



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchungen zur photoautotrophen
Mikrovermehrung der Pappel (*Populus* sp.)

verfasst von
Nathalie Gindler

angestrebter akademischer Grad
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Univ.Prof. Mag.Dr.Dr. h.c. Brigitte Kopp

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Mag.Dr.Dr. h.c. Brigitte Kopp für die Bereitstellung des interessanten Themas, die nette Betreuung und die Begutachtung meiner Diplomarbeit recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch, der mir während meiner praktischen Arbeit immer zur Seite stand und bei Fragen und Schwierigkeiten eine hilfreiche Unterstützung war.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Mag. Florian Gössnitzer, technischer Assistent, für seine Hilfsbereitschaft, die praktischen Tipps und das angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während des Studiums unterstützt haben und mich immer wieder moralisch motiviert haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen sowie bei meinen Studienkollegen und Freunden für die abwechslungsreiche Zeit bedanken. Es war für mich eine schöne, unvergessliche und interessante Studienzeit.

Abkürzungen

BF MW	Blattfläche Mittelwert
BZ	Blattzahl
½ LS	Nährmedium nach Linsmaier und Skoog (1965), halbkonzentriert
FG	Frischgewicht
MD	Membrandeckel
ND	Normaler Deckel
PPF	Photosynthetic photon flux; photosynthetisch aktive Strahlung
Spl	Sprosslänge

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung.....	1
2. Material und Methoden	5
2.1. Pflanzenmaterial	5
2.2. Nährmedien	5
2.3. Kulturbedingungen.....	6
2.4. Kulturauswertung.....	8
3. Ergebnisse	10
3.1. Einfluss der Kulturbedingungen auf das Frischgewicht der regenerierten Sprosse.....	12
3.2. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Sprosslänge	16
3.3. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Nodienanzahl	21
3.4. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Blattzahl	26
3.5. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Blattfläche	30
3.6. Einfluss der Kulturbedingungen auf den Chlorophyllgehalt.....	34
4. Diskussion	40
5. Zusammenfassung.....	48
6. Summary.....	50
7. Literaturverzeichnis	51
Lebenslauf.....	57

1. Einleitung und Problemstellung

Die Pappel (*Populus sp.*), die der Familie der Salicaceae (Weidengewächse) angehört, ist ein sommergrüner Baum oder Strauch. Dieser kann 30-40m hoch werden und kommt vor allem in Nordamerika und Eurasien vor. Anzutreffen ist der Baum in der Nähe von Flussufern. Die Pappel umfasst ca. 65 Arten, dies kann jedoch, je nach Autor, differenzieren. Aufgrund ihrer Eigenschaft als schnell wachsendes Gehölz nimmt ihre wirtschaftliche Bedeutung in unserer heutigen Zeit stetig zu. Sie wird vor allem zur Energiegewinnung, aber auch zur Gewinnung von Holz und Papier genutzt. Aus einem Bericht der International Poplar Commission 2004 geht hervor, dass sich Pappel-Plantagen auf etwa 7 Millionen Hektar weltweit erstrecken mit stetig steigender Tendenz (Verani et al., 2008).

Aufgrund ihrer zunehmenden Bedeutung in der Industrie findet man viele Hybride in der Gattung der Pappel, da man Eigenschaften wie z.B. schnelles Wachstum mit der Fähigkeit, auf kargen Böden leben zu können, kombinieren will. Da die Nachfrage nach der Pappel steigt, werden die Pappeln neben der herkömmlichen vegetativen Vermehrung heutzutage auch in vitro kultiviert (Lubrano, 1992).

Auch die Pappel ist wie die meisten dahingehend untersuchten Pflanzen von Endophyten besiedelt (Germaine et al., 2004). Es wurde vielfach gezeigt, dass diese Mikroorganismen das Wachstum der Pflanze fördern (Ulrich et al., 2008; Weyens et al., 2012) und auch die Überlebensrate der Pflanze z.B. durch verbessertes Wachstum auf kargen Böden positiv beeinflussen können (Jalgaonwala et al., 2011).

In Kooperation mit dem Department für Ökogenetik und Systembiologie der Universität Wien (Leitung: Univ. Prof. Dr. Wolfram Weckwerth) werden die Endophyten der Pappel untersucht, insbesondere ein *Paenibacillus*-Stamm mit wachstumsfördernden Eigenschaften (Hanak, 2014). Hier ist es von besonderer Bedeutung, dass die dazu eingesetzten in vitro-kultivierten Pappeln in Morphologie und Physiologie der intakten Pflanze in vivo möglichst ähnlich sind. Dies kann durch photoautotrophe in vitro-Kultivierung ermöglicht werden.

Photoautotrophe in vitro-Kulturen enthalten keine Kohlenstoffquelle, also keine Saccharose, im Nährmedium. Zudem wird eine stärkere Lichtquelle ($100\text{--}150\ \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ oder höher) eingesetzt und ein ausreichendes Angebot an Kohlendioxid im Kulturgefäß bereitgestellt, damit es der Pflanze überhaupt möglich ist, Photosynthese zu betreiben (Afreen, 2005). Das Wachstum der Pflanze hängt somit unter solchen Bedingungen ausschließlich von der eigenen Photosynthese-Leistung und der Aufnahme anorganischer Nährstoffe ab (Zobayed et al., 2004).

Im Gegensatz zur photoautotrophen Kultivierung steht die konventionelle Methode, die sich dadurch kennzeichnet, dass dem Medium Saccharose hinzugefügt wird. Zudem werden eine Lichtintensität von etwa $50\ \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Zobayed et al., 2000), also durchaus geringer als bei einer photoautotrophen Kultivierung, und relativ kleine, dicht verschlossene Gefäße eingesetzt. Die Kulturen weisen in der konventionellen Methode ein photomixotrophes Wachstum auf.

Eine ausreichende Zufuhr an Kohlendioxid ist für die photoautotrophe Kultivierung wesentlich, deshalb spielt die Belüftung der Kulturgefäße eine wichtige Rolle. In einer konventionellen Kultur herrscht nur ein geringer Gasaustausch zwischen Innen- und Außenraum. Aus der Literatur geht hervor, dass der CO_2 -Gehalt im Kulturgefäß in den Dunkelperioden ansteigt und während der Lichtperiode sehr schnell wieder abnimmt, was darauf schließen lässt, dass die Pflanze in dieser Phase das CO_2 assimiliert (Afreen et al., 2002; Kozai und Kubota, 2005a) – da aus dem Außenraum CO_2 jedoch nur sehr langsam nachströmt, ist die Photosynthese nur sehr limitiert möglich.

Durch unterschiedliche Belüftungsstrategien können der CO_2 -Gehalt im Gasraum der Kultur und somit die Photosynthese-Leistung der Pflanze erhöht werden. Eine Möglichkeit besteht z.B. im Anbringen von Bohrungen in den Verschlüssen der Kulturgefäße. Auf diesen Verschluss wird ein gasdurchlässiger Mikrofilter aufgebracht, um Kontaminationen zu verhindern. So zeigte ein Versuch von Xiao und Kozai (2006b) an *Ipomoea batatas*, dass

sich durch diese Art der Belüftung die in-vitro Kulturen besser entwickelten. Dank der Bohrung kommt es zu einem vermehrten Gasaustausch im Gefäß (Kubota, 2001).

Eine weitere Möglichkeit stellt die sogenannte forcierte Belüftung dar, bei der die Luft mit CO₂ angereichert und aktiv in die Kulturgefäße gepumpt wird (Heo et al., 1999). In einem Versuch mit *Zantedeschia elliptica* von Xiao und Kozai (2004) ließ sich dank der forcierten Belüftung die Kulturperiode verkürzen und mehr Pflanzen überlebten ex-vivo. Der positive Einfluss der forcierten Belüftung ließ sich auch an *Eucalyptus camaldulensis* beobachten: Zobayed et al. (1999) zeigten, dass in großen belüfteten Kulturgefäßen die Spross- und Wurzelbildung signifikant anstieg und mehr Pflanzen ex-vivo überlebten. Mit einer Akkumulation von Ethylen, welches von den pflanzlichen Geweben in Kultur produziert wird, kann oft eine Fehlentwicklung bzw. Anomalie in der Morphologie und Physiologie verbunden werden. Dies wird mit Hilfe einer verbesserten Belüftung ebenfalls reduziert (Zobayed et al., 2000; Kozai und Kubota, 2005b und 2005c).

Die CO₂-Anreicherung kann z.B. mit Hilfe des sogenannten Warburg-Puffers (ein Gemisch aus K₂CO₃ und KHCO₃) erfolgen: anhand von *Chlorophytum borivilianum* konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Pflanzen unter einer höheren CO₂ Konzentration verbessert wurde (Joshi et al., 2009).

Neben einem erhöhten CO₂-Gehalt spielt auch die Lichtintensität eine bedeutende Rolle. Der Kultur muss dabei ausreichend Licht zugeführt werden, damit sie eine entsprechende Photosynthese-Leistung erbringen kann. Es konnte bestätigt werden, dass eine Kombination aus erhöhtem CO₂ und höherer Lichtintensität zu einer Optimierung von Wachstum und Photosyntheserate führt (Kubota, 2001).

Als letzter wichtiger Punkt ist hier das Fehlen von Saccharose zu erwähnen. Während das Nährmedium in der konventionellen Kultur Saccharose enthält, wird in der photoautotrophen Kultur darauf verzichtet. In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von Saccharose im Fall der photoautotrophen Kultur das Wachstum der Pflanze sogar hemmen kann (Kozai und Kubota, 2005a).

Die photoautotrophe Kultur bringt gegenüber der konventionellen Methode einige Vorteile mit sich. Es bilden sich weitaus weniger morphologische oder physiologische Anomalien aus, wie z.B. eine unzureichende entwickelte epicutikulare Wachsschicht oder temporär nicht funktionsfähige Stomata (Afreen, 2005). Durch diesen verbesserten physiologischen Status der Pflanze kann der kritische Schritt der Akklimatisierung effizienter durchgeführt werden: Xiao et. al. (2011) zeigten, dass nach photoautotropher Kultur das Überleben der Kulturen ex vitro wesentlich verbessert wurde. Ein Versuch anhand von *Solanum tuberosum* zeigte, dass bei photoautotropher Kultivierung die Funktionsfähigkeit der Stomata erhalten bleibt (Zobayed et al. 1999). Des Weiteren konnte durch das Fehlen der Saccharose eine Verringerung der Kontamination der Gefäße mit Mikroorganismen beobachtet werden (Kubota et al., 1999).

Erste Untersuchungen an der Pappel hatten sich mit dem Einfluss von Saccharose-Konzentration, Gefäßverschluss und Lichtintensität auf die Entwicklung klassischer Nodienexplantate ohne Blatt beschäftigt (Schnur, 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Nodienexplantate mit Blatt eingesetzt und die Saccharose-Konzentration im Nährmedium zwischen 0 und 3% variiert, die Auswirkungen eines Kulturverschlusses mit Bohrung untersucht sowie der Einfluss von erhöhtem Kohlendioxid-Gehalt in der Luft evaluiert werden. Alle Versuche wurden bei Lichtintensitäten von 40 und 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durchgeführt. Entwicklung und Wachstum der Kulturen sollten anhand definierter Parameter (Blattanzahl, Nodienzahl, Länge des Sprosses, Blattfläche, Frischgewicht und Chlorophyll-Gehalt der Blätter) beschrieben und nach statistischer Bearbeitung bewertet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial wurde vom Department für Ökogenomik und Systembiologie der Universität Wien zur Verfügung gestellt. Ursprünglich stammte es vom Institut für Forstgenetik in Waldsiedersdorf, Deutschland. Dabei handelt es sich um in vitro-Kulturen einer Hybride (*Populus alba* x (*P. davidiana* + *P. simonii*) x *P. tomentosa*), die in China gezüchtet wurden. Die drei Monate alten Pappelkulturen waren von Schnur im Rahmen ihrer Diplomarbeit subkultiviert worden (Schnur, 2013).

Die Vermehrung der Pflanzen erfolgte über Nodienkulturen. Für die verschiedenen Versuche wurde das Blatt am Nodium beibehalten, bei der routinemäßigen Vermehrung entfernten wir das Blatt vom Explantat.

2.2. Nährmedien

Bei den verwendeten Nährmedien handelte es sich um modifizierte Medien nach Linsmaier und Skoog (1965) mit halber Konzentration an Makroelementen ($\frac{1}{2}$ LS-Medium). Insgesamt wurden vier Nährmedien mit unterschiedlicher Saccharose-Konzentration zubereitet.

Zur Bereitung des Nährmediums wogen wir die entsprechende Menge der Fertigmischung des LS-Mediums (Duchefa Biochemie, Niederlande), sowie der benötigten Menge Gelrite[®] (Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) und Saccharose (0, 10, 20 oder 30 g·l⁻¹ in Form von handelsüblichem Haushaltszucker) ein. Die Komponenten wurden mit destilliertem Wasser in einem Messkolben vermengt und am Magnetrührer so lange gerührt, bis die Suspension homogen war. Nach Auffüllen auf das Endvolumen wurde durch Zugabe von KOH bzw. HCl ein pH-Wert von 5,7±0,1 eingestellt. Anschließend füllten wir das Nährmedium zu je 40 ml in die Kulturgefäße ab, die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten. Nach

dem Abkühlen wurden die Kulturgefäße in einem dunklen Kühlraum bei 5 ± 1 °C gelagert.

2.3. Kulturbedingungen

Als Kulturgefäße wurden Babynahrungsgläser der Firma Hipp® verwendet (Höhe: 12,5 cm; Durchmesser: 5,5 cm). Jedes Glas war mit 40 ml des entsprechenden Nährmediums befüllt, verschlossen wurden die Kulturgefäße mit Magenta® B-Caps. Die Hälfte dieser Verschlüsse wiesen eine Bohrung von 0,8 mm Durchmesser auf. Damit keine Kontamination stattfinden konnte, waren auf diese Bohrungen an der Außenseite des Deckels Membranfilterscheiben angebracht (Porenweite 0,04 µm; Sun Biofilter, Mitomi Industrial Corporation, Japan). Die Bohrungen sollten dazu dienen, den Gasaustausch zwischen Außen- und Innenraum zu begünstigen.

Pro Medium wurden 5 Gläser mit jeweils 4 Explantaten beimpft und mit Parafilm® verschlossen.

In einem ersten Versuch teilten wir die Kulturen in zwei Hauptgruppen auf. Die Kulturen der ersten Hauptgruppe wurden bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ inkubiert, die Kulturgläser der zweiten Hauptgruppe bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF (photosynthetic photon flux; photosynthetisch aktive Strahlung). In beiden Gruppen kamen die vier verschiedenen Saccharose-Konzentration im Nährmedium zum Einsatz, einmal in Kulturgefäßen mit einem normalen Deckel und einmal mit einem Membrandeckel (Verschlüsse mit einer Bohrung, siehe Abbildung 1, Seite 7). Die Kultivierung erfolgte in Heraeus®-Prüfgutschränken, die Lichtintensität betrug im ersten Schrank $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und im zweiten Schrank $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bei einer Temperatur von 25 ± 1 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Die Lichtperiode betrug immer 16 Stunden.

Bei einer zweiten Versuchsreihe wurde die Auswirkung eines erhöhten Kohlendioxid-Partialdrucks im Gasraum der Kulturgefäße auf das Wachstum der Pflanzen untersucht. Dazu setzten wir wieder vier verschiedene Saccharose-Konzentrationen im Nährmedium ein (0, 10, 20

und $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Saccharose), der Verschluss der Kulturen erfolgte mit Membrandeckeln, und die Lichtintensität betrug $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Um den CO_2 -Anteil im Gasraum, der in der Luft normalerweise 0,03 % beträgt, auf 2 % zu erhöhen, wurden die Kulturen mit einer Kristallisierschale mit 200 ml Warburg-Puffer (Warburg et al., 1962) unter ein Aquarium (30x30x60 cm) platziert. Eine Kontrollgruppe, die unter den gleichen Konditionen, jedoch ohne Warburg-Puffer, kultiviert wurde, diente als Referenz. Pro Nährmedium und Gruppe kamen wieder 5 Kulturgläser mit je 4 Explantaten zum Einsatz, die Kultivierung erfolgte ebenfalls in einem Heraeus®-Prüfgutschrank bei einer Temperatur von $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einer Lichtperiode von 16 Stunden.

