Es kam nur bei Klon 11a auf Medium mit 0,5 oder 1 µM Kinetin zu einer guten

Sprossvermehrung (9,1 bzw. 6,1 Sprosse). Die Klone 9c und 11b konnten auf den Kinetin-Medien nicht zufriedenstellend vermehrt werden (Osmen, 2015). In unserer Arbeit wurde die Auswirkung von Kinetin auf die Klone 5b und 9b untersucht. Bei Klon 5b konnten bei den Konzentrationen von 1 μM und 5 μM 4,7 bzw. 7,3 Sprosse generiert werden, die Hyperhydratisierung war mit einem Anteil von über 90 % allerdings sehr hoch. Bei Klon 9b bildeten sich nur sehr geringe Mengen an Sprossen. In einem der Versuch zeigte sich, dass die Kultivierungsdauer von 7 Wochen um ca. 4 Wochen zu kurz war. Vergleicht man die Sprosszahlen nach 7 und 11 Wochen Kulturdauer, so haben sich auf allen 3 Kinetin-Medien nach 11 Wochen signifikant mehr Sprosse gebildet, beispielsweise 8 Sprosse auf MS + 5 μM Kinetin nach 11 Wochen im Vergleich zu 0,53 Sprossen nach 7 Wochen. Der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen war dabei nach 7 oder 11 Wochen nicht signifikant unterschiedlich. Kinetin war zwar tendentiell etwas besser geeignet als BAP, insgesamt ist aber ein gut geeigneter Wuchsstoff zur Vermehrung von *L. tibetica* noch nicht gefunden. Bei Untersuchungen zur Mikrovermehrung von *Celastrus paniculatus*, einer bedeutenden Heilpflanze in Indien, ergab sich ein ähnliches Bild. Durch Einsatz eines MMS-Medium (einem modifizierten MS-Medium, Mathur et al, 1995) konnte eine große Menge an gesunden und normalen Sprossen erhalten werden. Bei der antitumoral wirksamen Species *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. wurden Untersuchungen mit Nodienkulturen und verschiedenen Konzentrationen von BAP und TDZ in Kombination mit NAA durchgeführt. Man kam zum Ergebnis, dass die höchste Vermehrungsrate auf MS-Medium mit 4,0 μM TDZ und 0,8 μM NAA erzielt werden kann (Farnsworth and Bunyaphrathatsara, 1992). Bei der wirtschaftlich bedeutenden Zierpflanze *Petunia alba* kam es zur maximalen Sprosszahl und Sprosslänge auf MS-Medium mit

0,5 mg/l Adeninsulfat, 2 mg/l BAP/Kinetin und IAA 0,2 mg/l (Prakash et al, 2013).

Es sollten daher noch weitere Versuche mit anderen Cytokinin wie beispielsweise TDZ oder Adeninsulfat durchgeführt werden. Auch die Effekte einer Kombination mit Auxinen oder die Kombination von 2 Cytokinin, was z.B. bei *Petunia alba* zum Erfolg führte, sollten noch untersucht werden.

In den vorangegangenen Diplomarbeiten wurde die Sprossbewurzelung mit den Auxinen IBA und IAA untersucht. Die Ergebnisse waren dabei nicht zufriedenstellend, da die Wurzelbildung oft ausblieb (Nyguen, 2015; Osmen, 2015). Daher versuchten wir die Bewurzelung mit NAA, einem stärkeren Auxin, denn auch die Eignung eines Auxins für die Bewurzelung ist abhängig von der Pflanzenspecies. Bei der Bewurzelung von Olivensprossen z.B. war NAA effektiver als IBA oder IAA (Rugini und Fontanazza, 1981). Aus der Literatur geht außerdem hervor, dass oft auch eine Pulsbehandlung mit Auxinen in hoher Konzentration zielführend ist.

Auf den Medien mit der höchsten Konzentration an NAA (5 μ M) war kein einziger bewurzelter Spross zu finden. Es kam häufig zur Bildung von Kalli - bei allen 3 Klonen bei mindestens 30 % der Sprosse. Auf den Medien mit einer Konzentration von 1 μ M NAA war bei Klon 11 a an 30 % der Sprosse Wurzelbildung zu beobachten. Bei allen 3 Klonen bildeten sich aber auf dem Kontrollmedium (MS-Medium ohne NAA) signifikant die meisten Wurzeln. Besonders mit Klon 5b war der Bewurzelungsversuch erfolgreich, mehr als 65 % der Sprosse bildeten Wurzeln aus. Diese Wurzeln hatten eine Länge von durchschnittlich 18 – 25 mm. Auch in einem aufbauenden Versuch waren 46 % der Sprosse nach 2 Wochen bewurzelt und hatten mit durchschnittlich 30 mm die optimale Länge für eine Akklimatisierung.

