



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Untersuchungen zur Optimierung der
in vitro-Vermehrung von *Drosera rotundifolia*
in Temporärimmersions-System

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag. pharm.)

Verfasser:	EINFALT Hannes
Matrikel-Nummer:	9700731
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuerin:	Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp

Wien, am 10. August 2008

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau **Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp** für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten, sowie die freundliche Betreuung.

Des Weiteren möchte ich an dieser Stelle Herrn **Ass. Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch** für seine Unterstützung bei der praktischen Durchführung und seinen Rat beim Schreiben dieser Diplomarbeit danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau **Ing. Brigitte Grauwald** bedanken, deren herzlichen Beistand und Unterstützung in der Arbeitsgruppe beim Bewältigen mancher Schwierigkeiten im Labor überaus hilfreich waren.

Von ganzem Herzen möchte ich mich hier auch bei **meinen Eltern** bedanken, ohne deren Unterstützung es mir nicht möglich gewesen wäre, dieses Studium zu absolvieren.

Nicht zu vergessen sind natürlich der große Rest der Familie sowie meine Freunde und Kollegen, die immer für mich da waren und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Abkürzungen

FG	Frischgewicht
TG	Trockengewicht
TI-System	Temporärimmersions-System
Min.	Minuten
tägl.	täglich

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Pflanzenmaterial	4
2.2. Nährmedien	4
2.3. Kulturbedingungen	5
2.4. Versuchsauswertung	5
3. Ergebnisse	8
3.1. Einfluss der Immersionsbedingungen auf Sprossvermehrung und –größe	8
3.1.1. Kulturgefäße mit einem Volumen von 750 ml	9
3.1.2. Kulturgefäße mit einem Volumen von 1500 ml	15
3.1.3. Kulturgefäße mit einem Volumen von 2000 ml	21
3.2. Einfluss der Gefäßgröße auf Sprossvermehrung und –größe	28
3.2.1. Immersionsdauer von 60 Minuten	29
3.2.1.1. 7 Immersionen täglich für 60 Minuten	31
3.2.1.2. 5 Immersionen täglich für 60 Minuten	32
3.2.1.3. 3 Immersionen täglich für 60 Minuten	33
3.2.2. Immersionsdauer von 120 Minuten	34
3.2.2.1. 7 Immersionen täglich für 120 Minuten	36
3.2.2.2. 5 Immersionen täglich für 120 Minuten	37
3.2.2.3. 3 Immersionen täglich für 120 Minuten.	39
3.3. Einfluss der Immersionsbedingungen auf Frisch- und Trockengewicht	40
3.3.1. Kulturgefäße mit einem Volumen von 750 ml	41
3.3.2. Kulturgefäße mit einem Volumen von 1500 ml	42
3.3.3. Kulturgefäße mit einem Volumen von 2000 ml	44
3.4. Einfluss der Gefäßgröße auf Frisch- und Trockengewicht bei unterschiedlichen Immersionsbedingungen	45
4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung	64
6. Literaturverzeichnis	65
Lebenslauf	69

1. Einleitung und Problemstellung

Der rundblättrige Sonnentau, *Drosera rotundifolia* L., ist eine der drei in Österreich heimischen Sonnentau-Arten, die ausschließlich in kalkarmen Hochmoor-Gebieten vorkommen.

Drosera rotundifolia ist aufgrund des Inhaltsstoffmusters, welches sich durch einen hohen Gehalt an Flavonoiden und Naphthochinonen auszeichnet, in der Schulmedizin in Verwendung (Czygan und Hiller, 2002).

Ursprünglich war im Österreichischen Arzneibuch nur *Drosera rotundifolia* als Stammpflanze für *Droserae herba* zugelassen. Später, als die Bestände aufgrund der fortschreitenden Zerstörung des Lebensraums und der Wildbestände für pharmazeutische Zwecke immer mehr zurück gingen, wick der Handel auf die ebenfalls einheimischen Arten *D. intermedia* Hayne und *D. anglica* Huds. sowie die asiatische Art *D. peltata* Sm. und schließlich die afrikanische Art *D. ramentacea* Burch. ex DC aus. All diesen Ersatzdrogen ist allerdings gemein, dass das Spektrum ihrer Inhaltsstoffe von jenem von *D. rotundifolia* L. abweicht. Analysen zeigen, dass Anzahl und Zusammensetzung der für die spasmolytische Wirkung verantwortlichen Flavonoide und der antibakteriell und immunmodulatorisch wirksamen Naphthochinone in diesen Ersatzdrogen variieren (Krenn und Kartnig, 2005). Darüber hinaus sollte nicht vergessen werden, dass auch diese Ressourcen nicht unbegrenzt zur Verfügung stehen (Lange, 1998).

Heute ist *Droserae herba* nicht mehr officinell, dennoch besteht nach wie vor Bedarf an dieser Droge. Zum Einen werden Sonnentau und daraus hergestellte Präparate immer noch in der Schulmedizin eingesetzt, zum Anderen kommt *Drosera rotundifolia* in der Homöopathie zur Anwendung, wobei die Urtinktur aus dem frischen Kraut hergestellt wird (Homöopathisches Arzneibuch 2006).

Eine herkömmliche Kultivierung von Sonnentau stellt aufgrund seiner spezifischen Bedürfnisse als karnivore Pflanze eine besondere Herausforderung dar. Die pflanzliche Biotechnologie ist eine mögliche Alternative zur Produktion einer ausreichenden Menge an Pflanzenmaterial. Am Department für Pharmakognosie der Universität Wien konnte im Laufe mehrerer Diplomarbeiten (Ringl, 1998; Tammaa, 1999; Ruzsits, 1999; Vackar, 2000) ein geeignetes Protokoll zur In vitro-Kultur von

Drosera rotundifolia erarbeitet werden. Vackar (2000) konnte darüber hinaus zeigen, dass die dabei gewonnenen Sprosse nach einer Akklimatisierungsphase auch im Freiland normal weiter wuchsen. Die in vitro-Kultur von *D. rotundifolia* stellt somit nicht nur eine Möglichkeit dar, größere Mengen genetisch einheitlichen Materials herzustellen, sondern auch um Setzlinge für eine Freilandkultur zu erzeugen.

Da im Homöopathischen Arzneibuch (2006) keine Anforderungen an die Inhaltsstoffe des zur Herstellung der Urtinktur verwendeten Frischmaterials gestellt werden, könnte das aus der in vitro-Kultur gewonnene Material ohne weitere Überprüfung zur Verwendung kommen.