Die Versuchsdauer wurde für beide Experimente auf 8 Wochen begrenzt, da aus Vorarbeiten (Schnur, 2013) bekannt war, dass unter den genannten Kulturbedingungen eine längere Versuchsdauer zum Absterben der Kulturen führt.

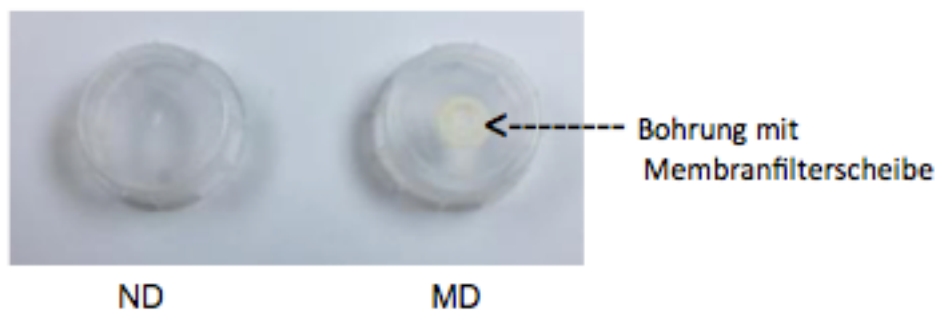


Abbildung 1: Magenta® B-Caps ohne Bohrung (links, ND) und als Membrandeckel (rechts, MD)

2.4. Kulturauswertung

Während der achtwöchigen Kulturperiode wurden die Explantate wöchentlich optisch begutachtet, um Veränderungen wie z.B. Wurzelbildung, Wachstumsgeschwindigkeit und eventuelle Auffälligkeiten protokollieren zu können. Die Auswertung der Kulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen, da die Nodien zur weiteren Vermehrung verwendet wurden. Dabei erhoben wir die folgenden Parameter:

- Frischgewicht der regenerierten Sprosse: Hierfür wurde die Wurzel mit dem Ursprungsnodium (Nodium mit Blatt, welches als Inokulum eingesetzt worden war) entfernt und der Spross gewogen.
- Blattanzahl: Hierzu erhoben wir die Zahl aller sichtbaren Blätter, unabhängig von ihrer Größe.
- Sprosslänge: Die Vermessung erfolgte mittels eines laminierten Millimeterpapiers, welches vor Messung eines jeden Sprosses mit 70proz. Ethanol gereinigt wurde, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden.
- Blattfläche: Die Abtrennung der Blätter vom Spross erfolgte so, dass maximal 1 mm des Blattstiels am Blatt verblieb. Mit Hilfe eines Flachbettscanners wurden die Blätter in der Folge eingescannt. Dazu legten wir die Blätter in jener Reihenfolge, in der sie am Spross wuchsen, in eine transparente Folie ein und digitalisierten sie.
Mit der Software ImageJ® (National Institute of Health, U.S.A.) erfolgte im Anschluss die Vermessung jeder einzelnen Blattfläche.
- Chlorophyllgehalt der Blätter: Mit dem Chlorophyllmeter SPAD-502 (Firma Konica Minolta, Japan, siehe Abbildung 2, Seite 9) konnte der Chlorophyllgehalt der einzelnen Blätter bestimmt werden.



Abbildung 2: Chlorophyllmeter SPAD-502 (Konica Minolta, Japan)

Die Werte wurden in SPAD-Units angegeben, diese Einheit ist von Konica Minolta selbst definiert und wird geräteintern aus der Absorption des Lichtes bei 650 nm durch das Chlorophyll im Blatt berechnet (Konica Minolta, 2009). Pro Blatt wurden an fünf verschiedenen Stellen Messungen durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet. Da die Blätter schnell verwelkten, vermaßen wir direkt nach dem Scannen (siehe oben) in der transparenten Folie, weshalb von dem Mittelwert ein Kompensationsfaktor von 0,61 abgezogen werden musste. Dieser Faktor ergab sich durch die Messung von 20 Blättern mit und ohne Folie und diente der Kompensation des Messfehlers durch die Folie.

- Nodienanzahl: Die Anzahl an neu gebildeten Nodien wurde ermittelt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte dann mit dem Programm Statistica® (Statsoft Inc., USA, Version 6). Es wurden mit den erhaltenen Daten sowohl einfaktorielle als auch mehrfaktorielle Varianzanalysen bei einem Signifikanzniveau von 0,05 durchgeführt.

3. Ergebnisse

Bereits während der 8-wöchigen Kulturdauer der Pappelnodien konnten optische Unterschiede zwischen den Kulturen wahrgenommen werden. In der ersten Versuchsreihe konnten wir z.B. beobachten, dass das Wachstum der Explantate in Kulturen mit einem normalen Deckel wesentlich schlechter war als in Kulturen mit einem Membrandeckel (siehe Abbildung 3). Zudem spielte der Saccharose-Gehalt hinsichtlich des Chlorophyllgehalts der Blätter eine Rolle: Sichtbar war ein deutlicher farblicher Intensitätsunterschied zwischen Blättern auf Medium mit 0% Saccharose und Blättern auf Medium mit 3% Saccharose (siehe Abbildung 4, Seite 11).



a)



b)

Abbildung 3: Einfluss des Gefäßverschlusses auf die Entwicklung von Pappelkulturen bei $40 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Licht, Kultur mit normalem Deckel (a) und Kultur mit Membrandeckel (b)



a)



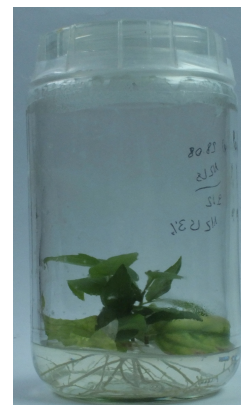
b)

Abbildung 4: Einfluss des Saccharose-Gehalts im Nährmedium auf die Chlorophyllbildung in Pappelkulturen mit Membrandeckel bei $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Licht, helle und teilweise entfärbte Blätter auf Medium ohne Saccharose (a) und kräftig grün gefärbte Blätter auf Medium mit 3 % Saccharose (b)

In der zweiten Versuchsreihe, in welcher der CO_2 -Gehalt im Gasraum erhöht worden war und die Kultur auf Medium ohne Saccharose bzw. mit 3% Saccharose erfolgte, fiel der Unterschied bezüglich der Chlorophyllbildung weit geringer aus. Auf den ersten Blick schien es außer bei der Sprosslänge, die bei höherer Saccharose-Konzentration im Nährmedium geringer war, kaum sichtbare Differenzen zu geben. Dies könnte auf einen hohen Ethylen-Gehalt zurückgeführt werden (s. Abb. 5). Ähnliches wurde bei *Solanum tuberosum* beobachtet: Die Pflanzen, welche unter einem erhöhten CO_2 -Gehalt kultiviert wurden, wiesen zwar eine hohe Anzahl an Blättern auf, jedoch entwickelten sich morphologische Anomalien (Cournac et al., 1991).



a)



b)

Abbildung 5: Einfluss des Saccharose-Gehalts im Nährmedium auf Pappelkulturen mit Membrandeckel bei $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Licht und 2 % CO_2 , Nährmedium ohne Saccharose (a) und mit 3 % Saccharose (b)

In den nachfolgenden Unterkapiteln wird der Einfluss der Lichtintensität, der verwendeten Deckel, der Saccharose-Konzentrationen und der Erhöhung des CO₂-Partialdruckes auf Sprosslänge, Frischgewicht, Nodienanzahl, Blattzahl, Chlorophyllgehalt und Blattfläche erörtert.

3.1. Einfluss der Kulturbedingungen auf das Frischgewicht der regenerierten Sprosse

Die Auswirkungen von Lichtintensität (PPF=40 oder 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Art des Verschlusses der Kulturgefäße (normaler Deckel oder Membrandeckel), Saccharosegehalt im Nährmedium und CO₂-Konzentration im Gasraum auf das Frischgewicht der regenerierten Sprosse (Spross ohne Ursprungsnodium und Wurzeln) wurden erfasst.

Betrachten wir zunächst nur den Einfluss einer Lichtintensität von 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ - in Abhängigkeit von unterschiedlichen Verschlüssen der Kulturgefäße und Saccharose-Konzentrationen, erkennen wir anhand der Abbildung 6 (Seite 13), dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den Kulturen ohne Saccharose und mit normalem Verschluss und den restlichen Gruppen gab. Man kann vermuten, dass bei Abwesenheit von Saccharose ein Membranverschluss in einem Minimum an Photosynthese resultierte, was zu dem im Vergleich zu Kulturen mit normalem Deckel gesteigerten Frischgewicht führte. Bei Zusatz von Saccharose machte sich die verbesserte Belüftung durch Membrandeckel jedoch nicht mehr bemerkbar.

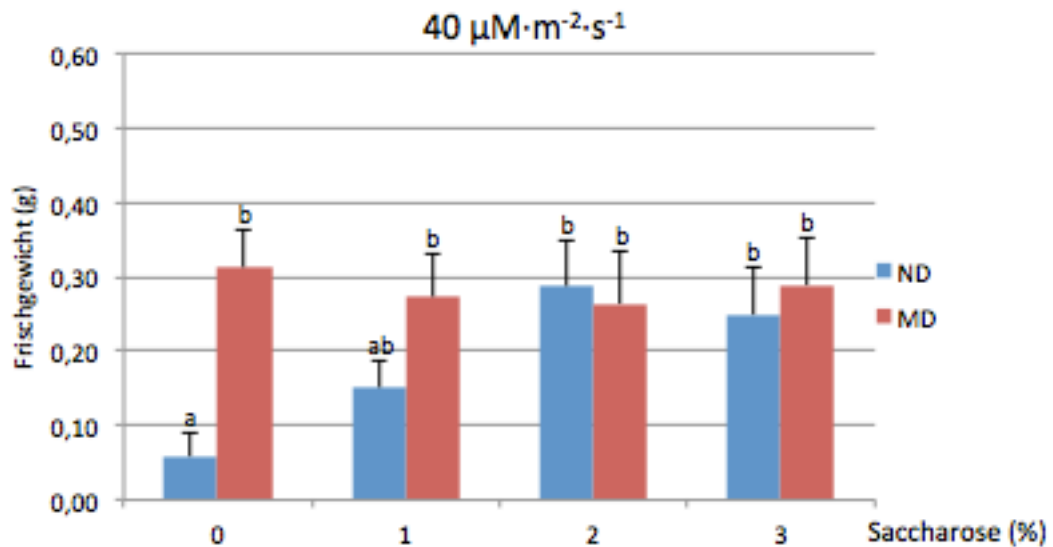


Abbildung 6: Einfluss von Lichtintensität ($40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Saccharose-Konzentration im Medium und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf das Frischgewicht der Sprosse in Nodienkulturen der Pappel, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Bei einer Lichtstärke von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sieht man das gleiche Resultat (Abbildung 7). Signifikant unterschied sich nur die Gruppe mit 0 % Saccharose und normalem Verschluss von allen anderen Gruppen, wobei das Frischgewicht tendenziell etwas höher lag als bei den Versuchen mit $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

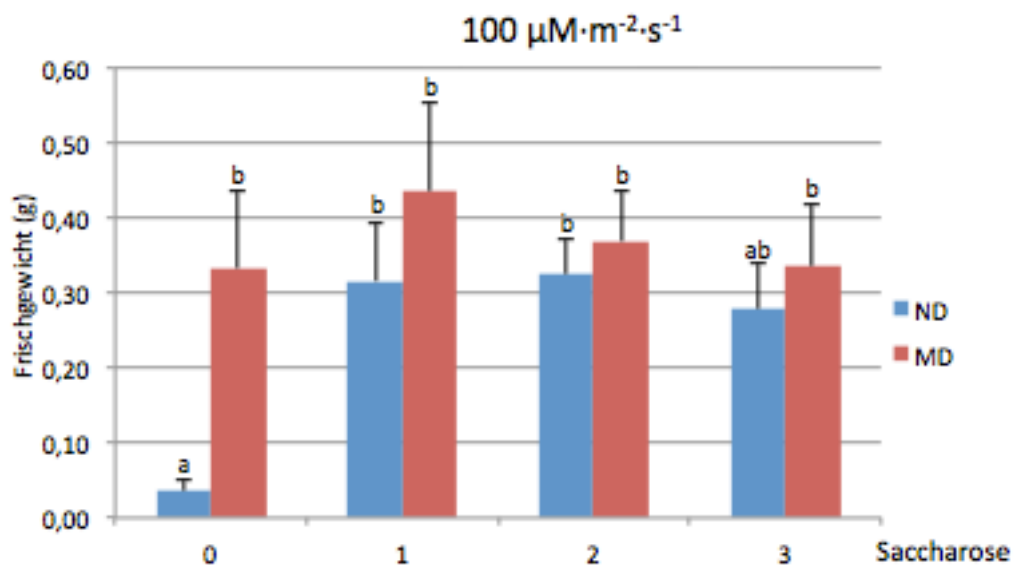


Abbildung 7: Einfluss von Lichtintensität ($100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Saccharose-Konzentration im Medium und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf das Frischgewicht, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

In der nachfolgenden Abbildung 8 ist der Einfluss von Lichtintensität und Verschluss der Kulturgefäße dargestellt. Nachdem die Saccharose-Konzentration keine signifikante Auswirkung auf das Frischgewicht der Sprosse gezeigt hatte (Abb. 6, Seite 13), wird dieser Parameter für eine bessere Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt. Wir können feststellen, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen 40 und 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht sowie zwischen Kulturen mit normalem Deckel und solchen mit Membrandeckel gab. Wurde die Pappel bei einer höheren Lichtintensität und mit Membrandeckel kultiviert, so erzielte man ein höheres Frischgewicht.

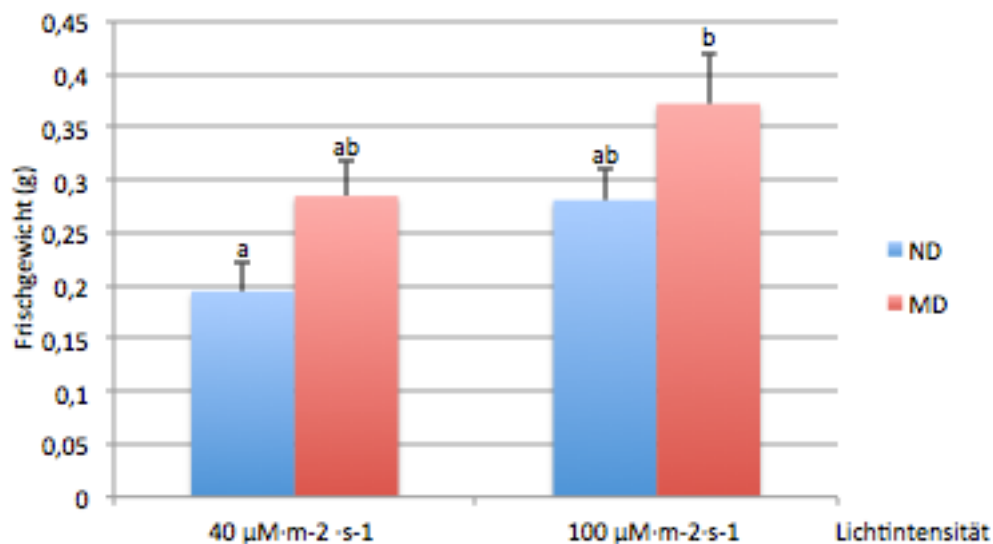


Abbildung 8: Einfluss der Lichtintensitäten (40 und 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und der Verschlüsse der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf das Frischgewicht, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Lassen wir die Lichtintensität, welche nur geringe Auswirkungen hatte (Abb. 8) außer acht, und betrachten den Einfluss von Saccharose-Konzentration und Verschluss der Kulturgefäße auf das Frischgewicht, so wird deutlich, dass sich nur die Gruppe ohne Saccharose und mit normalem Verschluss signifikant von den anderen Gruppen unterschied (Abbildung 9, Seite 15). In dieser Gruppe betrug das Frischgewicht durchschnittlich 0,05 g, während es sonst bis zu 0,35 g erreichte.