Eine Bewurzelung durch Pulsbehandlung verspricht mehrere Vorteile. Das Auxin, das für die Induktion der Wurzel verantwortlich ist, sich auf das weitere Wachstum jedoch hemmend auswirken kann, wird nur kurz angewandt: Die pulsbehandelten Sprosse werden danach auf Medien ohne Auxine kultiviert. Bei der bestandsgefährdeten Arzneipflanze *Rauvolfia serpentina* führte eine Pulsbehandlung mit 50 μM IBA und 50 μM NAA zu einer Bewurzelungsrate von 90 % (Vinod und Shekhawat, 2005). In unseren Versuchen wurde die Hälfte der Medien mit 1 % Aktivkohle versetzt: Aktivkohle weist eine sehr große Oberfläche auf, so können beispielsweise inhibitorische Stoffwechselprodukte und auch Wuchsstoffe adsorbiert werden. Dadurch kann dieser Zusatz zu Nährmedien das Wachstum und die Entwicklung pflanzlicher Zellen positiv beeinflussen (Thomas, 2008). Außerdem färbt sich das Medium schwarz. Dies kann ein Vorteil sein, da ja auch der natürliche Prozess der Wurzelbildung im Dunklen stattfindet und sich Licht hemmend auf das Wurzelwachstum auswirken kann. Die Pulsbehandlung mit IBA resultierte in einer Bewurzelungsrate von ca. 50 % bei Klon 9b auf dem Medium ohne Aktivkohle, bei Klon 11b war dieses Bild genau umgekehrt: Hier waren auf den Medien mit Aktivkohle mehr bewurzelte Sprosse zu finden, allerdings war der Unterschied nicht signifikant. Bei Bewurzelungsversuchen beim Sheanussbaum (*Vittelaria paradoxa*) führte die Anwendung von Seradix (Bewurzelungspulver auf Basis von IBA) zu einer höheren Bewurzelungsrate mit besser entwickelten und längeren Wurzeln, als in der Kontrolle. Auch auf Reisspelzen als Substrat kam es zu einer signifikant höheren Zahl an bewurzelten Sprossen und längeren Wurzeln.

Bei der Pulsbehandlung mit NAA zeigte sich auf beiden Medien Wurzelbildung, auf dem Medien mit Aktivkohle kam es jedoch zur Verbräunung der Sprosse. Außerdem bildeten sich vermehrt hyperhydratisierte Sprosse. Hyperhydratisierte Sprosse lassen sich

nicht akklimatisieren (Debergh und Maene, 1984), NAA scheint daher für eine effektive Sprossbewurzelung weniger geeignet zu sein.

Newell beschäftigte sich in seiner Dissertation mit der Hypothese, dass sich die Hypoxie in Agarmedien negativ auf die Wurzelbildung auswirkt. Er untersuchte die Bewurzelung auf 5 verschiedenen Substraten, darunter ein poröses Substrat ohne Erde (in vitro soil-less, IVS). Dieses IVS-Medium war ein Gemisch aus Torf/Sand/Perlit im Verhältnis (0,5/2/2) mit 2g/L Kalk für den Gartenbau, mit einem pH von 6,8. Auf dieses Substrat wurden Sprossspitzen nach einer 7 tägigen Kultivierungsdauer auf festem Agarmedium mit hoher Auxinkonzentration (40 M IBA) im Dunklen gesetzt (Newell, 2006).

Eine signifikant höhere Bewurzelungsrate konnte mit IVS-Medien im Gegensatz zu Agar-Medien für 28 australische Arten und Genotypen der Familie der Liliaceae, Haemodoraceae, Myrtaceae, Thymelaeaceae, Proteaceae, Goodeniaceae und Rutaceae festgestellt werden. Außerdem konnte belegt werden, dass die Akklimatisierung nach Bewurzelung auf IVS-Medien effizienter durchführbar war (Newell et al., 2003). Möglicherweise ist diese Strategie auch bei der Bewurzelung und Akklimatisierung der *Lancea tibetica* erfolgreich, dies sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

Die Endphase einer in vitro Kultivierung umfasst das Abhärten der Pflanzen, sodass diese den Transfer ins Glashaus und schlussendlich aufs Feld überleben. Um Pflanzen akklimatisieren zu können, ist es notwendig, dass diese gut proportionierte Sprosse und Wurzeln aufweisen, die grundsätzlich auch funktionsfähig sind (Sommer und Caldas, 1981).