Für die klassische Drogengewinnung direkt aus der in vitro-Kultur scheint diese Methode, zumindest bei kleiner Dimensionierung der Kulturgefäße, etwas teuer. Sie stellt aber durchaus eine geeignet Möglichkeit dar, innerhalb kurzer Zeit genügend Setzlinge für eine nachfolgende Freilandkultur in Moorbeeten herzustellen.

In der pflanzlichen Gewebekultur arbeitet man meist mit halbfesten Nährböden. Diese Form der in vitro-Kultur zeichnet sich aber durch eine Reihe von Nachteilen aus. Um eine Überfüllung der Kulturgefäße zu vermeiden und das pflanzliche Gewebe mit frischem Nährmedium zu versorgen, muss in regelmäßigen Abständen auf frisches Nährmedium überführt werden. Dieser Transfer beinhaltet die manuelle Vereinzelung der Explantate unter sterilen Bedingungen durch geschultes Personal (Etienne und Berthouly, 2002). Durch den Einsatz flüssiger Nährmedien spart man nicht nur die Gelbildner ein, die einen erheblichen Teil der Materialkosten für halbfeste Nährböden ausmachen, sondern die Handhabung der in vitro-Kulturen wird darüber hinaus wesentlich vereinfacht. Die Explantate müssen nicht mehr exakt am Nährmedium platziert werden. Einen weiteren Vorteil stellt die Nährstoffaufnahme über die gesamte Oberfläche des Pflanzengewebes dar, die nicht mehr nur über jenen Teil erfolgt, der direkt mit dem Nährmedium in Kontakt steht. Durch das ständige Eintauchen des Pflanzenmaterials in das Flüssigmedium kann es bei Submerskultur aber zu Hyperhydratisierung und anderen morphologischen und metabolischen Anomalien kommen (Hussey, 1986).

Bei TI-Systemen sind Kultur- und Nährlösungsgefäße räumlich getrennt und das Pflanzenmaterial wird nur mehr periodisch mit dem Flüssigmedium in Kontakt

gebracht. Auf diese Weise nutzt man die Vorteile der flüssigen Nährmedien und minimiert gleichzeitig die Gefahr des Auftretens von Hyperhydratisierung. Durch Variation von Kulturegefäßgröße, Nährlösungsmenge, Immersionsdauer und Immersionshäufigkeit kann man das System für jede Spezies sowohl hinsichtlich der Vermehrungsrate optimieren als auch auf die morphologische Erscheinung der neu gebildeten Sprosse Einfluss nehmen.

Die bereits von Buol-Wischenau (2008) und Dorfer (2007) in ihren Diplomarbeiten untersuchten TI-System-Bedingungen zur Verbesserung der Vermehrungsrate und der Biomasseausbeute werden in der vorliegenden Arbeit um die Immersionsdauer 60 und 120 Minuten bei 3, 5 und 7 Immersionen täglich ergänzt.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial diente der Klon *Drosera rotundifolia II*, der 1994 aus Samen etabliert wurde, die dem Department für Pharmakognosie Wien vom National Research Council, Saskatoon, Kanada, zur Verfügung gestellt worden waren (Vackar, 2000).

Um von möglichst einheitlichem Material ausgehen zu können, wurden Explantate mit einer Größe von 30-50 mm Durchmesser, einem Gewicht von 50-90 mg und 8-12 Blättern gewählt. Die Pflanzen wurden zuvor über mehrere Passagen auf hormonfreiem Medium (Medium 29, siehe unten) gezogen.

2.2. Nährmedien

Wie bereits von Ringl (1998), Ruzsits (1999), Tammaa (1999) und Vackar (2000) am Institut etabliert, wurde das zweistufige Kultivierungssystem mit modifiziertem Medium nach Murashige und Skoog (1962) beibehalten. Für die verwendeten Flüssigmedien wurde die Konzentration der anorganischen Makroelemente und des Eisens halbiert, die Saccharosekonzentration auf 1% herabgesetzt und auf Agar oder andere Gelbildner vollständig verzichtet.

In der ersten Phase der Vermehrung, der zweiwöchigen Sprossinduktionsphase, wurde dem modifizierten Basismedium 2 µM Zeatin (Fa. SIGMA, Z0876) zugesetzt (im Folgenden als Medium 29Z bezeichnet).

In der zweiten Phase der Vermehrung, der vierwöchigen Sprosselongationsphase, wurde obiges Basismedium ohne Hormonzusatz (im Folgenden als Medium 29 bezeichnet) verwendet.

Bei beiden Medien wurde der pH-Wert mit NaOH und HCl auf 5,6 bis 5,8 eingestellt, anschließend erfolgte die Sterilisation im Autoklaven bei 121 °C über 20 Minuten.

2.3. Kulturbedingungen

In den Kulturräumen herrschte eine konstante Temperatur von 25 ± 1 °C bei einer 16-stündigen Langtagphase mit einer Lichtstärke von $45 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Sylvana Gro-Lux® Lampen).

Jedes TIS wurde unabhängig von der Größe des Kulturgefäßes mit 25 Primärexplantaten in 250 ml Nährlösung beimpft. Bei den zwei Kontrollgruppen wurden in 5 250 ml-Erlenmeyerkolben je 5 Primärexplantate mit 50 ml Nährlösung kultiviert. Dadurch erhielt man sowohl bei den Versuchsreihen als auch in der Kontrolle 10 ml/Primärexplantat.

Die in Submerskultur ausgeführten Kontrollen wurden, auf einem Rundschüttler mit 80 Umdrehungen/Min. gehalten.

Die Versuchsgruppen wurden in TI-Systemen vom Twin-Flask-Typ wie bei Buol-Wischenau (2008) und Dorfer (2007) beschrieben, gezogen. Dabei wurden die Immersionsdauern von 60 und 120 Minuten bei 3, 5 und 7 Immersionen täglich in allen drei Gefäßgrößen (750, 1500 und 2000 ml) mit je zwei Ansätzen (I und II) untersucht.

Das pneumatische Pumpsystem wurde auf eine Befüllungsdauer von 3 Minuten programmiert, um einen ausreichenden Austausch des Luftraumes im Kulturgefäß während des Füllvorganges mit Nährmedium gewährleisten zu können.

Wie bei der Kontrollgruppe wurde zuerst für 2 Wochen in hormonhaltigem Medium 29Z und dann für 4 Wochen in hormonfreiem Medium 29 kultiviert.

2.4. Versuchsauswertung

Die Auswertung sowohl der TIS als auch der Kontrollgruppen erfolgte nach 6 Wochen Kulturdauer. Zunächst wurde das Frischgewicht nach Abtupfen mit Zellstoff ermittelt, das Trockengewicht nach einer viertägigen Trocknung bei Raumtemperatur.