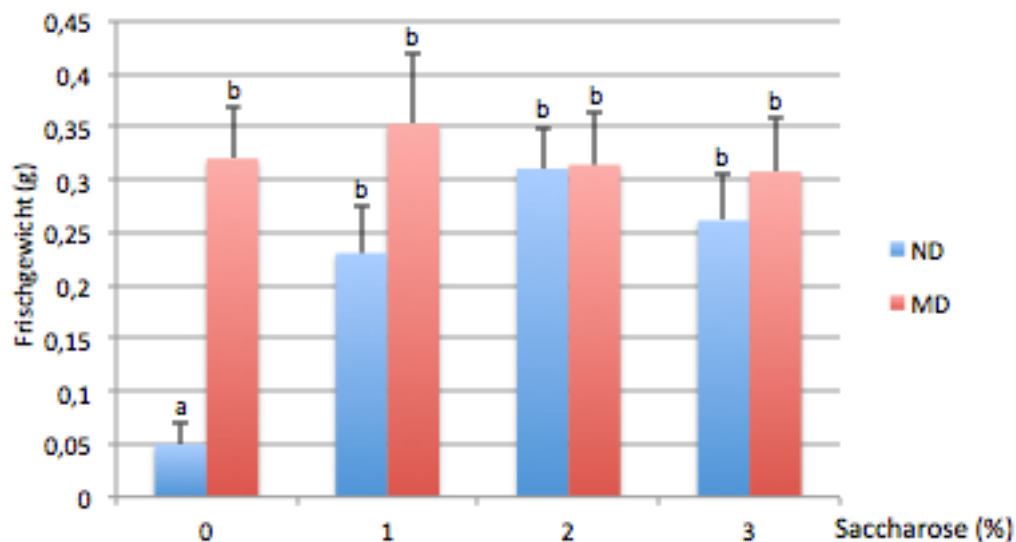


Abbildung 9: Einfluss von Saccharose-Konzentration und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf das Frischgewicht, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Betrachten wir nun die Ergebnisse des CO_2 -Versuches, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Entwicklung von Explantaten auf Nährmedium ohne Saccharose und solchen auf Medium mit 3 % Saccharose. Beide Gruppen wurden bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und mit einem Membrandeckel als Gefäßverschluss kultiviert. Eindeutig bessere Ergebnisse erhielten wir bei einem erhöhten CO_2 -Gehalt von 2 % und ohne Saccharose im Nährmedium: Hier betrug das mittlere Frischgewicht 0,38 g. Mit zunehmender Saccharose-Konzentration nahm das Frischgewicht ab, bei 3 % Saccharose und erhöhter CO_2 -Konzentration erhielten wir ein Frischgewicht von 0,18 g (Abbildung 10, Seite 16). Der Grund für die Gewichtsabnahme könnte eine größere Menge an Ethylen gewesen sein, das durch die höhere Menge an Saccharose freigesetzt wurde (Cournac et al., 1991).

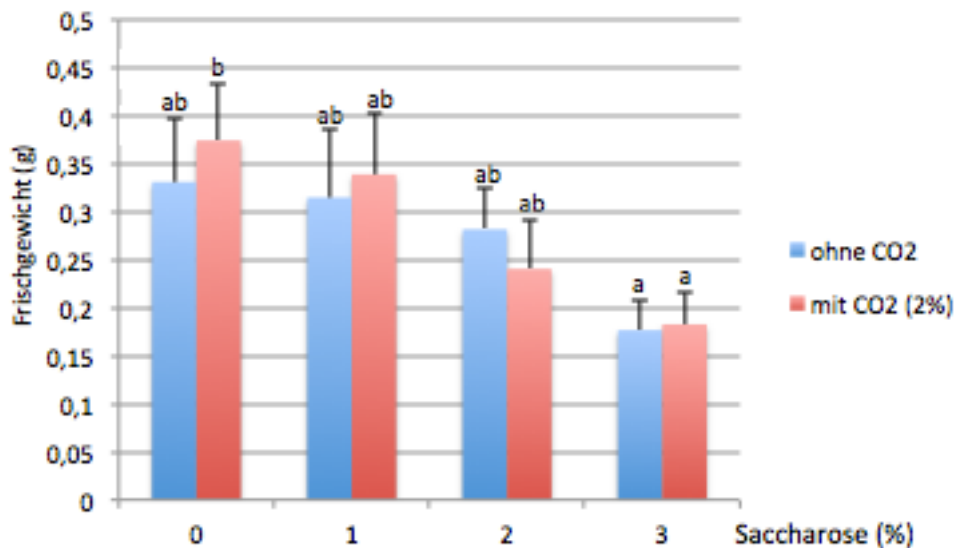


Abbildung 10: Einfluss von erhöhtem CO₂-Gehalt im Gasraum (2 %) und Saccharose-Konzentration auf das Frischgewicht, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das höchste Frischgewicht bei $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 1% Saccharose und mit einem Membrandeckel erreicht wurde. Außerdem konnten wir beobachten, dass durch zunehmende Saccharose-Konzentration das Wachstum der Pflanze gehemmt wurde, unabhängig davon, ob der CO₂-Gehalt im Gasraum erhöht war oder nicht.

3.2. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Sprosslänge

Im unten dargestellten Diagramm ist der Einfluss der Saccharose-Konzentration (0, 1, 2 und 3 %) und die Verschlussart der Kulturgefäße bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dargestellt (Abbildung 11, Seite 17). Es ist ersichtlich, dass sich wieder die Gruppe mit normalem Deckel und ohne Saccharose signifikant von den anderen untersuchten Gruppen unterschied: Die durchschnittliche Sprosslänge betrug hier 1,3 cm, es kommt zu einer Trendumkehr mit steigender Saccharose-Konzentration. Die anderen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

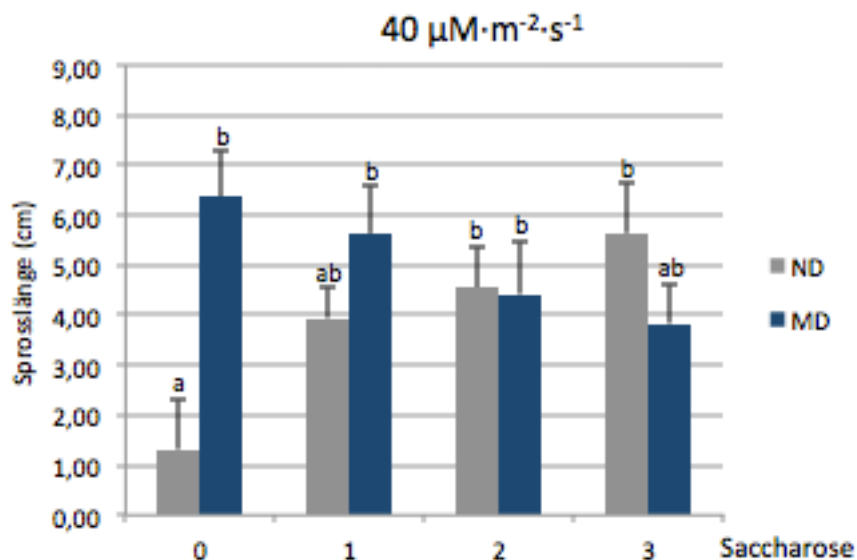


Abbildung 11: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

In der nächsten Versuchsreihe wurden die Kulturen bei $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht gehalten, ebenfalls mit unterschiedlichen Saccharose-Konzentrationen und zwei Arten von Verschlüssen (normalem und Membrandeckel) (Abb.12, Seite 18). Signifikant unterschied sich nur die Gruppe mit normalem Deckel und 0 % Saccharose von allen anderen Gruppen. Vergleichen wir die Kulturen ohne Saccharose im Nährmedium, aber mit unterschiedlichen Deckeln, so ergab sich für die Gruppe mit normalem Deckel eine durchschnittliche Sprosslänge von 0,6 cm. Die Pappeln, die mit einem Membrandeckel kultiviert worden waren, erreichten eine durchschnittliche Sprosslänge von 6,0 cm.

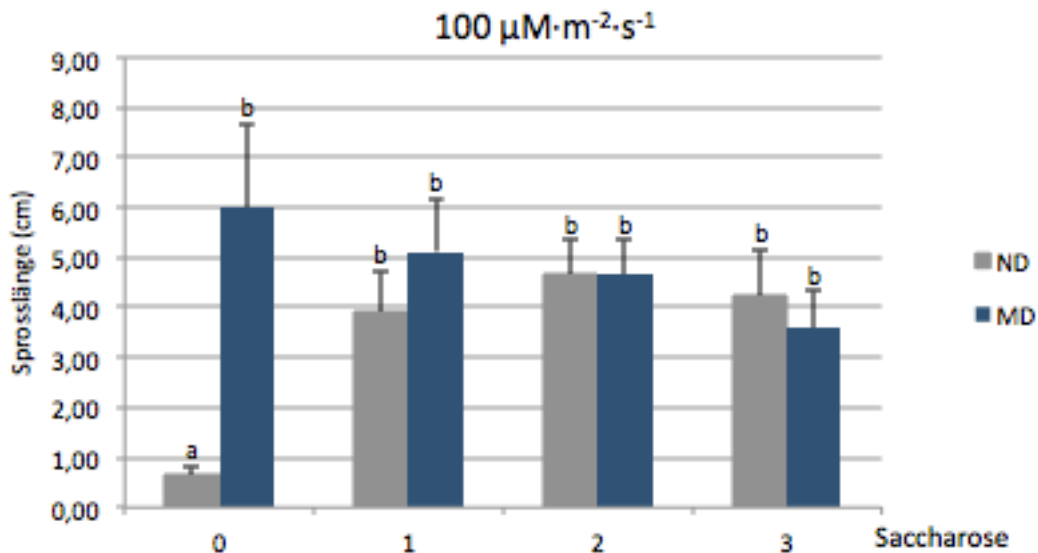


Abbildung 12: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Im folgenden Diagramm werden die zwei Verschlüsse der Kulturgefäße mit den zwei unterschiedlichen Lichtintensitäten verglichen (Abb. 13). Die verschiedenen Saccharose-Konzentrationen sind dabei nicht berücksichtigt, da ihr Einfluss nicht signifikant war (Abb. 12). Ersichtlich ist, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen gab.

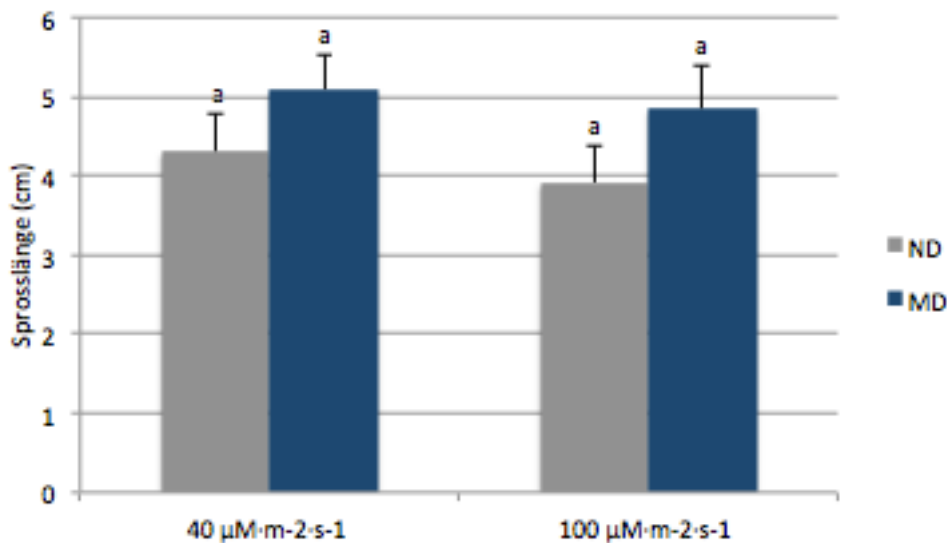


Abbildung 13: Einfluss von Lichtintensität und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die unterschiedlichen Saccharose-Konzentrationen mit normalem Deckel und Membrandeckel beschrieben. Die Lichtintensität wurde nicht mit einbezogen, da sie keinen signifikanten Einfluss auf die Kulturen gezeigt hatte (Abb. 13, Seite 18). Bei diesem Versuch waren einige signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zu beobachten (Abb. 14). Die geringste Sprosslänge (etwa 1 cm) erzielte man bei den Pappeln auf Nährmedium ohne Saccharose und mit einem normalen Deckel ohne Bohrung. Bei Einsatz eines Membrandeckels konnte auf demselben Nährmedium mit 6,2 cm eine 6-fach größere Sprosslänge beobachtet werden. Eine zunehmende Saccharose-Konzentration im Nährmedium bewirkte bei den Kulturen mit normalem Deckel einen Anstieg der Sprosslänge, während die Verwendung eines Membrandeckels einen entgegengesetzten Trend bewirkte.

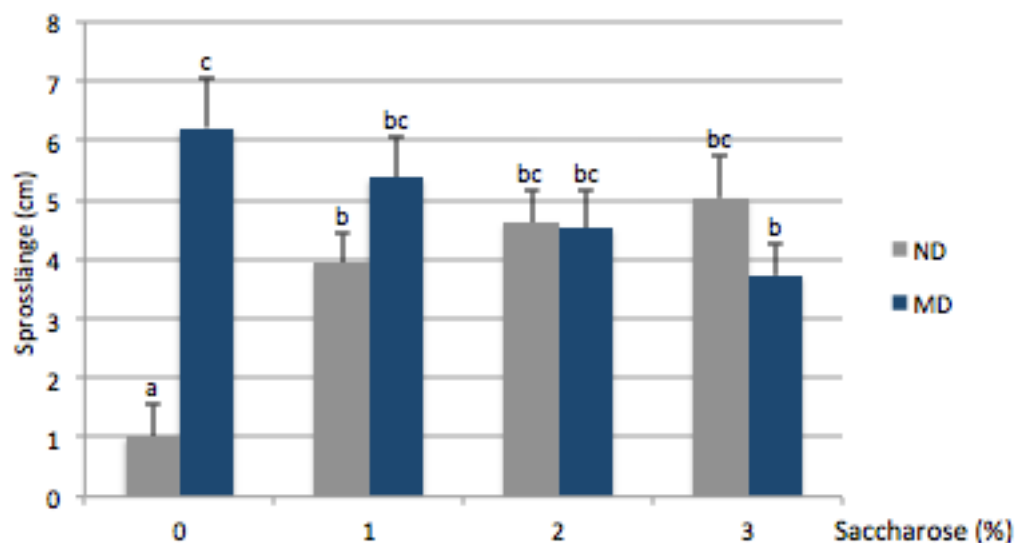


Abbildung 14: Einfluss von Saccharose-Konzentration im Nährmedium und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Die Resultate, welche wir im Versuch der Erhöhung des CO₂-Gehaltes im Kulturgefäß erhalten haben, sind in Abbildung 15 dargestellt. In diesem Fall wurde zusätzlich zu den verschiedenen Saccharose-Konzentrationen der CO₂-Gehalt im Gasraum auf 2 % erhöht. Es wurden alle Kulturen mit einem Membrandeckel ausgestattet und bei einer gleichbleibenden Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ kultiviert. Als Referenz dienten Kulturen, die unter normaler Atmosphäre („ohne CO₂“) kultiviert wurden.