In einem ersten Akklimatisierungsversuch wurden die bewurzelten Sprosse, die auf den Medien MS, MS + 1 μ M NAA und durch die Pulsbehandlung mit IBA erhalten wurden, vorsichtig aus den Medien gezogen und im handwarmen Wasserbad von anhaftendem Medium befreit. Nach Besprühen mit einer desinfizierenden 0,1 proz. Chinosollösung wurden lange Sprosse auf eine Länge von 20 – 40 mm gekürzt und in Multitopfplatten (Topfdurchmesser 46 mm) welche eine Mischung aus Torf + Perlit im Verhältnis 4+1 (v/v) enthielten, eingepflanzt. Die Multitopfplatten kamen in einen Folientunnel bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 % und einer Raumtemperatur von 24 °C. Ein feiner Wassernebel sorgte dabei für die Aufrechterhaltung der Luftfeuchtigkeit. Geplant war, dass nach 2 Wochen die Pflanzen bei einer verminderten Luftfeuchtigkeit (60 %) weiter abgehärtet werden und danach der Transfer ins Glashaus erfolgt. Da aber der Großteil der Pflanzen innerhalb der ersten 2 Wochen abstarb, wurde eine andere Methode zur Akklimatisierung getestet. Möglicherweise war das Torfsubstrat bei der Akklimatisierung im Folientunnel zu feucht, daher versuchten wir die Akklimatisierung in einem Mini-Gewächshaus. Die automatische Benebelung hat möglicherweise für manche Pflanzenarten auch Nachteile: Das Substrat könnte für ein gesundes Wurzelwachstum zu feucht sein. Außerdem könnten Nährstoffe sowohl von der Pflanze als auch vom Substrat ausgespült werden: Auftretende Sprossspitzennekrosen könnten durch Auswaschen von Calcium begründet werden (Griesbach et al., 1988). Vorteil bei einer Akklimatisierung im Mini-Gewächshaus ist, dass man die Luftfeuchtigkeit manuell und daher feinfühlicher regulieren kann. Vor allem aber fällt die Benebelung weg, somit wäre das Substrat nicht ganz so feucht wie im Folientunnel. Die Überlebenszeit der Pflanzen war im Mini-Gewächshaus in der Tat um ca. 1-2 Wochen länger als im Folientunnel. Es konnten so erste Erkenntnisse zur Akklimatisierung von *Lancea tibetica* gewonnen

werden, jedoch sind noch weitere Versuche nötig. Beispielsweise könnte das Torf-Perlit-Substrat nicht geeignet sein. Der pH-Wert des eingesetzten Torfpräparats könnte mit 5,22 für diese Species zu sauer sein und dadurch eine erfolgreiche Akklimatisierung verhindern (Hutchinson, 1982a). Da *L. tibetica* häufig auch auf sandigem Boden zu finden ist (Kletter und Kriechbaum, 2001), scheinen weitere Versuche mit Sand im Pflanzgemisch notwendig. Außerdem könnte das Substrat mit einer Nährstofflösung, z.B. mit ½ MS-Salzen, befeuchtet werden (George, 1993).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Cytokinine BAP und Kinetin in den Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM und 5 μM in MS Medien auf die Vermehrung verschiedener Genotypen von *Lancea tibetica* analysiert. Auf den BAP-hältigen Medien zeigte sich besonders oft Kallusbildung, und es kam kaum zu Sprossregenerierung. Die spärlich gebildeten Nodien, maximal 2 pro Explantat, waren aufgrund der glasigen, filigranen Morphologie oft für eine Subkultivierung ungeeignet. BAP schien daher für eine Vermehrung von *L. tibetica* weniger geeignet zu sein. Das Cytokinin Kinetin war dem Wachstumsstoff BAP deutlich überlegen. Vor allem nach einer längeren Kultivierungsperiode von 11 Wochen wurden signifikant mehr Sprosse pro Nodium (5 - 8 im Gegensatz zu 0,5 - 0,8 Sprossen nach 7 Wochen Kultur) gebildet. Der Anteil an hyperhydratisierten Sprossen war allerdings auch nach 11 Wochen verhältnismäßig hoch. Kallusbildung trat weniger häufig auf. Die für die Versuche eingesetzten Genotypen zeigten unter Einfluss von BAP und Kinetin ein ähnliches Wachstumsverhalten.