Nachdem das Aggregat von Pflanzenmaterial eines Kulturgefäßes (Abb. 1; Seite 6) auf die jeweils enthaltenen, einzelnen Primärexplantate aufgeteilt war (Abb. 2, Seite 6), wurden die neu gebildeten Sprosse gezählt und einer der Größenklassen „<5

mm“, „5-10 mm“ oder „>10 mm“ zugeordnet. Dabei wurde zwischen Sprossen unterschieden, die aus einem Blatt der Primärexplantate entstanden und jenen, die aus einer Blattachsel der Primärexplantate hervorgingen (vergl. Abb. 3, 4 und 5; Seite 7). Kleine Sprossknospen (Abb. 4; Seite 7), die ausschließlich auf Blättern entstanden, wurden zur Gruppe „<5 mm“ gezählt. Erst Sprosse ab >5 mm Größe wurden für weitere Kultivierung und Akklimatisierung ohne zusätzliche Elongationsphase als geeignet erachtet (Buol-Wischenau 2008).

Um die beiden parallel durchgeführten Ansätze pro Versuchsanordnung von einander unterscheiden zu können, wurden den Versuchen die römischen Zahlen „I“ und „II“ hintangestellt. Unter dem in Folge verwendeten Begriff der Sekundärsprosse wird die Summe der blattbürtigen, neu gebildeten Adventivsprosse und der neu gebildeten Axillärsprosse verstanden.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten hinsichtlich Mittelwerte, Standardfehler und Varianzanalyse (ANOVA; Duncan's Test) wurden mit dem Programm STATISTICA 6.1 durchgeführt.



Abb. 1 (links) und Abb. 2 (rechts): Aggregat von 5 Primärexplantaten inklusive neu gebildeter Sprosse am Ende der Kulturperiode (links); Einzelnes Primärexplantat inklusive neu gebildeter Sprosse am Ende der Kulturperiode (rechts)

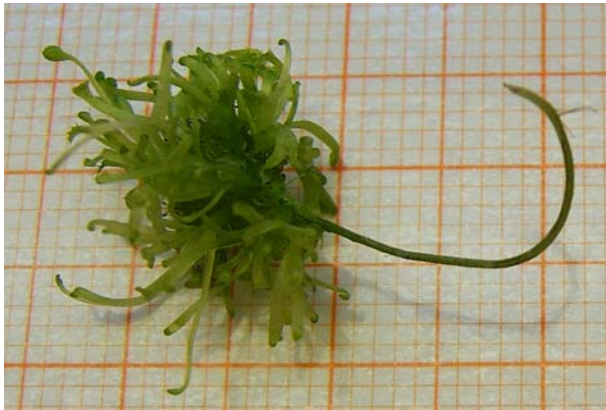


Abb. 3 (links) und Abb. 4 (rechts): Einzelnes Blatt eines Primärsprosses mit neu gebildeten Adventivsprossen (links); Einzelnes Blatt eines Primärsprosses mit neu gebildeten Sprossknospen und Sprossen (rechts).

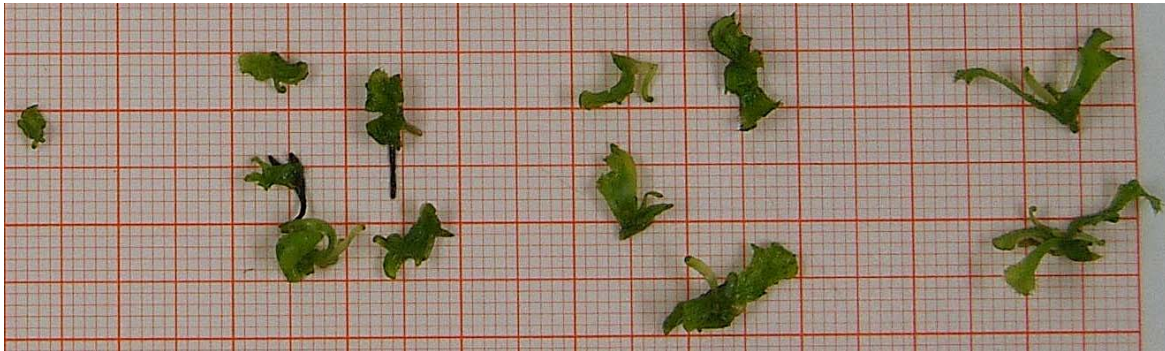


Abb. 5: Sprossbürtige, neu gebildete Sprosse eines Primärexplantates

3. Ergebnisse

Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche aus verschiedenen Betrachtungsweisen erörtert.

3.1. Einfluss der Immersionsbedingungen auf Sprossvermehrung und –größe

Betrachtet man vorerst die Sprossvermehrung in den einzelnen Gefäßgrößen, ohne dabei die unterschiedlichen Immersionsbedingungen zu berücksichtigen (Diagramm 1), kann man erkennen, dass bezüglich der Gesamtsprosszahl lediglich in den 2000 ml fassenden Kulturgefäßen eine erhöhte Ausbeute erzielt wurde. Obwohl der Anteil an Sprossen >5 mm mit der Gefäßgröße stetig stieg, so war dieser Anstieg nur für Gefäße mit 2000 ml Volumen von signifikanter Bedeutung: Hier waren 45,3% der Sprosse größer als 5 mm.