Ein erhöhter CO₂-Gehalt schien keinen Einfluss auf die Sprosslänge zu haben. Den höchsten Wert erhielten wir bei 0 % Saccharose im Nährmedium. Hier betrug die durchschnittliche Länge bei Kulturen ohne CO₂ 6,7 cm und bei jenen mit 2 % CO₂ 6,5 cm. Die kürzesten Sprosse konnten wir bei 3 % Saccharose im Nährmedium beobachten: Die Länge ohne CO₂ betrug 2,9 cm und mit CO₂ 2,3 cm. Möglicher Grund für das geringere Längenwachstum bei höherer Saccharose-Konzentration im Medium könnte in einer verstärkten Bildung von Acetaldehyd oder Ethylen durch das pflanzliche Gewebe sein (Cournac et al., 1991).

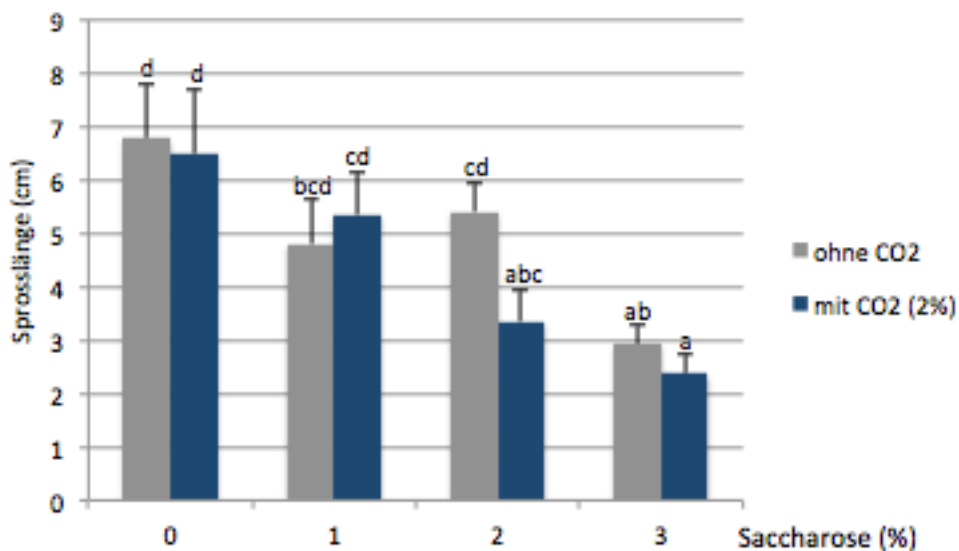


Abbildung 15: Einfluss von CO₂-Gehalt und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und Verschluss mit Membrandeckel auf die Sprosslänge, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Wie auch schon beim Frischgewicht der regenerierten Sprosse war auch bei der Sprosslänge ersichtlich, dass die Kulturen unter photoautotrophen Bedingungen ein besseres Wachstum zeigten. Die höchste Sprosslänge wurde bei $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht, ohne Saccharose und Einsatz eines Membrandeckels beobachtet. Bei Erhöhung des CO_2 -Gehaltes im Kulturgefäß zeigte sich eine Trendumkehr: Je höher die Saccharose-Konzentration im Kulturgefäß war, desto niedriger fiel die Sprosslänge aus, unabhängig vom CO_2 -Gehalt im Kulturgefäß.

3.3. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Nodienanzahl

Im Folgenden wird auf die Auswirkung der verschiedenen untersuchten Kulturparameter auf die Nodienanzahl pro Spross näher eingegangen.

Bei verschiedenen Saccharose-Konzentrationen und bei zwei verschiedenen Arten von Verschlüssen (ND, MD) ist ersichtlich, dass sich einzig die Gruppe mit 0 % Saccharose und normalem Verschluss signifikant von den anderen Gruppen unterschied (Abb. 16, Seite 22). Alle Pflanzen wurden bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ kultiviert. In der vorhin genannten Gruppe bildeten sich durchschnittlich 3,5 Nodien pro Spross, während in den anderen Gruppen zwischen 7,9 und 9,8 Nodien pro Spross gezählt werden konnten.

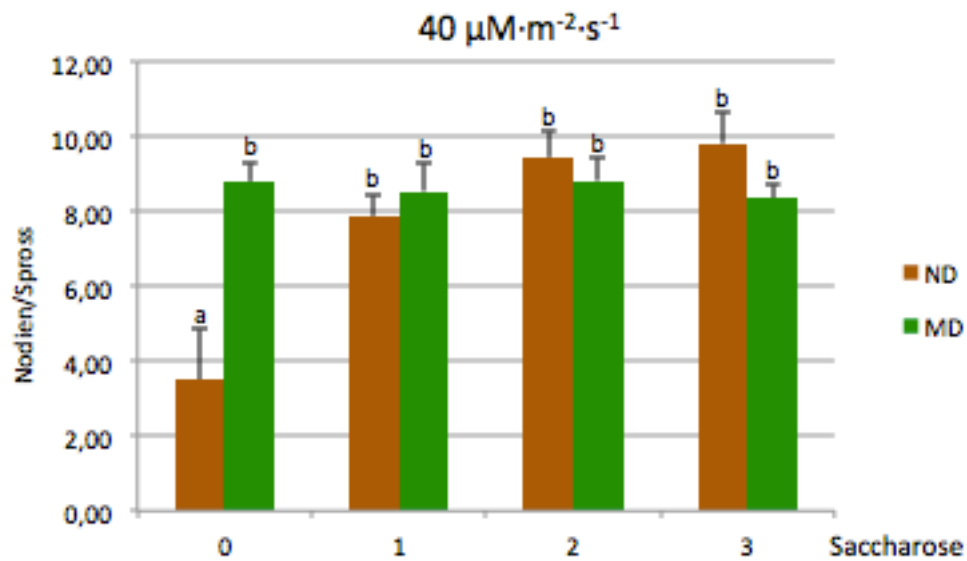


Abbildung 16: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf die Nodienanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Wurden die Pappeln mit unterschiedlichen Saccharose-Konzentrationen und mit zwei Arten von Verschlüssen der Kulturgefäße, aber bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, kultiviert, unterschied sich einzig die Gruppe mit normalem Deckel und ohne Saccharose im Nährmedium signifikant von allen anderen Gruppen: Hier erhielten wir einen durchschnittlichen Wert von 3,2 Nodien pro Spross (Abb. 17, Seite 23). Bei den anderen Gruppen, welche sich untereinander nicht signifikant voneinander unterschieden, bildete sich eine durchschnittliche Anzahl von 6,5 bis 9 Nodien pro Spross aus.

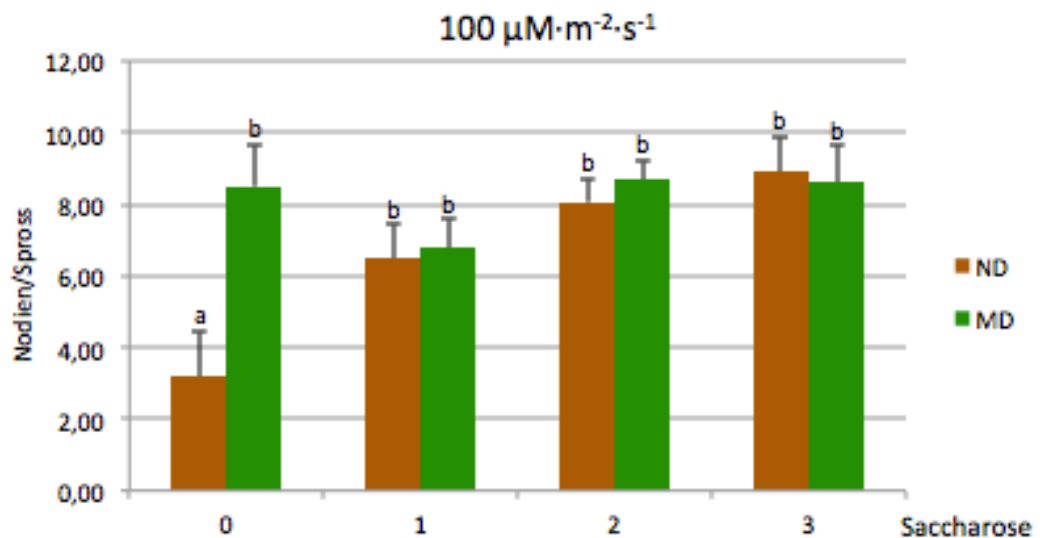


Abbildung 17: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf die Nodienanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Die Saccharose-Konzentration hatte nur einen minimalen Einfluss auf die Kulturen (Abb. 16, Seite 22 und Abb. 17). Betrachtet man nun nur den Effekt der unterschiedlichen Lichtintensitäten und den zwei Arten von Verschlüssen der Kulturgefäße (ND, MD) ohne Berücksichtigung der Saccharose, sieht man, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen jenen Kulturen gab die bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht und mit Membrandeckel kultiviert wurden (8,3 Nodien pro Spross) und jenen Kulturen, die bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und mit normalem Deckel (7,2 Nodien pro Spross) wuchsen (Abb. 18, Seite 24).

Möglicherweise lag dieses Ergebnis daran, dass die Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zu hoch für die Pappeln war und einfach nur eine bessere Belüftung durch den Membrandeckel nötig war.

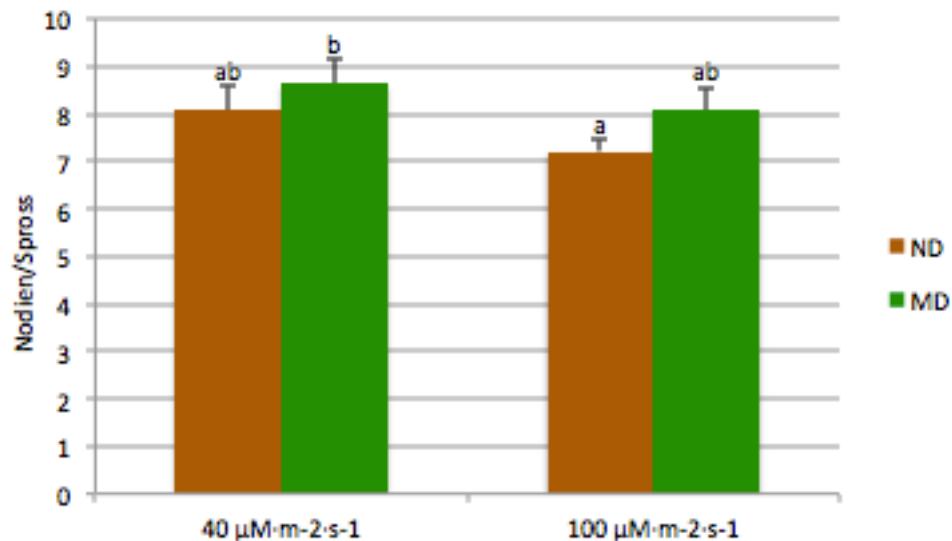


Abbildung 18: Einfluss von Lichtintensität und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf die Nodienanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Lässt man die Lichtintensität, welche keine Auswirkungen auf die Kulturen gezeigt hatte (Abb. 18), außer acht und stellt die Parameter Art des Verschlusses der Kulturgefäße und Saccharose-Konzentrationen einander gegenüber, erhalten wir vergleichbare Ergebnisse wie in den vorherigen Diagrammen. Deutlich signifikant unterschied sich nur die Gruppe mit normalem Deckel und ohne Saccharose im Medium: In dieser Gruppe erhielten wir mit 3,4 Nodien pro Spross den geringsten Wert (siehe Abbildung 19, Seite 25).

Zu erwähnen ist außerdem, dass es einen Unterschied zwischen jenen Pappelkulturen gab, die mit normalem Deckel 1 oder 3% Saccharose im Nährmedium enthielten: Bei 1% Saccharose bildeten sich durchschnittlich 7,2 und bei 3% Saccharose 9,5 Nodien pro Spross.

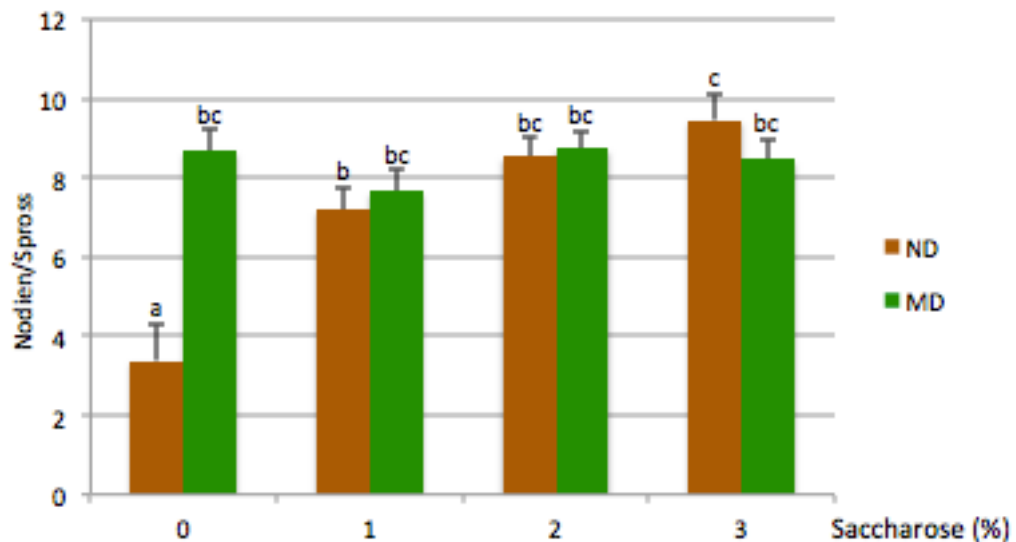


Abbildung 19: Einfluss von Saccharose-Konzentration im Nährmedium und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf die Nodienanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Untersuchen wir nun die Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Saccharose-Konzentrationen und Erhöhung des CO_2 -Gehalts (2%) bei gleichbleibender Lichtintensität ($100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und Verwendung eines Membrandeckels erhalten wurden, stellen wir anhand der Abbildung 20 (Seite 26) fest, dass es keinen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppen gab. Weder der CO_2 -Gehalt im Gasraum noch die Saccharose-Konzentration im Nährmedium hatten einen Einfluss auf die Anzahl der erhaltenen Nodien pro Spross:

In allen Gruppen erhalten wir vergleichbare durchschnittliche Werte zwischen 8,2 und 9,4 Nodien pro Spross.

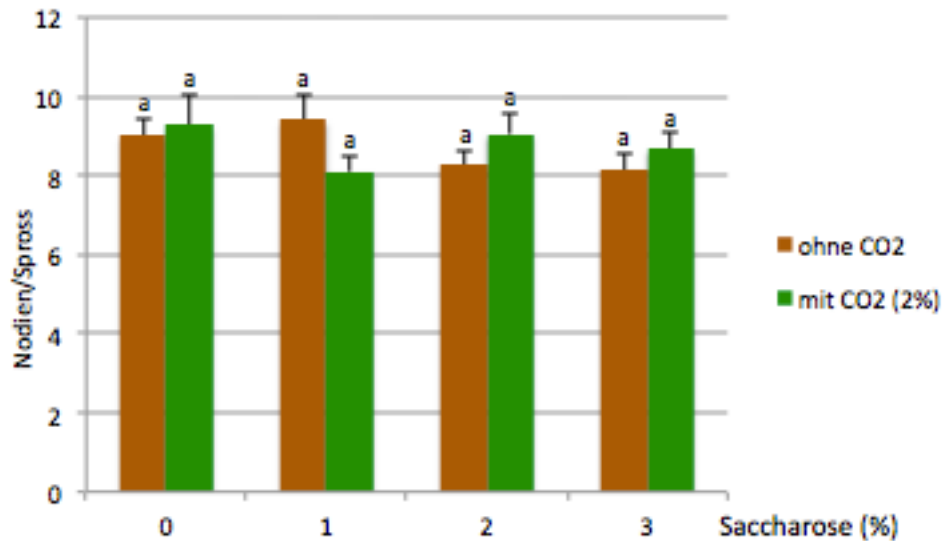


Abbildung 20: Einfluss von CO₂-Gehalt und Saccharose-Konzentration im Nährmedium auf die Nodienanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse bezüglich der Nodienanzahl, so ist ersichtlich, dass eine photoautotrophe Kultivierung diesbezüglich die bessere Wahl ist. Durch Erhöhung der Lichtintensität auf $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ohne Zugabe von Saccharose ins Nährmedium und bei Verwendung eines Membrandeckels zur Verbesserung der Belüftung der Kulturgefäße erzielte man eine hohe Nodienzahl. Die Erhöhung des CO₂-Gehalts (2%) zeigte keinen Einfluss auf die Anzahl der Nodien.