Zur Bewurzelung von Sprossen wurden Versuche mit dem Auxin NAA in den Konzentrationen von 1 μM und 5 μM in MS-Medien unternommen. Bei Einsatz von 5 μM NAA blieb die Wurzelbildung aus, es bildeten sich nur Kalli. Das Medium mit 1 μM NAA führte zur Regenerierung von Wurzeln, diese waren kürzer und dicker als Wurzeln, die auf Medien ohne Auxin generiert wurden. Bei den untersuchten Klonen betrug die Bewurzelungsrate auf Medien ohne NAA über 45 %, und die Wurzeln waren mit 18 – 25 mm signifikant länger als bei Bewurzelung auf NAA-Medien.

Die Pulsbehandlung mit IBA resultierte in einer Bewurzelungsrate von 50 %, wobei der Zusatz von Aktivkohle zum Nährmedium

keinen Einfluss hatte. Die Pulsbehandlung mit NAA induzierte das Wachstum von hyperhydratisierten Sprossen. Da diese die Akklimatisierung nicht überlebten, scheint NAA für die Bewurzelung über Pulsbehandlung nicht geeignet zu sein.

Ein erster Akklimatisierungsversuch wurde mit einem Torf-Perlit-Substrat in einem Folientunnel bei einer anfänglichen Luftfeuchtigkeit von 80 % durchgeführt, innerhalb einer Woche verbräunten hier der Großteil der Explantate. Ein weiterer Versuch erfolgte in einem Mini-Gewächshaus bei reduzierter Substratfeuchtigkeit, die Pflanzen überlebten dort mit 18 Tagen schon etwas länger. Es konnten so erste Erkenntnisse zur Akklimatisierung von in vitro-vermehrten Pflanzen von *Lancea tibetica* gewonnen werden.

6. SUMMARY

In the present thesis the influence of the cytokinins BAP and Kinetin in concentrations of 0.5 μ M, 1 μ M and 5 μ M in MS media on the propagation of various genotypes of *Lancea tibetica* was investigated. On the media containing BAP the cultures exhibited excessive hyperhydration and callusing with poor shoot regeneration. In average, only two nodes per explant were regenerated and glassy filigreed morphology reduced the suitability for subcultivation. The results indicated that BAP is not an appropriate growth regulator for the multiplication of *L. tibetica*. The cytokinin kinetin proved to be more effective than BAP. While 0.5 - 0.8 shoots per node were detected on media with kinetin after a cultivation period of 7 weeks, significantly more shoots (5-8 shoots per node) were regenerated after a prolonged subculture of 11 weeks. On the other hand, no significant change was observed in the amount of hyperhydratisation which remained at a high level. Callusing did not occur as frequently as on media containing BAP. The genotypes used in the experiments responded in a similar way to BAP and kinetin.

For rooting we investigated the effects of the auxin NAA at concentrations of 1 μ M or 5 μ M in MS media. No roots were formed with 5 μ M NAA, but callus formation was induced. In contrast, on medium with 1 μ M NAA roots were regenerated which were thicker and shorter than those generated on auxin-free medium. On auxin-free medium the rooting percentage was higher than 45 % with all genotypes, and the length of the roots was significantly longer (18 – 25 mm) than on media with NAA.

Shoots which were pulse treated with IBA showed a rooting frequency of 50 %, the addition of charcoal to the nutrient medium did not have a significant influence. A pulse treatment with NAA led

to hyperhydrated shoots which didn't survive the hardening stage. Therefore NAA does not seem to be suitable for efficient rooting.

A first experiment for acclimatization was performed using a peat-perlite substrate in a polytunnel with automatic misting at an initial relative humidity of 80 %. However, most of the plants didn't survive the hardening and died during the first week. Thus we tried the hardening in a mini-greenhouse with reduced watering of the substrate. Indeed the plants survived for 18 days which was longer than in the polytunnel. Thus, first insights into the hardening requirements of in vitro propagated *Lancea tibetica* plantlets could be gained.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Cheruvathur M. K., Thomas T. D. (2014) High frequency multiple shoot induction from nodal segments and rhinacanthin production in the medicinal shrub *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz, Plant Growth Regul **74**: 47-54

Debergh P.C.A., Maene L.J. (1984) Pathological and physiological problems related to in vitro culture of plants, Parasitica **40**: 69-75

Farnsworth N.R., Bunyaphatsara N. (1992) Thai medicinal plant: recommended for primary health care system. Prachachon, Bangkok

George E. F. (1993) Plant Propagation by Tissue Culture, 2. Auflage, Exegetics Ltd., Edington

Griesbach R.J. (1988) *Hemerocallis* improvement through tissue culture. HortScience **23**: 43-48