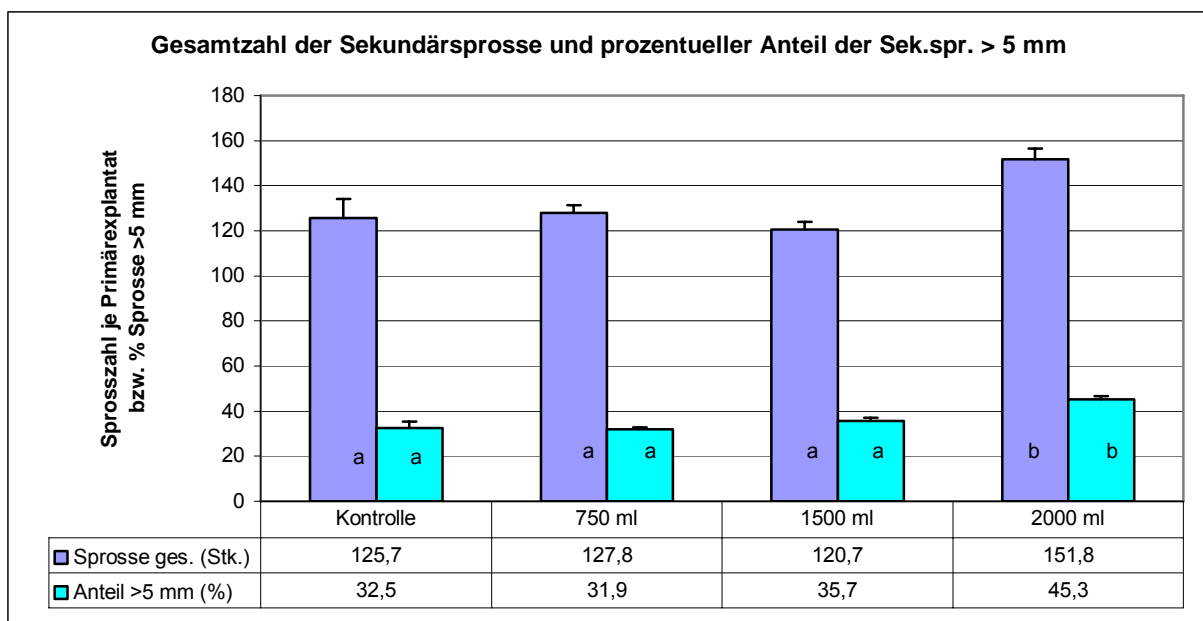


Diagramm 1: Sekundärsprosse je Primärexplantat sowie prozentueller Anteil der Sprosse >5 mm in allen Gefäßgrößen ohne Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

Dabei zeigte sich, wie in Diagramm 2 (Seite 9) zu erkennen ist, der Anteil der Sprosse mit 5 - 10 mm als hauptverantwortlich für diesen Anstieg.

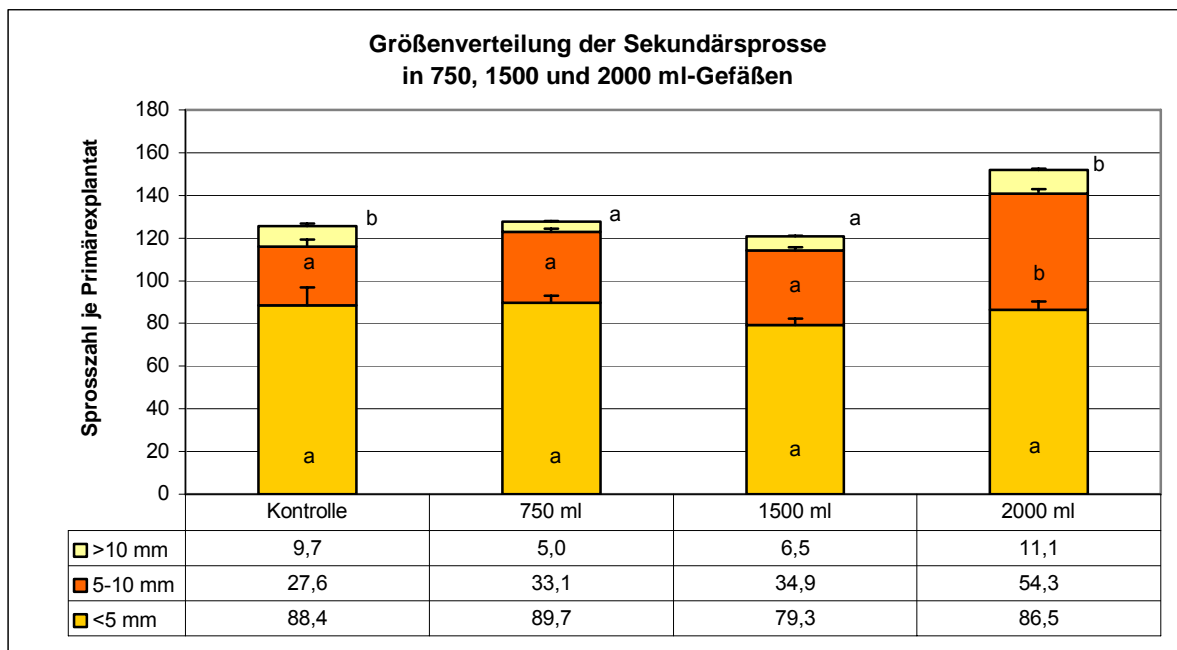


Diagramm 2: Größenverteilung der Sekundärsprosse je Primärexplantat in allen Gefäßgrößen ohne Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

Da sich trotz identer Bedingungen während der Kultivierung manche Ergebnisse hinsichtlich der Sprossgrößenverteilung in den Ansätzen I und II signifikant unterscheiden, werden in den folgenden Kapiteln die Ansätze auch einzeln betrachtet.

3.1.1. Kulturgefäße mit einem Volumen von 750 ml

Hinsichtlich der Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchsreihe mit 60 Minuten Immersionszeit (Diagramm 3, Seite 10, linke Diagrammseite) und jener mit 120 Minuten (Diagramm 3, Seite 10, rechte Diagrammseite). Lediglich bei 7 Immersionen täglich und 60 Minuten Immersionszeit waren signifikant mehr Sprosse gebildet worden als bei 5x 60 Min., 3x 60 Min. und 7x 120 Min. Immersionen täglich.