3.4. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Blattzahl

Auch bezüglich der Anzahl neu gebildeter Blätter pro Spross zeigten sich Auswirkungen von Lichtintensität, Saccharose-Konzentrationen, Art des Verschlusses der Kulturgefäße und CO₂-Gehalt im Gasraum, wie im Folgenden erläutert werden soll.

Kombinieren wir die Faktoren Saccharose-Konzentration und Art des Verschlusses der Kulturgefäße bei einer Lichtstärke von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, so erhalten wir folgende Ergebnisse. Es gab wieder nur eine einzige Gruppe, die sich signifikant von den anderen unterschied. Die geringste Blattanzahl (4,2 Blätter pro Spross) wurde bei einer Kultivierung mit einem normalen

Deckel und ohne Saccharose im Nährmedium erreicht. Bei den anderen Gruppen, die sich nicht signifikant voneinander unterscheiden, bildeten sich 6,5 bis 8,9 Blätter pro Spross aus (Abb. 21).

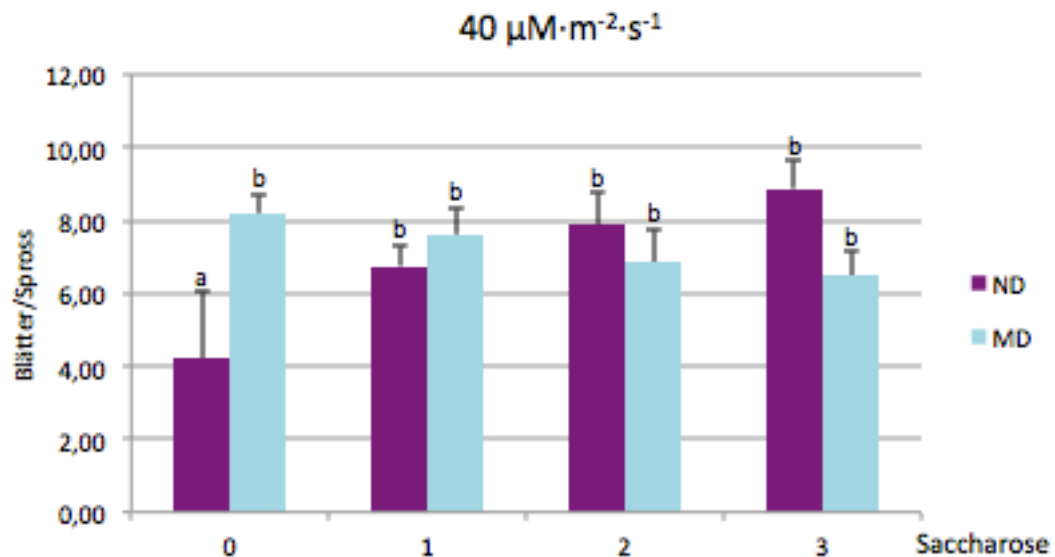


Abbildung 21: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf die Blattanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Ein ähnliches Ergebnis erhielten wir bei einer Erhöhung der Lichtintensität auf $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$: Bei Abwesenheit von Saccharose und normalem Deckel lag die durchschnittliche Zahl an Blättern pro Spross bei 3,7 (Abb. 22, Seite 28). Die Blattzahlen bei 1 % Saccharose und normalem oder Membrandeckel unterschieden sich nicht signifikant davon.

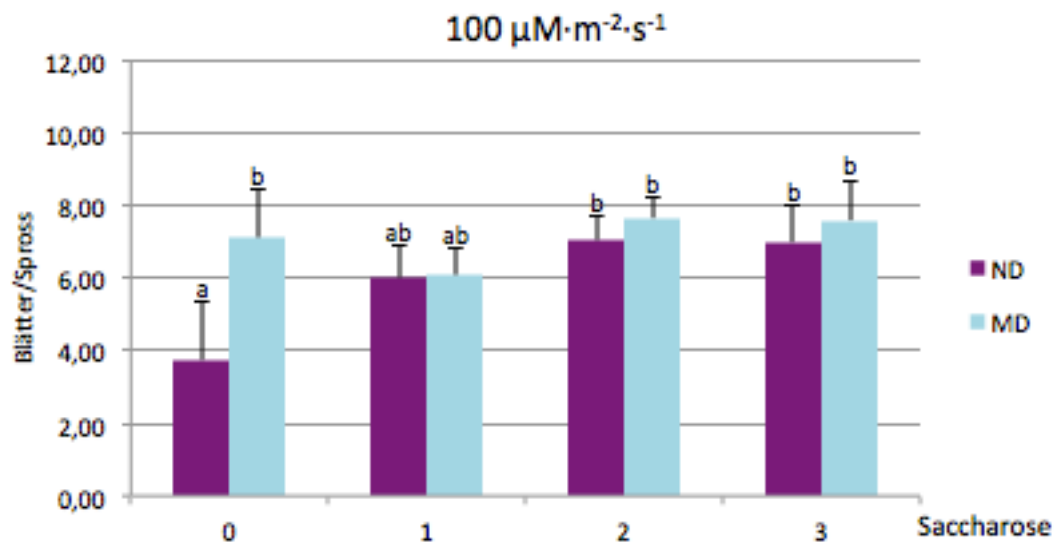


Abbildung 22: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf die Blattanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Lassen wir nun den Faktor Saccharose-Konzentrationen, welcher das Wachstum kaum beeinflusste (Abb. 21, Seite 27 und Abb. 22) außer Acht und vergleichen die Pappelkulturen bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht und zwei Arten von Verschlüssen der Kulturgefäße, so können wir feststellen, dass es keinen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppen gab, durchschnittlich erhielten wir 6,5 bis 7,5 Blätter pro Spross (Abb. 23).

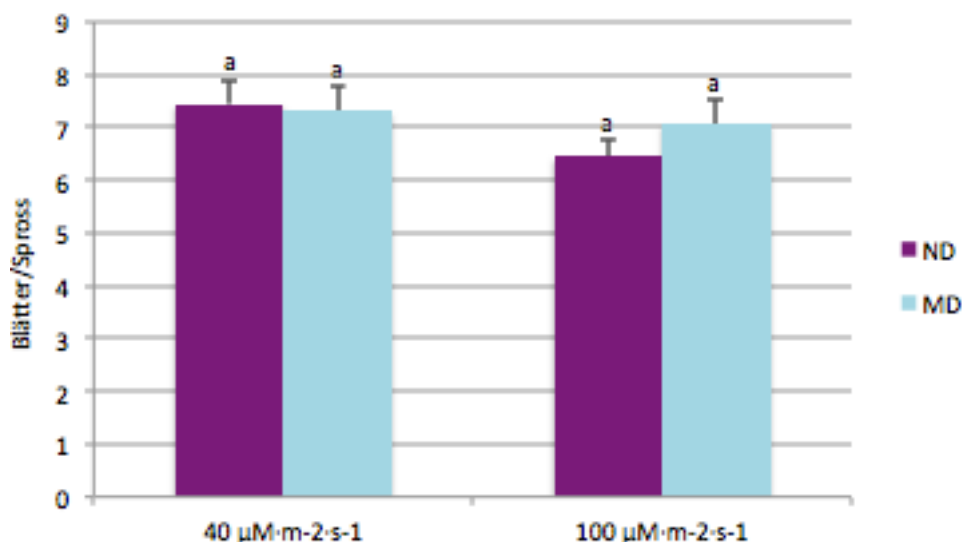


Abbildung 23: Einfluss von Lichtintensität und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf die Blattanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Im folgendem sind die Ergebnisse, die wir bei Variation der Faktoren Saccharose-Konzentration und Art von Verschluss der Kulturgefäße erhalten haben, ohne Berücksichtigung der Lichtintensität dargestellt (letztere hatte keinen signifikanten Einfluss, siehe Abb. 23, Seite 28). Deutlich signifikant unterschied sich nur die Gruppe mit 0 % Saccharose und normalem Verschluss von allen anderen (Abb. 24).

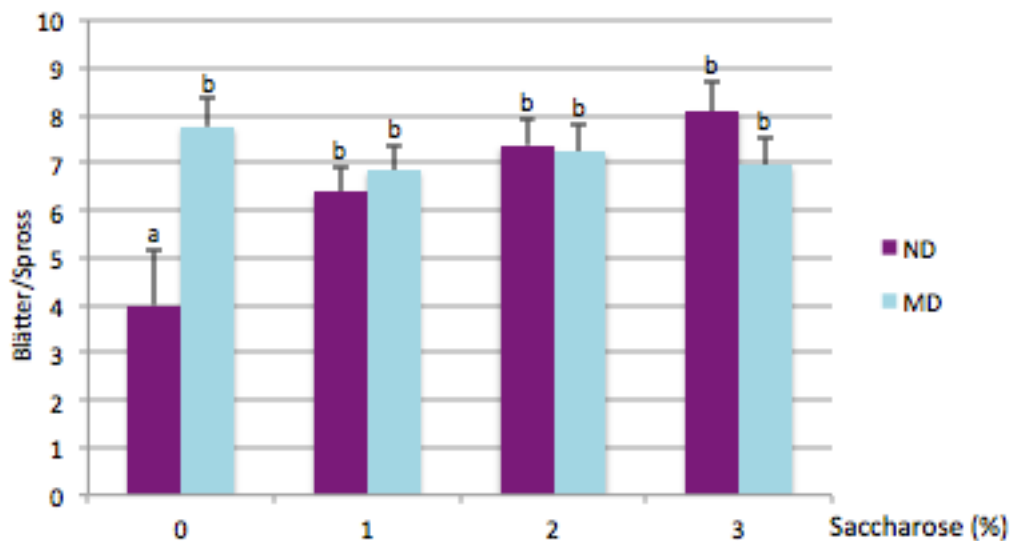


Abbildung 24: Einfluss von Saccharose-Konzentration im Nährmedium und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf die Blattanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Im Versuch zur CO_2 -Erhöhung im Gasraum, wo ebenfalls unterschiedliche Saccharose-Konzentrationen getestet wurden, aber Verschlussart (Membrandeckel) und Lichtintensität ($100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) unverändert blieben, ergaben sich bezüglich der Blattanzahl keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, wie in Abbildung 25 (Seite 30) ersichtlich ist.

Somit können wir davon ausgehen, dass der CO_2 -Gehalt im Gasraum keinen Einfluss hatte: Ausreichend für eine hohe Blattzahl waren die hohe Lichtintensität und der Membrandeckel, der eine bessere Belüftung zwischen Innen- und Außenraum der Kultur ermöglichte.

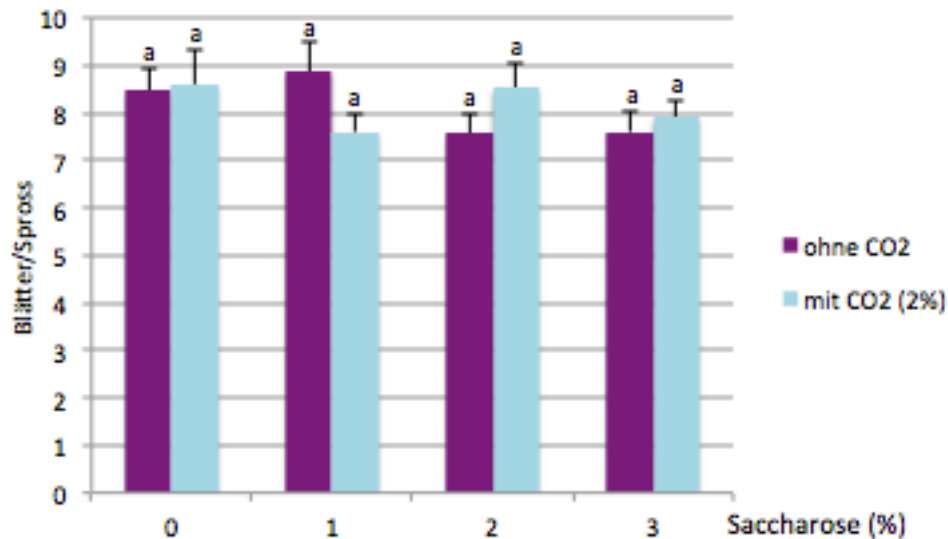


Abbildung 25: Einfluss von CO₂-Gehalt und Saccharose-Konzentration im Nährmedium auf die Blattanzahl pro Spross, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Als Resümee lässt sich feststellen, dass die Kulturen unter photoautotrophen Bedingungen (0% Saccharose, 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht und Membrandeckel) die höchste Blattzahl aufwiesen, wobei allerdings die Erhöhung des CO₂-Gehalts im Gasraum keine Auswirkung auf die Blattzahl zeigte.

3.5. Einfluss der Kulturbedingungen auf die Blattfläche

Betrachten wir nun die Auswirkungen der verschiedenen Saccharose-Konzentrationen (0, 1, 2 und 3%) mit zwei unterschiedlichen Arten von Verschlüssen der Kulturgefäße bei einer gleichbleibenden Lichtintensität von 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, so ist ersichtlich, dass die geringste Blattfläche ohne Saccharose und mit normalem Verschluss erhalten wurde. Die größte Blattfläche wurde bei Zusatz von Saccharose und Verwendung eines Membrandeckels erreicht. Fügte man dem Nährmedium 2 % Saccharose hinzu und verschloss das Kulturgefäß mit einem Membrandeckel, so ergab sich eine mittlere Blattfläche von 930 mm² (Abb. 26, Seite 31).