Heß D. (1992) Biotechnologie der Pflanzen, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, S. 29-31

Hutchinson F. (1984) In vitro propagation of *Dionaea muscipula* Ellis (Venus Fly Trap), Sci Hort **22**: 189-194

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

Li J., Zheng Y., Zhou H., Su B.N., Zheng R.L. (1997) Differentiation of human gastric adenocarcinoma cell line MGc80-3 induced by verbascoside. *Planta Med* **63**: 499-502

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

Liu S.-J., Liao Z.-X., Liu C., Qu Y.-B. (2014) A trehalose ester from *Lancea tibetica*, *Nat Prod Res* **28**: 1613-1618

Mathur N, Ramawat KG, Dilip N (1995) Rapid in vitro multiplication of jujube through mature stem explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **43**: 75-77

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

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

Newell C. (2006) In vitro soil-less (IVS) rooting medium, Dissertation, Murdoch University

Newell C., McComb J.A., Growns D. (2003) The influence of medium aeration on in vitro rooting of Australian plant microcuttings, *Plant Cell Tissue Organ Cult* **75**: 131-142

Nguyen N. C. (2015) Untersuchungen zur in vitro-Vermehrung von *Lancea tibetica* HOOK. f. et THOMS, Diplomarbeit, Univ. Wien

Nyambayar D., Oyuntsetseg B., Tungalag R. (2011) Mongolian Red List of Plants, ADMON Printing, Ulaanbaatar, S. 31

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

Prakash A., Sinha K., Kumar S. (2013) Effect of adenine sulphate on multiplication of shoots from different explants (leaf, nodal segments and shoot tips) and in vitro flowering in *Petunia alba* - A herbaceous ornamental plant, *Phytomorphol* **63**: 95-100

Sommer H.E., Caldas L.S. (1981), In vitro methods applied to forest trees, T. A. Thorpe (Hrsg.), *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*, Academic Press, New York, S. 349-358

Song Z.H., Wang Y.-H. Qian Z.-Z., Smillie T.J., Khan I.A. (2011) Quantitative Determination of 10 Phenylpropanoid and Lignan Compounds in *Lancea tibetica* by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection, *Planta Medi* **77**: 1562-1566

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

Su B. N., Zhu Q., Gao K., Yuan C., Jia Z. (1999) Lignan and Phenylpropanoid Glycosides from *Lancea tibetica* and their Antitumor Activity, *Planta Med* **65**: 558-561

Thomas T.D. (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture, *Biotechnol Adv* **26**: 618-631

Vinod A., Singh R. P., Shekhhawat N. S. (2001) A micropropagation protocol for mass multiplication and off-site conservation of *Celastrus paniculatus* - A vulnerable medicinal plant of India, *J Sust For* **14**: 107-120

Vinod K., Shekhawat N. S. (2005) Cloning of *Rauvolfia serpentina* - An Endangered Medicinal Plant, *J Sust For* **20**: 53-65

World Health Organization (2003) WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants, Genf, Schweiz.

Yeboah J., Lowor S.T., Amoah F.M. (2009) The Rooting Performance of Shea (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn) Cuttings Leached in Water and Application of Rooting Hormone in Different Media, *J Plant Sci* **4**: 10-14

Zhang H., Wang M., Zhen R., Zhang S., Chen Y. (1987) Chemical constituents of *Lancea tibetica* Hook F. et Thoms. *J Lanzhou Univ Nat Sci* **23**: 156-158

Zhao C., Qiu R., Zheng R. (2000) In vitro antitumor activities of furan lignans. *J Lanzhou Univ Nat Sci* **36**: 66-68

Zheng R., Wang M., Zhang H. (1985) Study on the chemical constituents of *Lancea tibetica* Hook F. et Thoms. *Acta Bot Sin* **27**: 402-406

http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=52754&flora_id=2, aufgerufen am 12.12.2014

C U R R I C U L U M V I T A E

PERSÖNLICHE DATEN:

Katrin Prenner

geb. 18. März 1990 in Oberwart

österr. Staatsbürgerin

BILDUNG:

- 2009-heute: Studium der Pharmazie, Universität Wien
- März - Juni 2014:
Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie
- 2004-2009: BHAK Oberwart
- Zweig: Informationsmanagement und -technologie
- 2000-2004: Hauptschule in Pinggau
- 1996-2000: Volksschule in Pinggau

PRAKTIKA:

- 08/2013 Anstaltsapotheke, AöKH Oberwart
- 07-08/2012 Baxter AG, Wien