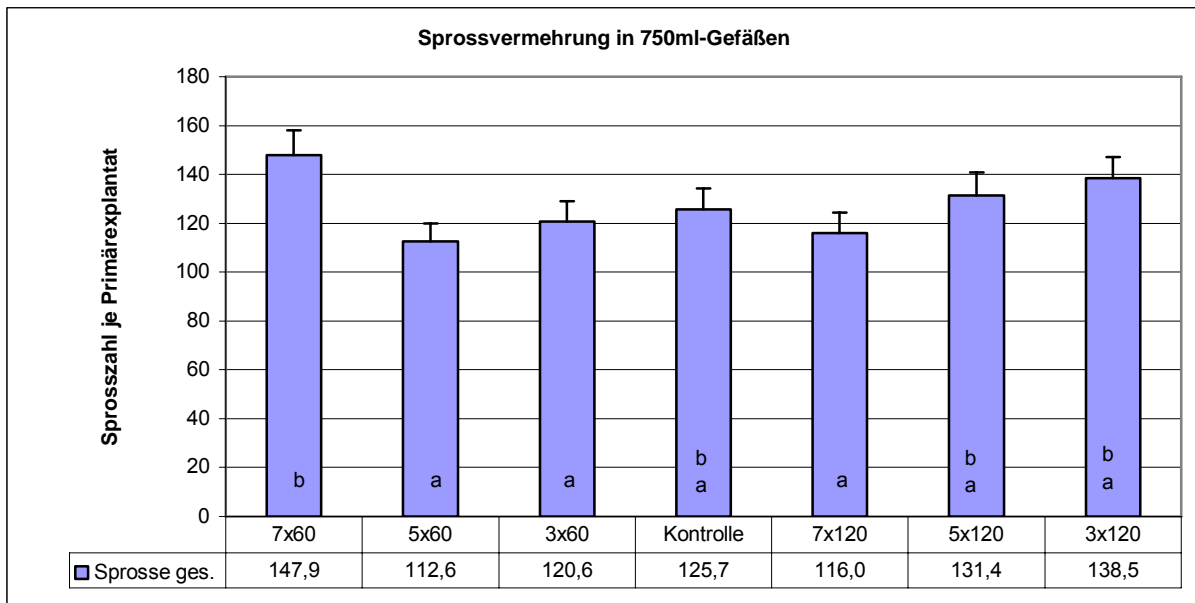


Diagramm 3: Sekundärsprosse je Primärexplantat in 750ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der untersuchten Immersionsbedingungen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

Wie in Diagramm 4 ersichtlich, waren in allen Versuchsreihen, wie auch in der Kontrolle, die Mehrheit der Sprosse aus den Blättern der Primärexplantate gebildet worden.

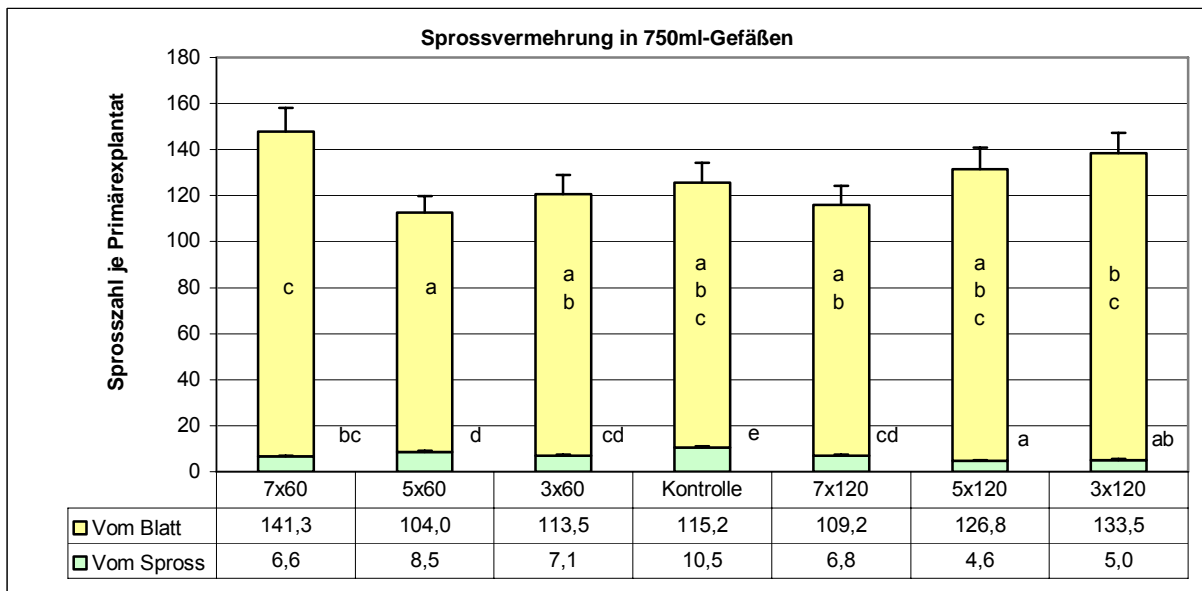


Diagramm 4: Aufteilung der Sekundärsprosse je Primärexplantat auf blatt- und sprossbürtige Sprosse in 750ml-Kulturgefäßen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

Obwohl die sprossbürtigen, neu gebildeten Sprosse eindeutig eine Minderheit darstellen, werden sie hier getrennt angeführt, da innerhalb dieser Gruppe weit mehr Sprosse >5 mm gebildet wurden als Sprosse <5 mm. Bei der mengenmäßig größeren Gruppe der blattbürtigen Sprosse wurden hingegen mehr Sprosse <5 mm als >5 mm gebildet (Diagramm 5 und Diagramm 6).

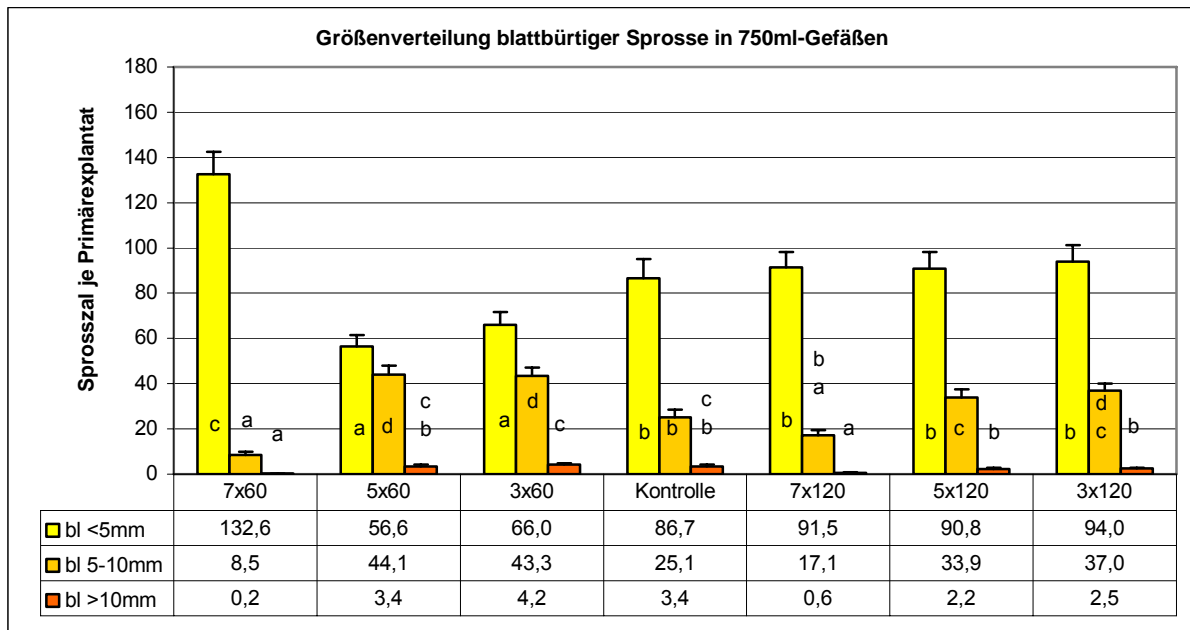


Diagramm 5: Größenverteilung der blattbürtigen Sekundärsprosse (bl) in 750ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der untersuchten Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