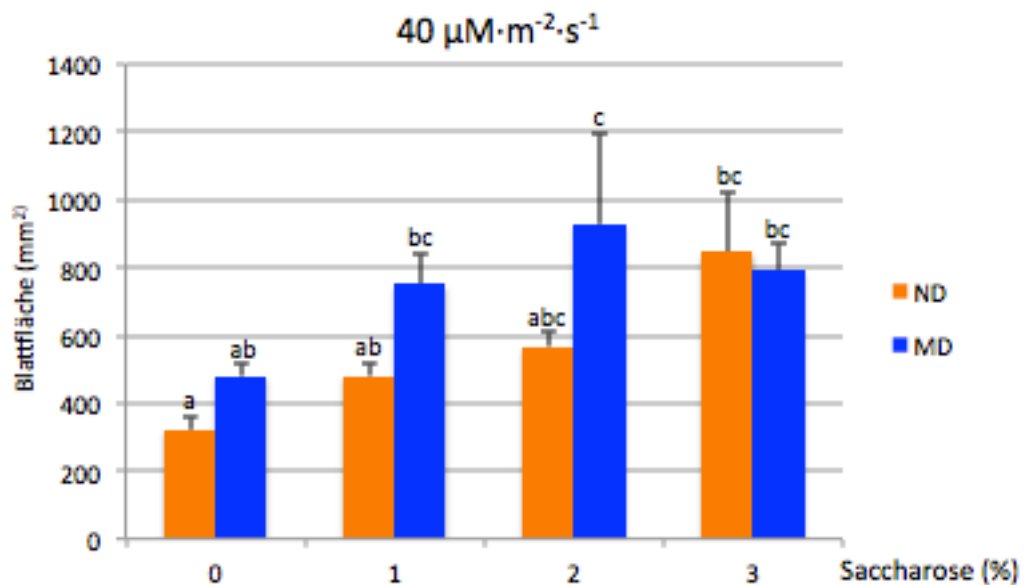


Abbildung 26: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Eine Erhöhung der Lichtintensität auf $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ führte zu den unten dargestellten Ergebnissen (Abb. 27, Seite 32). Der einzige signifikante Unterschied trat innerhalb der mit Membrandeckel verschlossenen Kulturen zwischen 0 und 3 % Saccharose auf: Eine wesentlich geringere Blattfläche erreichen wir bei den Pappel-Kulturen ohne Saccharose im Nährmedium, der Mittelwert betrug hier etwa 420 mm^2 . Fügt man nun dem Nährmedium 3 % Saccharose hinzu, so ergab sich eine mittlere Blattfläche von 1030 mm^2 . Die anderen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

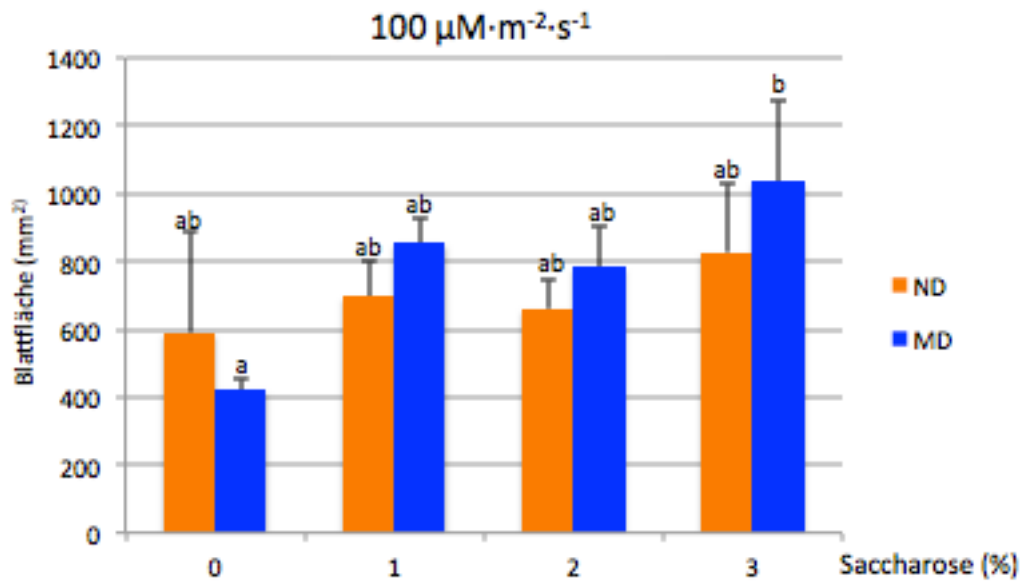


Abbildung 27: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Lassen wir den Parameter Saccharose, welcher kaum Auswirkungen auf die Blattfläche hatte (Abb.27) weg und vergleichen die Kulturen unter zwei Lichtintensitäten (40 und $100 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und mit zwei Arten von Verschlüssen der Kulturgefäße miteinander, so ist festzuhalten, dass diese beiden Parameter keinen Einfluss auf die Blattfläche zu haben schienen (Abb. 28).

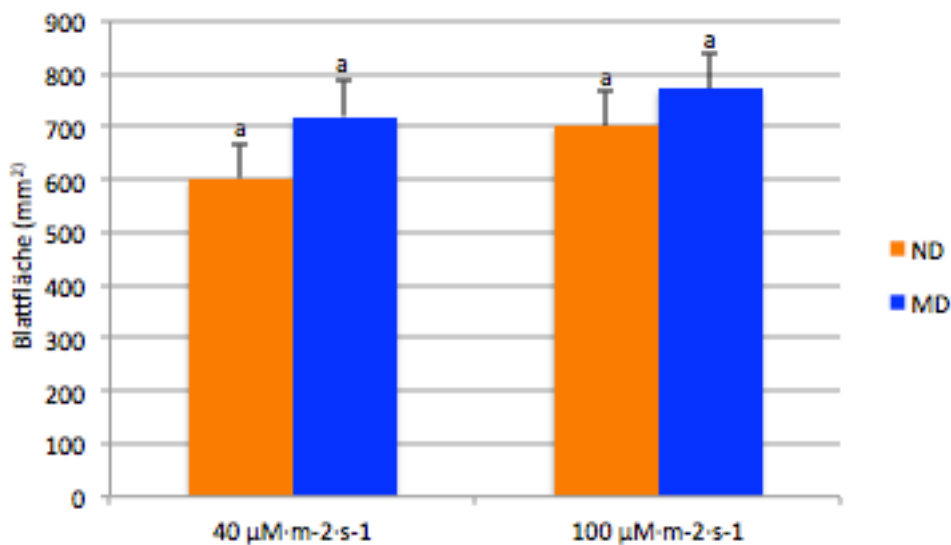


Abbildung 28: Einfluss von Lichtintensität und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Kombinieren wir nun den Faktor Saccharose mit den zwei Arten von Verschlüssen der Kulturgefäße und lassen den Faktor Licht außer Acht (dieser zeigte keinen signifikanten Einfluss, siehe Abb. 28, Seite 32), erhalten wir folgende Ergebnisse, die in Abbildung 29 zusammengefasst werden. Betrachten wir nur die Gruppen mit normalem Verschluss, so zeigt sich, dass die niedrigste Blattfläche mit 470 mm^2 bei 0 % Saccharose erreicht wurde und die höchste Blattfläche bei einem Saccharose-Gehalt von 3 % fast 900 mm^2 betrug.

Betrachten wir nur die Gruppen mit Membrandeckel, lässt sich das gleiche Ergebnis beobachten, wobei ein signifikanter Unterschied nur zwischen der Gruppe mit 0 % Saccharose und den restlichen Gruppen auftrat.

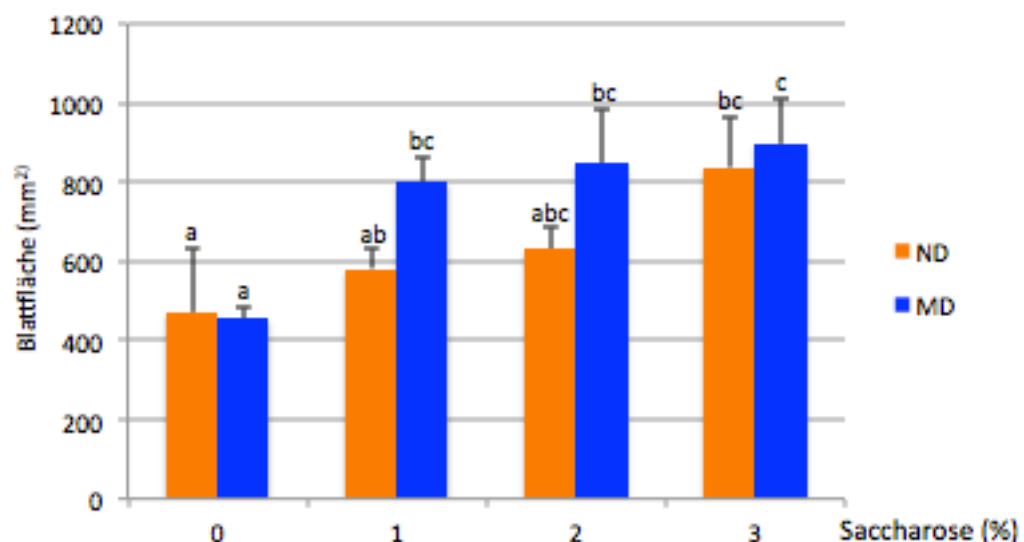


Abbildung 29: Einfluss von Saccharose-Konzentration im Nährmedium und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Fügen wir nun einen weiteren Faktor hinzu, und zwar die Erhöhung des CO_2 -Gehalts im Gasraum, kombinieren diesen mit unterschiedlichen Saccharose-Konzentrationen und verwenden nur Membrandeckel und eine Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, können wir feststellen, dass es keinen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppen gab: CO_2 -Partialdruck und Saccharose

im Nährmedium schienen keinen signifikanten Einfluss auf die Blattfläche zu haben (Abb. 30).

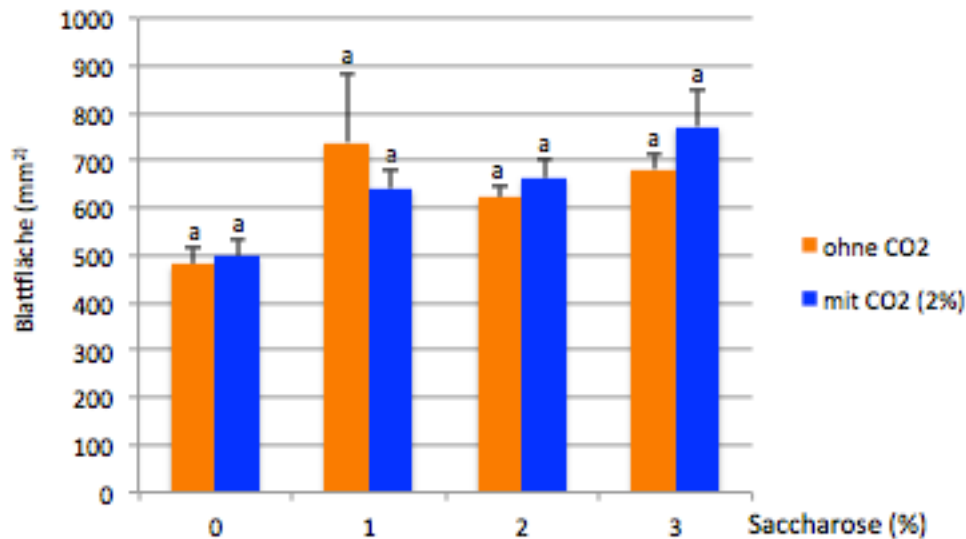


Abbildung 30: Einfluss von CO₂-Gehalt und Saccharose-Konzentration im Nährmedium auf die Blattfläche, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Analysiert man nun die Ergebnisse, die wir bezüglich der Blattfläche erhalten haben, so ist festzustellen, dass die besten Resultate mit einer photoautotrophen Kultivierung erzielt wurden. Einzig die Kulturen, welche bei 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht, ohne Saccharose im Nährmedium und mit normalem Deckel kultiviert wurden, unterschieden sich signifikant voneinander und hatten die geringste Blattfläche. Auch die Erhöhung des CO₂-Gehalts im Gasraum zeigte keine signifikanten Auswirkungen.

3.6. Einfluss der Kulturbedingungen auf den Chlorophyllgehalt

Im folgendem Kapitel werden die Auswirkungen von Lichtintensität, Saccharose-Konzentration im Nährmedium, Verschluss der Kulturen und CO₂-Gehalt im Gasraum in unterschiedlichen Kombinationen miteinander auf den Chlorophyllgehalt der Blätter analysiert.

Bei diesem Versuch wurden der Saccharose-Gehalt im Nährmedium (0, 1, 2 und 3%) und die Art des Verschlusses der Kulturgefäße kombiniert. Die Kultivierung erfolgte bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht. Zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts der Pappelblätter kam das SPAD-502 Handmessgerät der Firma Konika-Minolta zum Einsatz. Die Messergebnisse wurden dabei in sogenannten SPAD-Einheiten (welche von der Firma selbst definiert wurden) gegeben. Je höher dieser Wert ist, desto mehr Chlorophyll ist in den Blättern enthalten.

Signifikante Unterschiede waren, wie in den vorhergehenden Kapiteln schon erwähnt, nur zwischen den Pappelkulturen ohne Saccharose und mit normalen Verschluss und den übrigen Kulturgruppen ersichtlich. In der ersten Gruppe (ohne Saccharose und mit normalem Verschluss) konnten wir einen Chlorophyllgehalt von 13,7 SPAD messen, während der Chlorophyllgehalt bei 3 % Saccharose und Membranverschluss 31,7 SPAD betrug (Abb. 31).

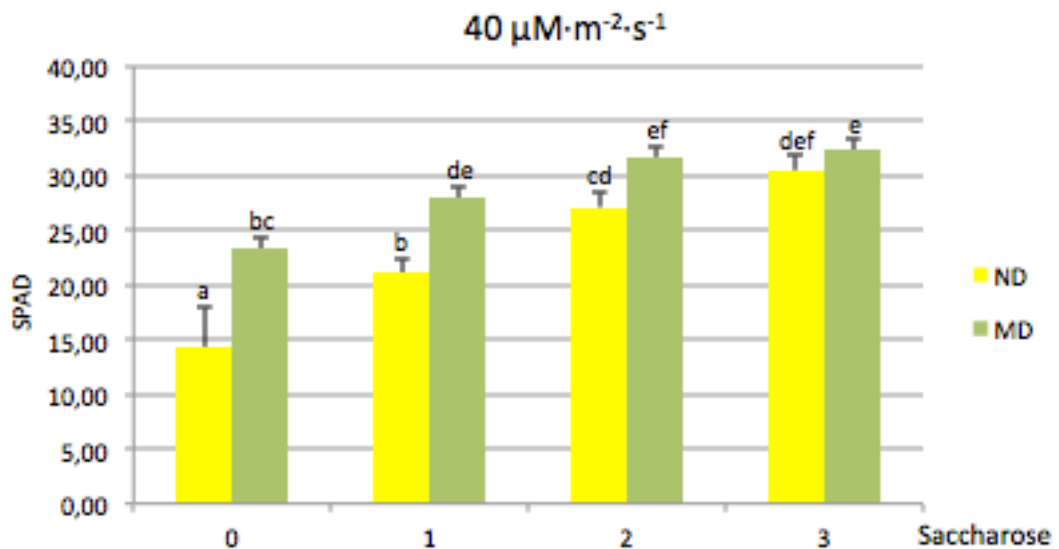


Abbildung 31: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Erhöhte man nun die Lichtintensität von 40 auf $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, so wurde der höchste Chlorophyllgehalt mit 3 % Saccharose und Membrandeckel erreicht

(Abb. 32). Diese Gruppe unterschied sich signifikant von den anderen, der mittlere Chlorophyllgehalt der Blätter betrug 34,0 SPAD.

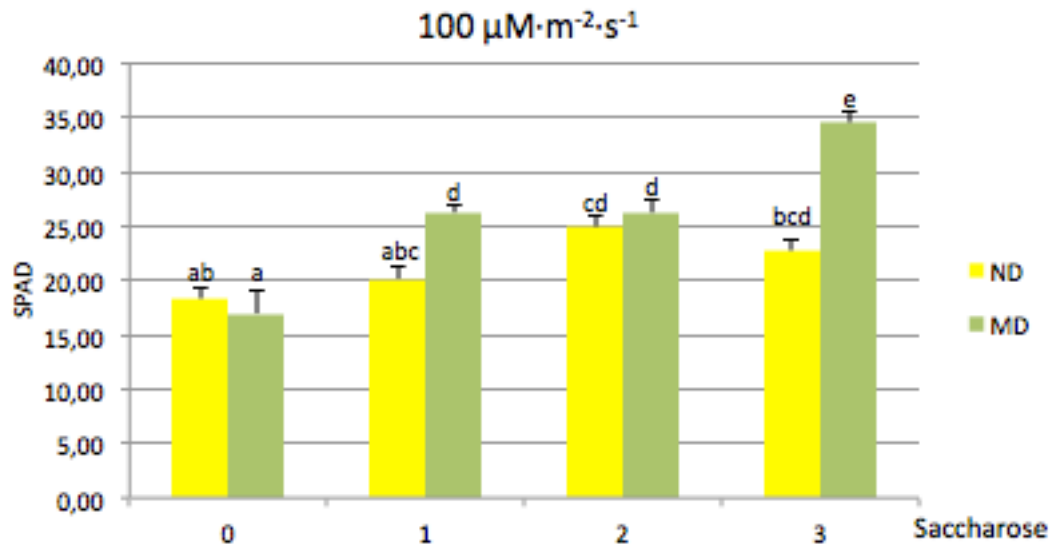


Abbildung 32: Einfluss von Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) und Saccharose-Konzentration im Nährmedium bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Kombinieren wir nun die Faktoren Lichtintensität (40 und $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und Art des Verschlusses der Kulturgefäße miteinander und lassen für eine bessere Übersichtlichkeit die Saccharose-Konzentration im Nährmedium unberücksichtigt, so ist in Abbildung 33 ersichtlich (Seite 37), dass man im Durchschnitt mehr Chlorophyll bei $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht messen konnte, wobei der Verschluss keinen Einfluss hatte. Ein vergleichbares Bild ergab sich bei $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht.