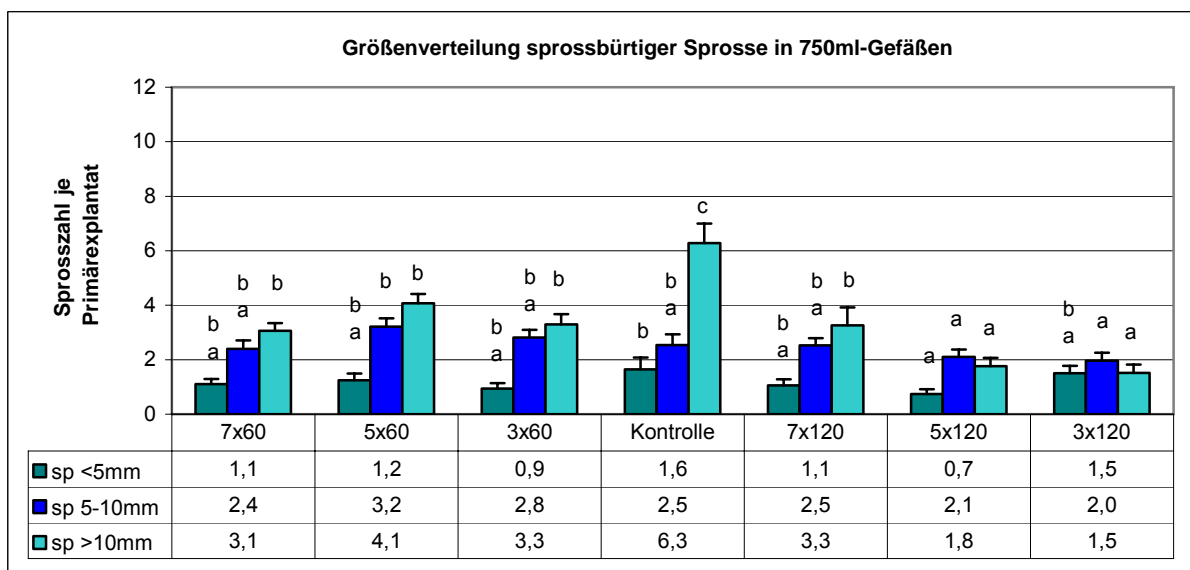


Diagramm 6: Größenverteilung der sprossbürtigen Sekundärsprosse (sp) in 750ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der untersuchten Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

Hinsichtlich der Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse unterschieden sich die Kulturgefäße I und II nur bei den Immersionsbedingungen 5x 60 Min. und 7x 120 Min. täglich. Bei den Kulturgefäßen mit 7x 60 Min. täglich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (vergl. Diagramm 7). Bei 5x 60 Min. täglich unterschieden sich nur die Sprosse mit 5-10 mm deutlich (vergl. Diagramm 8, Seite 13) während bei 3x 60 Min. täglich die beiden Kulturgefäße nicht signifikant voneinander abwichen (vergl. Diagramm 9, Seite 13). Bei 7x 120 Min. täglich unterschieden sich sowohl Sprosse mit 5-10 mm, als auch die Sprosse >5 mm voneinander signifikant (vergl. Diagramm 10, Seite 14).

Die Kulturgefäße I und II mit 5x 120 Min. (vergl. Diagramm 11, Seite 14) und 3x 120 Min. (vergl. Diagramm 12, Seite 15) unterschieden sich in der Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse nicht. Bei 3x 120 Min. täglich scheint der an sich signifikante Unterschied bei Sprossen <5 mm für die Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse nicht relevant, während bei 5x 120 Min. täglich sich die signifikanten Unterschiede bei den Sprossen <5 mm und 5-10 mm in der Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse gegenseitig aufheben.

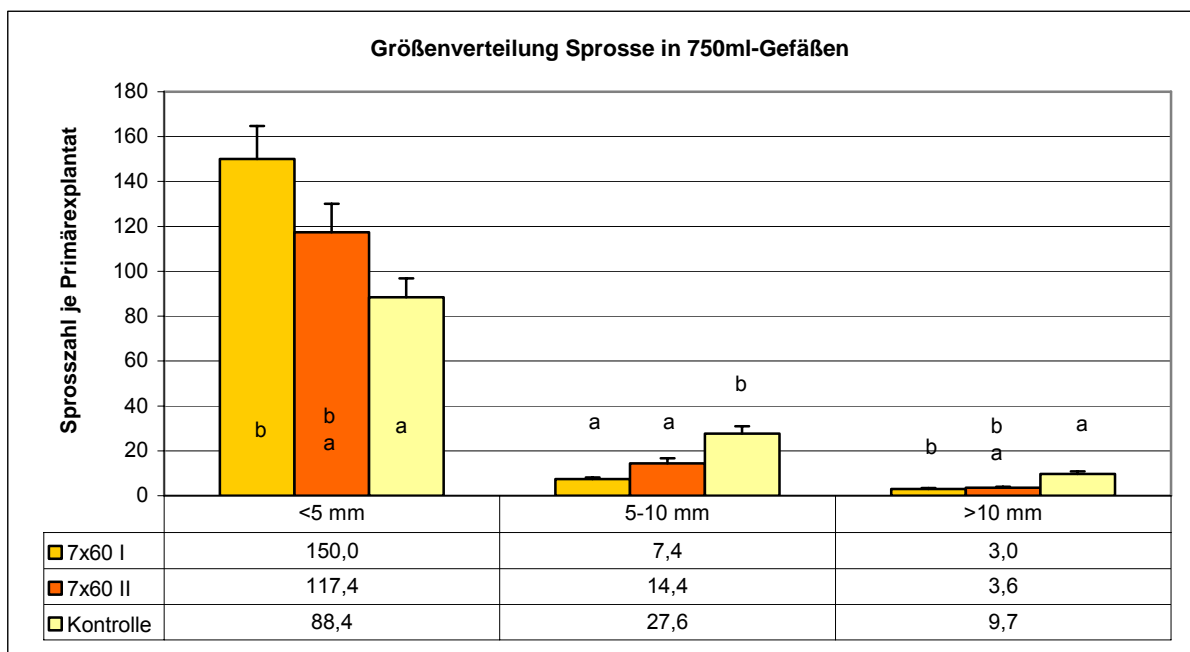


Diagramm 7: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 750ml Volumen bei 7 Immersionen täglich für je 60 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