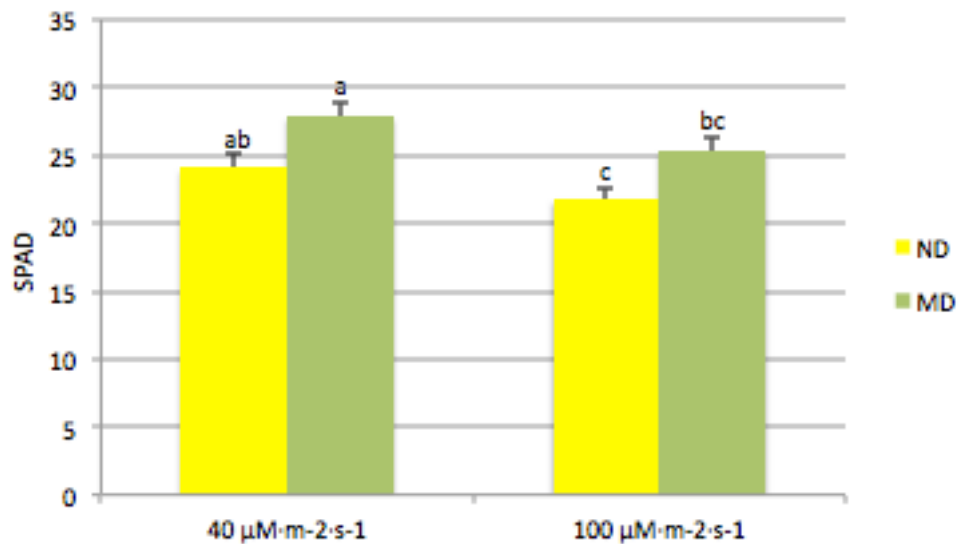


Abbildung 33: Einfluss von Lichtintensität und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

Lassen wir nun für eine vereinfachte Darstellung den Parameter Licht außer acht und konzentrieren uns auf die Ergebnisse, die wir mit verschiedenen Saccharose-Konzentrationen und zwei Arten von Verschlüssen erhielten, gab es innerhalb der Gruppen einen signifikanten Unterschied (Abb. 34, Seite 38). Den geringsten Chlorophyllgehalt wiesen die Blätter aus Kulturen ohne Saccharose und mit normalem Deckel auf: Hier betrug der SPAD-Wert 15,7. Fast linear stieg dann der Chlorophyllgehalt der Blätter mit zunehmendem Saccharose-Gehalt an, wobei es innerhalb dieser Gruppen nur teilweise einen signifikanten Unterschied gab.

Mit 32,7 SPAD konnten wir den höchsten Chlorophyllgehalt in Kulturen mit 3% Saccharose und Membrandeckel ermitteln.

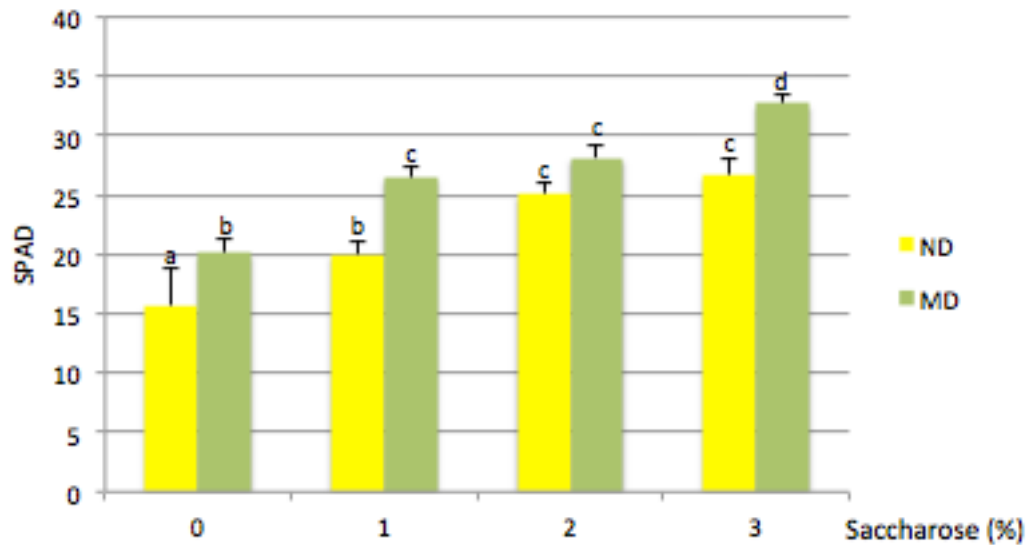


Abbildung 34: Einfluss von Saccharose-Konzentration im Nährmedium und Verschluss der Kulturgefäße (ND: normaler Deckel, MD: Membrandeckel) auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p=0,05$)

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der CO_2 -Gehalt im Gasraum auf 2 % erhöht, zusätzlich kamen unterschiedliche Saccharose-Konzentrationen zum Einsatz. Das Licht ($100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) und der Verschluss (Membrandeckel) waren bei allen Gruppen gleich. In Abbildung 35 (Seite 39) ist erkennbar, dass der CO_2 -Gehalt keinen signifikanten Einfluss auf den Chlorophyllgehalt in den Blättern hatte. Hingegen gab es einen signifikanten Unterschied bei Änderung der Saccharose-Konzentration im Nährmedium: Je höher die zugefügte Menge Saccharose, desto höher war der Chlorophyllgehalt in den Blättern.

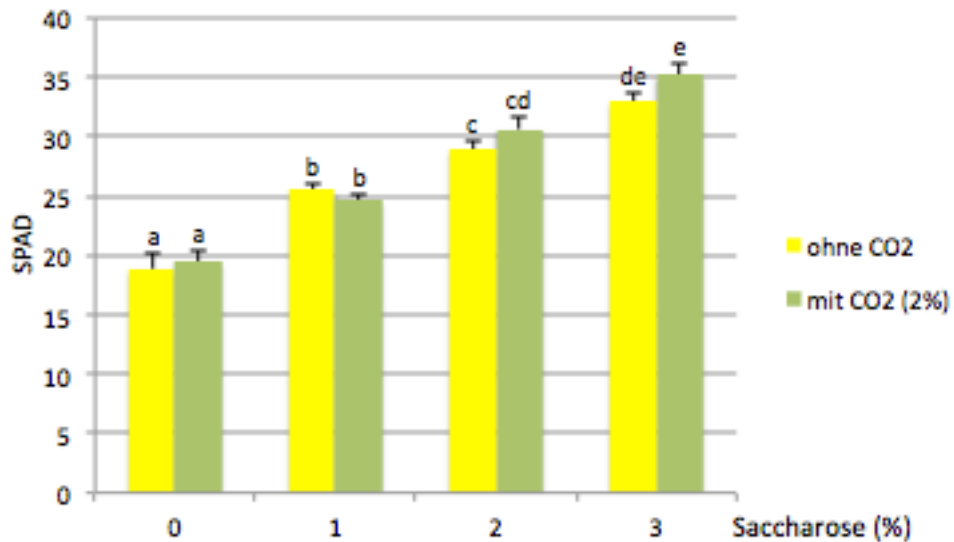


Abbildung 35: Einfluss von CO₂-Gehalt und Saccharose-Konzentration im Nährmedium auf den Chlorophyllgehalt der Blätter, Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (p=0,05)

Betrachten wir nun die Ergebnisse, die wir bezüglich des Chlorophyll-Gehalts der Blätter erhalten haben. Anhand der Diagramme ist ersichtlich, dass unter photoautotrophen Bedingungen die Pappel-Blätter einen hohen Gehalt an Chlorophyll aufwiesen. Auch die Erhöhung des CO₂-Gehalts im Gasraum zeigte einen positiven Einfluss auf den Chlorophyll-Gehalt der Blätter.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Aspekten der photoautotrophen in vitro-Vermehrung der Pappel. Dazu standen uns Kulturen der Pappel-Hybride 741 zur Verfügung, die uns vom Department für Ökogenomik und Systembiologie der Universität Wien überlassen wurden. Aufgrund ihres schnellen Wachstums nimmt der Bedarf an Pappeln stetig zu, vor allem in der Industrie, wo sie zu Holz und Papier verarbeitet wird, aber auch als wichtiger Energielieferant dient. Daher werden die Pappeln heutzutage neben der herkömmlichen vegetativen Vermehrung auch über in vitro-Kultur vermehrt, um diesen erhöhten Bedarf zu decken (Lubrano, 1992).

Die photoautotrophe Mikrovermehrung scheint eine gute Alternative zu sein, um die große Nachfrage nach Pappeln zu decken. Diese Methode bringt viele Vorteile mit sich, unter anderem eine verbesserte Morphologie und Physiologie (Afreen, 2005) sowie eine erhöhte Überlebensrate der ex vitro kultivierten Pflanzen nach der Akklimatisierung (Xiao et al., 2011). Protokolle zur photoautotrophen Mikrovermehrung konnten bereits erfolgreich für diverse Spezies etabliert werden (Kubota et al., 2005). In einer Studie von Mingozzi et al. (2008) wurden mit *Populus deltoides* Versuche zur Kultivierung unter photoautotrophen Bedingungen durchgeführt. Dabei erzielte man im Vergleich zur konventionellen in vitro-Kultur eine erhöhte Knospen- und Blattzahl, eine verbesserte Bewurzelung und längere Sprosse.

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, unter welchen Bedingungen sich die Pappel-Hybride 741 am besten photoautotroph in vitro vermehren lässt. Dabei wurden mit unterschiedliche Saccharose-Konzentrationen im Nährmedium eingesetzt (0, 1, 2 und 3 %), es wurden zwei unterschiedliche Lichtintensitäten verwendet (40 und 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), zwei Arten von Verschlüssen der Kulturgefäße (normaler Deckel und Membrandeckel) sowie der CO_2 -Gehalt im Gasraum auf 2% erhöht. Die Auswirkungen dieser Faktoren wurden bei anderen vergleichbaren Versuchen ebenfalls untersucht (Cournac et al., 1991). Nach Variation dieser vier Faktoren wurden verschiedene Parameter untersucht und ausgewertet. Diese Parameter,

welche zur Auswertung ähnlicher Versuche herangezogen wurden, waren das Frischgewicht der regenerierten Sprosse, die Sprosslänge, die Nodien- und Blattzahl und letztendlich der durchschnittliche Chlorophyllgehalt der Blätter (Teixeira da Silva et al.; Mingozi et al., 2008; Xiao et al., 2011).

Als Nährmedium wurde das halbkonzentrierte Medium nach Linsmaier und Skoog (1965) verwendet. Nach Hanak (2014) ist dieses Medium für die Pappel am besten geeignet. Als Gelbildner kam Gelrite® zum Einsatz (Kang et al., 2009).

Ein erster Faktor, der in dieser Arbeit untersucht wurde, war die Lichtintensität bei der Kultivierung. Dabei wurde eine Lichtstärke von $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ verwendet, welche üblicherweise in der pflanzlichen in vitro-Kultur eingesetzt wird, sowie eine erhöhte Intensität von $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ähnliche Lichtstärken (50 und $100 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) wurden zum Beispiel bei *Limonia latifolia* eingesetzt, um die in vitro Vermehrung auf einem Saccharosefreien Medium zu untersuchen (Xiao und Kozai, 2006a).

Als weiteren Faktor wurden dem Nährmedium unterschiedliche Saccharose-Konzentrationen zwischen 0 und 3 % zugefügt. Auch Mingozi et al. (2008) arbeiteten in ihren Versuch mit *Populus deltoides* mit ähnlichen Saccharose-Konzentrationen.

Als dritten Faktor untersuchten wir den Einfluss von zwei Arten von Kulturverschlüssen. Dabei handelte es sich um Magenta® B-Caps, die Hälfte davon wies eine Bohrung (Durchmesser: 8 mm) auf, die durch eine Membran verschlossen wurde, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Das Ziel war es, zu untersuchen, ob eine bessere Belüftung, d.h. eine Erleichterung des CO_2 -Austausches zwischen Innen- und Außenraum, eine Verbesserung des Wachstums der Pappel zur Folge hatte.

Als letzter Faktor wurde der CO_2 -Gehalt im Gasraum der Kulturen auf 2% erhöht, auch Cournac et al. (1991) führten ihre Untersuchungen mit dieser CO_2 -Konzentration durch. Mit Hilfe eines Puffers, welcher nach Warburg (1962) konzipiert wurde, stellten wir in einem geschlossenen Raum (unter einem umfunktionierten Aquarium), in den sich die Pappel-Kulturen befanden, den CO_2 -Gehalt von 2 % ein. Bei diesem Versuch kamen nur die oben beschriebenen Membrandeckel zum Einsatz, um durch den

verbesserten Gasaustausch den erhöhten CO₂ -Partialdruck im Gasraum der Kultur zu erzielen. In einem Versuch mit *Chlorophytum borivillianum* Sant. von Joshi et al. (2009) zeigten Kulturen unter erhöhtem CO₂-Partialdruck ein verbessertes Wachstum und die Ausbildung einer grösseren Zahl an Nodien.

Ein Untersuchungsparameter der oben genannten Kulturbedingungen war der Einfluss auf das Frischgewicht. Bei unterschiedlichen Kombinationen der Faktoren konnte festgestellt werden, dass sich einzig das Frischgewicht der Kulturen auf Saccharosefreiem Nährmedium mit normalem Verschluss signifikant von den anderen Kulturen unterschied. Dieses Medium führte sowohl bei 40 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ als auch bei 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht zum niedrigsten Frischgewicht der regenerierten Sprosse. Lässt man den Faktor Saccharose außer Betracht, so führten 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht und Membrandeckel zum höchsten Frischgewicht. Offensichtlich spielten die Lichtintensität als auch der verbesserte Gasaustausch eine wichtige Rolle beim Wachstum der Pflanze.

Interessant war das Ergebnis mit erhöhtem CO₂-Gehalt im Gasraum. Das höchste Frischgewicht wurde mit Saccharosefreiem Medium und das niedrigste Frischgewicht bei Einsatz von 3 % Saccharose erreicht. So schien mit zunehmendem Saccharose-Gehalt das Frischgewicht der Pflanze abzunehmen.

Kozai und Kubota (2001) zeigten anhand von *Pinus radiata*, dass durch photoautotrophe Kultivierung ein höheres Frischgewicht der Sprosse erreicht wird. Verglichen wurden diese Kulturen mit solchen, die konventionell gehalten wurden, die Lichtintensität betrug 160 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Auch bei *Rubus idaeus* konnte auf Saccharosefreiem Medium ein wesentlich geringeres Frischgewicht beobachtet werden als bei Zusatz des Zuckers zum Nährmedium (Kozai und Kubota, 2001).

Erhöhten wir den CO₂-Gehalt im Gasraum auf 2% so nahm das Frischgewicht mit zunehmender Saccharose-Konzentration ab. Zu einem ähnlichem Ergebnis kam man bei *Azadirachta indica*: Das Frischgewicht der Pflanzen war ohne Saccharose im Nährmedium bei einem PPF von 100 und einer CO₂-Konzentration von 0,45% signifikant höher als bei Zusatz von Saccharose zum Nährmedium (Kozai und Kubota, 2001).

Auch Cournac et al. (1991) beobachteten bei *Solanum tuberosum* ein ähnliches Phänomen, welches sie auf eine Anreicherung von Ethylen im Gefäß zurückführten.

Ein weiterer Parameter, der in dieser Arbeit zur Auswertung herangezogen wurde, war die Sprosslänge. Signifikante Unterschiede gab es, wie zuvor beim Frischgewicht, bei den Kulturen mit normalem Deckel und ohne Saccharose im Nährmedium. Die Lichtintensität schien keinen Einfluss auf die Sprosslänge zu haben, auch die Wahl des Verschlusses schien bei Zusatz von Saccharose nicht relevant. Einzig beim Saccharosefreien Nährmedium zeigte sich eine deutliche höhere Sprosslänge bei Einsatz des Membrandeckel als bei Kulturen mit normalem Deckel. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Xiao und Kozai (2004) bei *Zantedeschia elliottiana*: So gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Pflanzen, die photoautotroph kultiviert wurden, und solchen unter photomixotrophen Bedingungen.