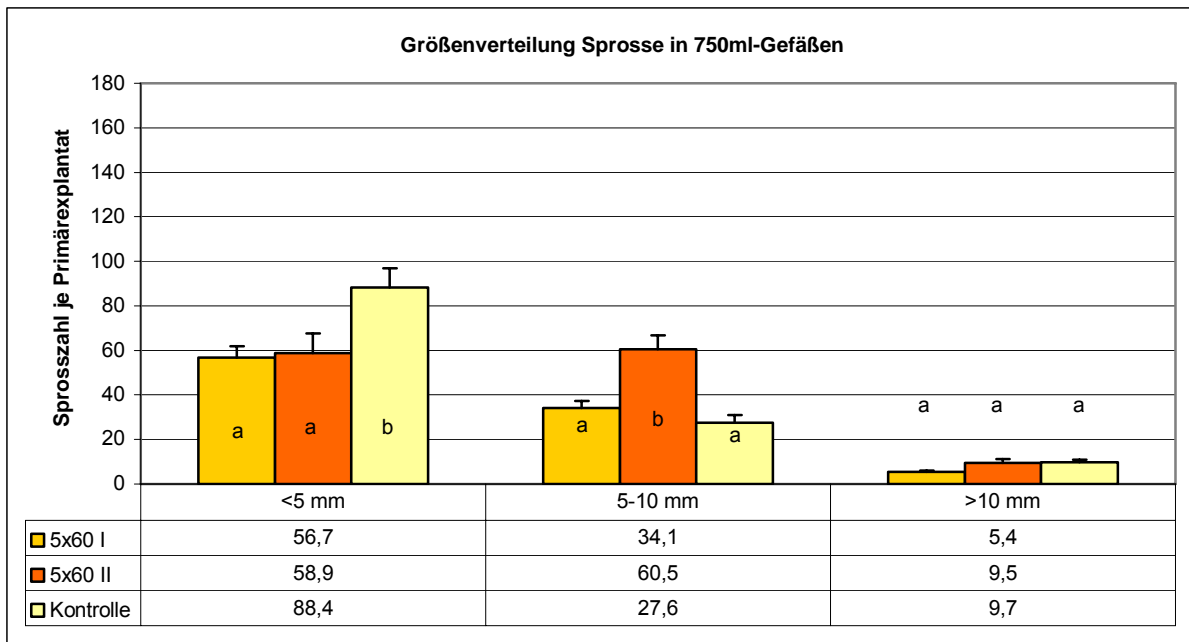


Diagramm 8: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 750ml Volumen bei 5 Immersionen täglich für je 60 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

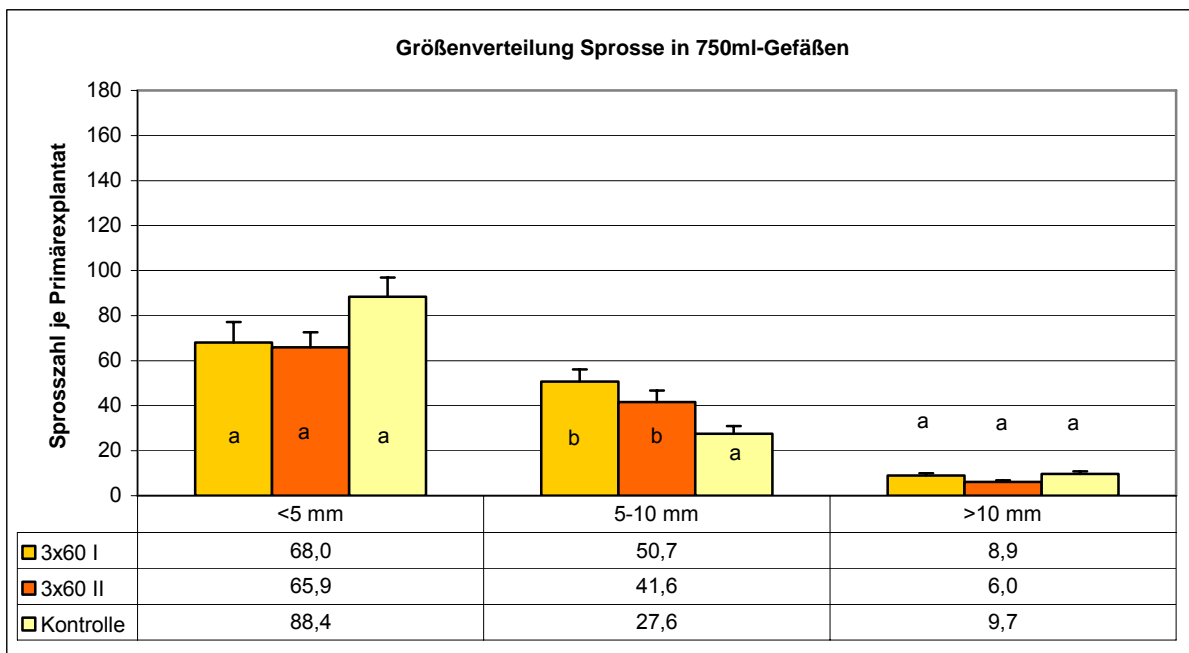


Diagramm 9: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 750ml Volumen bei 3 Immersionen täglich für je 60 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