Hingegen schien die Erhöhung des CO₂ Gehalts im Gasraum in Kombination mit einer höheren Saccharose-Konzentration einen negativen Einfluss auf die Länge des Sprosses zu haben, wie zuvor auch beim Frischgewicht zu beobachten war. In der Literatur kam man zu gegenteiligen Ergebnissen: Joshi et al. (2009) führten ebenfalls Versuche mit unterschiedlichen CO₂- und Saccharose-Konzentrationen durch. Bei *Chlorophytum borivillianum* zeigte sich, dass die Sprosse besser mit erhöhtem CO₂-Gehalt im Gasraum und Saccharose im Nährmedium wachsen als unter normalen Bedingungen (ohne erhöhtem CO₂-Gehalt).

Ein weiterer Aspekt dieser Diplomarbeit betraf den Einfluss der Kulturbedingungen auf die Nodienanzahl pro Spross. Wie auch beim Frischgewicht und der Sprosslänge unterschied sich die Nodienzahl nur auf Nährmedium ohne Saccharose und Kultivierung mit normalem Verschluss signifikant von allen anderen Ergebnissen, es wurden nur etwa halb so viele Nodien gebildet als bei Verwendung eines Membrandeckels bzw. bei Zusatz von Saccharose zum Nährmedium.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Xiao und Kozai (2006a) bei *Limonium latifolium*. Zwar kam es zu einer niedrigeren Vermehrungsrate bei jenen Pflanzen, die ohne Saccharose kultiviert wurden, allerdings war kein

signifikanter Unterschied zu den anderen untersuchten Parametern und zur Kontrollgruppe, die 3 % Saccharose im Nährmedium enthielt. Auch Cournac et al. (1991) berichteten bei *Solanum tuberosum* von ähnlichen Ergebnissen.

Neben der Nodienanzahl wurde auch die Blattzahl der Sprosse als Parameter herangezogen, um den Einfluss der Kulturbedingungen beurteilen zu können. Kombinieren wir verschiedene Parameter wie z.B. den Saccharose-Gehalt im Nährmedium und die Lichtintensität, oder die zwei Arten der Verschlüsse, so konnte kein signifikanter Unterschied innerhalb der Kulturbedingungen gefunden werden. Einzig die Pappelkulturen auf Saccharosefreiem Nährmedium und mit normalem Verschluss wiesen eine geringere Blattzahl auf. In der Literatur findet man ähnliche Ergebnisse, so auch bei Xiao et al. (2011). Sie kultivierten *Yucca filamentosa* unter photoautotrophen und photomixotrophen Bedingungen und kamen zum Ergebnis, dass es zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied gab. Einzig die Pflanzen, welche ohne Saccharose kultiviert und nur geringer Lichtintensität ausgesetzt wurden, zeigten eine niedrigere Blattzahl.

Auch beim Versuch zur Erhöhung des CO₂-Gehaltes im Gasraum kam es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen. Weder ein erhöhter CO₂-Partialdruck noch der Zusatz von Saccharose zum Nährmedium zeigten einen Einfluss auf die Blattzahl pro Spross. Dies ist auch bei Cournac et al. (1991) beschrieben: Die verschiedenen Belüftungsbedingungen, welche einen unterschiedlichen CO₂-Gehalt im Gasraum der Kulturen bewirkten, schienen keinen großen Einfluss auf die Blattzahl bei *Solanum tuberosum* zu haben.

Ein weiterer Parameter, der zur Auswertung herangezogen wurde, war die durchschnittliche Blattfläche pro Spross. Es zeigte sich, dass die Blattfläche bei 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Licht und Einsatz eines Membrandeckels am grössten war. Jedoch unterschieden sich die Ergebnisse nicht signifikant voneinander. Lässt man nun den Faktor Licht außer Betracht und sieht sich die Resultate für unterschiedliche Saccharose-Konzentrationen und Verschlüsse an, so erhält man für 3 % Saccharose im Nährmedium und Verwendung eines Membrandeckels die größte Blattfläche. So bewirkten also eine verbesserte

Belüftung und ein erhöhter Saccharose-Gehalt im Nährmedium eine größere Blattfläche. Wie auch bei den zuvor besprochenen Parametern wurde bei Einsatz des Saccharosefreiem Medium mit normalem Deckel die geringste Blattfläche erhalten.

Auch anhand von Eukalyptus konnte gezeigt werden, wie wichtig eine gute Belüftung sich auf das Wachstum der Pflanze auswirkt: So war die Blattfläche dieser Pflanzen unter photoautotrophen Bedingungen um den Faktor 2,5 höher als unter normalen Bedingungen (Zobayed et al. , 2001).

In einem weiteren Versuch untersuchten wir den Einfluss des CO₂-Gehalts im Gasraum auf das Wachstum der Pappel. Es zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der CO₂-Gruppe und der Kontroll-Gruppe ohne erhöhtem CO₂-Gehalt gab. Auch die Zugabe von Zucker zum Nährmedium zeigte keine signifikanten Auswirkungen. Einzig die Gruppe ohne Saccharose erreichte eine geringere Blattfläche als jene mit Saccharose im Nährmedium, aber auch hier gab es keine Signifikanz.

Mingozzi et al. (2008) zeigten anhand von *Populus deltoides*, dass die Pflanzen breitere und größere Blätter ausbildeten, wenn diese unter photoautotrophen Bedingungen wuchsen als bei photomixotropher Kultur. Zu einem anderem Ergebnis kamen Solarova et al. (1989). Sie führten ebenfalls Versuche mit Tabakpflanzen bei unterschiedlichen CO₂-und Saccharose-Konzentrationen durch. Die Autoren konnten keine signifikante Auswirkung auf die Blattfläche feststellen.

Ein letzter Aspekt dieser Diplomarbeit war der Einfluss der Kulturbedingungen auf den Chlorophyllgehalt der Blätter. Gemessen wurden die Blätter mit dem Chlorophyllmeter SPAD-502 der Firma Konika-Minolta, Japan. Dieses Gerät wurde auch schon zur Messung anderer vergleichbarer Versuche herangezogen (Cui et al., 2005; Tanaka et al., 2005; Teixeira da Silva et al., 2006). Vor allem die Belüftung des Gefäßes schien einen großen Einfluss auf den Chlorophyllgehalt der Blätter zu haben. Bei beiden Lichtintensitäten (40 und 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ergab sich mit Membrandeckel ein höherer SPAD-Wert als mit normalem Deckel. Auch die Saccharose-Konzentration spielte hier eine wichtige Rolle: Je höher die Saccharose-Konzentration im Nährmedium war, desto höher war auch die Chlorophyllmenge der Blätter.

Weniger Einfluss zeigte hingegen der erhöhte CO₂-Gehalt im Gasraum. Einzig die verbesserte Belüftung mit Membrandeckel und ein hoher Saccharose-Gehalt führten zu einem hohen Chlorophyllgehalt in den Blättern. Zwischen der Gruppe, in welcher der CO₂-Gehalt im Gasraum auf 2% erhöht wurde, und der Kontrollgruppe gab es bei gleicher Saccharose-Konzentration keinen signifikanten Unterschied. Zu einem ähnlichem Ergebnis kamen Zobayed et al. (2000) bei *Eucalyptus camaldulensis*: Der Chlorophyllgehalt stieg durch die verbesserte Belüftung an. Auch Kubota und Kozai (1992) beobachteten diese Resultate bei der Kartoffel. Xiao et al. (2011) gaben jedoch an, dass der Chlorophyllgehalt der Blätter mit zunehmender Saccharose-Konzentration abnahm.

Ein weiterer Ansatzpunkt für fortführende Versuche wäre, den CO₂-Gehalt im Gasraum noch weiter zu erhöhen, in anderen Studien wurde er z.B. auf 5 % erhöht (Joshi et al., 2009; Solarova et al., 1989). Desweiteren wäre es sinnvoll, größere bzw. offene Kulturgefäße zu verwenden, um einen Anstieg des Ethylensgehalts im Gasraum und somit eine Übersättigung der Pflanze mit Ethylen zu vermeiden. Hier könnten sogenannte „scaled-up vessels“, wie sie von Zobayed et al. (1999) vorgestellt wurden, zum Einsatz kommen. Weiters sollte auch die Wurzelbildung, die durch photoautotrophe Kultivierung begünstigt wird, sowie eine eventuelle Kallusbildung, welche reduziert werden sollte, bewertet werden (Kubota, 2001).

Zusätzlich wäre es von Interesse, die Pappeln nach der photoautotrophen Vermehrung zu akklimatisieren und ex vivo weiter zu kultivieren, da die Überlebensrate der Pflanzen ex vivo deutlich höher sein sollte als bei Vermehrung unter photomixotrophen Bedingungen (Kubota, 2011). Weiter wird in der Literatur neben Agar und Gelrite® als Gelbildner auch der Einsatz von Vermiculit und Florialite® beschrieben. Diese haben generell einen positiven Einfluss auf die Entwicklung und das Wachstum von in vitro-Kulturen (Kozai und Kubota, 2005; Xiao und Kozai, 2006a). Schlussendlich sollten auch Versuche mit höherer Lichtintensität durchgeführt werden, so zeigte sich zum Beispiel bei 150 µM·m⁻²·s⁻¹ Licht ein verbessertes Wachstum von *Ipomoea batatas* (Heo et al., 1999).

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich mit der in vitro-Kultivierung der Pappel. Diese schnell wachsenden Bäume werden vor allem in der Holz- und Papierindustrie verwendet, sind aber auch wichtige Bioenergieerträger, weshalb die Anfrage nach diesen stetig steigt.

Hauptanliegen dieser Arbeit war die Findung optimaler Bedingungen zur photoautotrophen in-vitro Vermehrung der Pappel-Hybride 741. Dabei wurde der Einfluss der Saccharose-Konzentration im Nährmedium (0, 1, 2 oder 3 %), der Lichtintensität (40 oder 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), der Art des Kulturverschlusses (normaler Deckel, Membrandeckel) und die Erhöhung des CO_2 -Gehalts im Gasraum auf die Entwicklung der Kulturen analysiert. Es wurden das Frischgewicht, die Sprosslänge, die Anzahl an gebildeten Nodien und Blätter, die Blattfläche sowie der Chlorophyllgehalt der Blätter ausgewertet.

Unter verbesserter Belüftung (Verwendung eines Membrandeckels) stiegen alle gemessenen Parameter in ihrem Wert an. Eine Erhöhung der Lichtintensität bei der Kultivierung führte zu erhöhtem Frischgewicht und grösserer Blattfläche. Der Einfluss der Saccharose-Konzentration auf das Wachstum der Pflanze war bei normalem atmosphärischem CO_2 -Partialdruck weniger ausgeprägt. Bei Erhöhung des CO_2 -Gehalts im Gasraum auf 2 % zeigte sich ein Einfluss der Saccharose-Konzentration im Nährmedium auf das Wachstum: Frischgewicht und Sprosslänge sanken mit zunehmender Saccharose-Konzentration, Nodien- und Blätteranzahl fielen hingegen gleich aus. Dafür stiegen die Blattfläche und der Chlorophyllgehalt der Blätter mit zunehmender Saccharose an.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei Variation der Kulturparameter Licht, Saccharose-Konzentration im Nährmedium, Verschluss des Kulturgefäßes und CO_2 -Gehalt im Gasraum die Verwendung von Membrandeckeln (um eine bessere Belüftung des Kulturgefäßes zu gewährleisten) essentiell für eine Verbesserung des Wachstums von in vitro Kulturen der Pappel-Hybride 741 waren. In weiterführenden Versuchen

sollten eine weitere Erhöhung des CO₂-Partialdrucks sowie eine noch bessere Belüftung der Kulturgefäße evaluiert werden.

6. Summary

This study deals with the establishment and evaluation of in vitro cultures of the poplar hybrid 741. Poplars are used primarily in the pulp and paper industry but are also important in the bio-energy industry. This is the reason for the steadily rising demand for these trees.

The main objective of this work is to determine the optimal conditions for photoautotrophic in vitro propagation of poplar hybrid 741. The influence of sucrose concentration in the culture medium (0, 1, 2, 3 % sucrose), the light intensity (40 or 100 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), the type of vessel closure (normal cap, membrane cap) and increased CO_2 -content of the culture gas space (2%) were analyzed with respect to the development of the cultures. The fresh weight, shoot length, the number of formed nodes and leaves, leaf area, and the chlorophyll content of the leaves were used as parameters for the analysis.

Improved ventilation (using a membrane cap) increased all measured parameters. An elevation in light intensity resulted in increased fresh weight and leaf area. The influence of the sucrose concentration, however, was less pronounced.

With elevated CO_2 -partial pressure the sucrose concentration has an impact on poplar growth. While fresh weight and shoot length decreased with increasing sucrose concentration, while the number of nodes and leaves was not influenced. However, leaf area and chlorophyll content of the leaves increased, too.

In summary, it was shown that of the culture parameters which were varied (light, sucrose concentration in the nutrient medium, vessel closure and the CO_2 concentration in the gaseous phase) the use of membrane caps (to ensure a better ventilation of the culture vessels) was decisive for improved growth of in vitro cultures of poplar hybrid 741. It is recommended that continuative experiments with a further elevated CO_2 -partial pressure as well as an improved vessel ventilation be conducted.

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 and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 61-90

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

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

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

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

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

Hanak A.M. (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

Heo J., Wilson S.B., Kozai T. (2001), A Forced Ventilation Micropropagation System for Photoautotrophic Production of Sweet Potato Plug Plantlets in a Scaled-up Culture Vessel: I. Growth and Uniformity, *HortTechnology* **11**: 90-94

Hüsemann W. (1984), Photoautotrophic cell cultures, in Vasil I.K. (Hrsg.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, Band 1, Academic Press Inc., Orlando, S.182-191

Jalgaonwala R.E., Mohite B.V., Mahajan R.T. (2011), A review: Natural products from plant associated endophytic fungi, *J. Microbiol. Biotech. Res.* **1**: 21-32

Joshi N., Dave A., Vyas S., Purohit S D., (2009), Growth and shoot proliferation in *Chlorophytum borivillianum* Sant. et Fernand. in vitro under different carbon dioxide environment, *Indian J. Biotechnol.* **8**: 323-327

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

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

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

Kozai T., Kubota C. (2001), *Developing a Photoautotrophic Micropropagation*

System for Woody Plants, J. Plant Res. **114**: 525-537

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

Kozai T., Kubota C. (2005b), In vitro aerial environments and their effects on growth and development of plants, in Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (Hrsg.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation and Transplant Production System, Springer, Dordrecht, S. 31-52

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

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

Kubota C. (2002), Photoautotrophic micropropagation: importance of controlled environment in plant tissue culture, Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. **52**: 609-613

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

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

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

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

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

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

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

Solarova J., Pospisilova J., Catsky J., Santrucek J. (1989), Photosynthesis and growth of Tobacco plantlets in dependence on carbon supply, *Photosynthetica* **23**: 629-637

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

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

Ticha I. (1996), Optimization of photoautotrophic tobacco in vitro culture: effect of suncaps closures on plantlet growth, *Photosynthetica* **32**: 475-479

Uddling J., Gelang-Alfredsson J., Piikki K., Pleijel H. (2007), Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502

chlorophyll meter readings, Photosynth. Res. **91**: 37-46

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

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

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

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, angewandt auf Krebs, Photosynthese und Wirkungsweise der Röntgenstrahlen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 578-581

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lebenslauf

Name: Nathalie Gindler

Geburtsdatum: 11 Oktober 1988

Bildungsweg:

1994-2006: Schule Lycée Francais de Vienne (1090 Wien)

2006: Französisches Baccalauréat und Matura

Seit Oktober 2006: Studium der Pharmazie, Universität Wien

Oktober 2013 bis März 2014: Praktische Arbeit an der Diplomarbeit