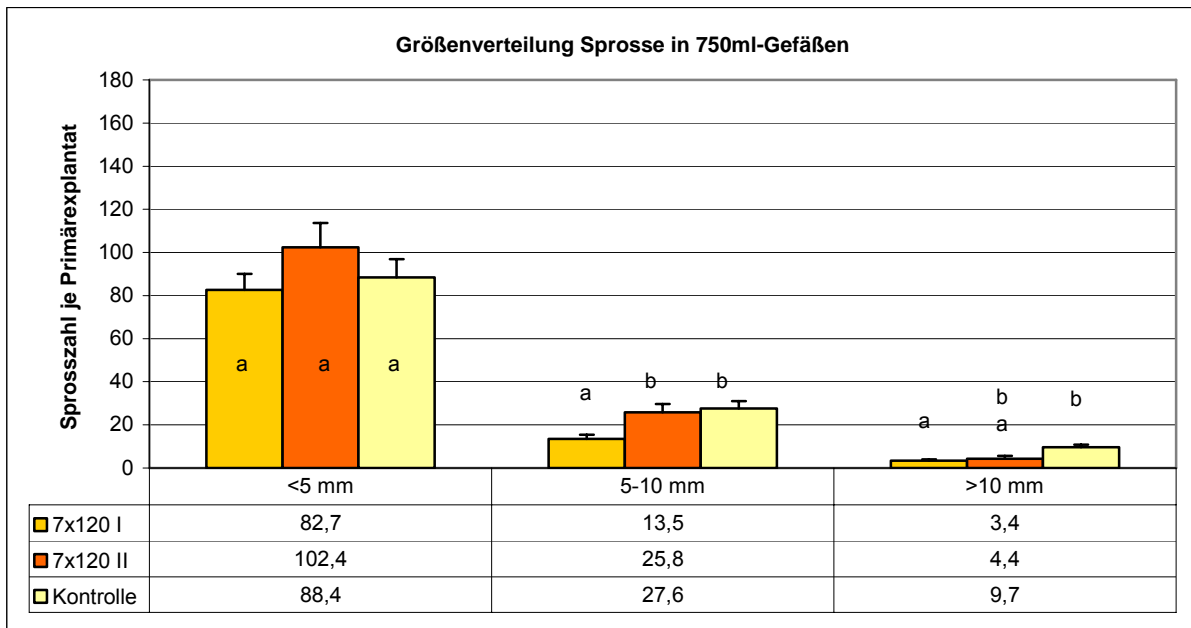


Diagramm 10: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 750ml Volumen bei 7 Immersionen täglich für je 120 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

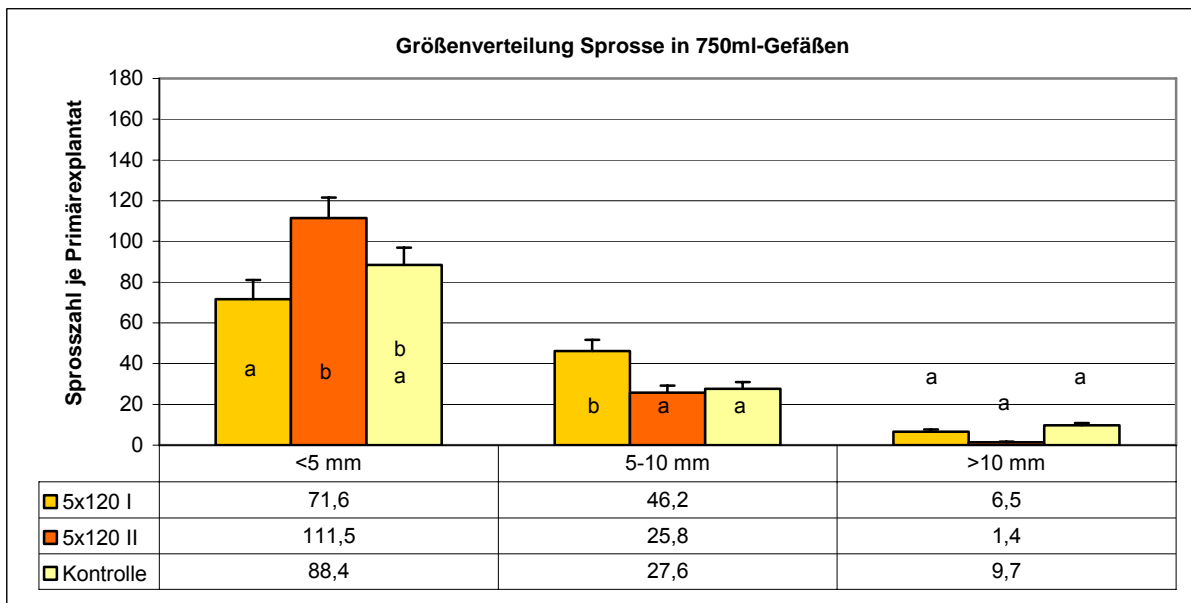


Diagramm 11: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 750ml Volumen bei 5 Immersionen täglich für je 120 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

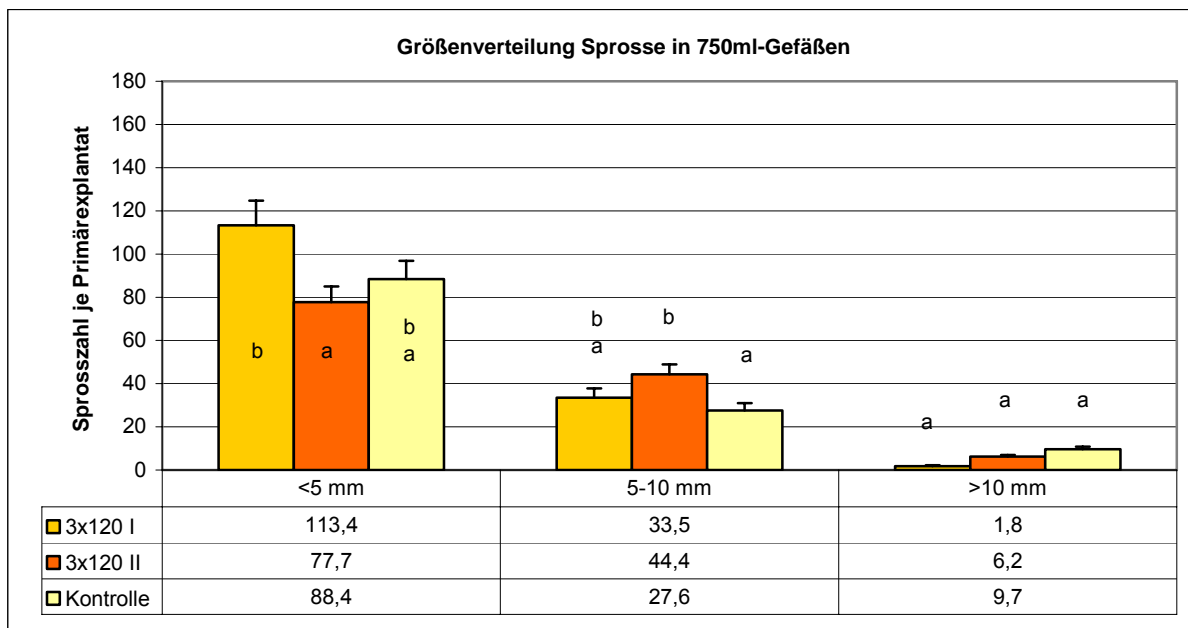


Diagramm 12: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 750ml Volumen bei 3 Immersionen täglich für je 120 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.1.2. Kulturgefäße mit einem Volumen von 1500 ml

Hinsichtlich der Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse zeigte sich auch bei dieser Gefäßgröße kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsreihen mit 60 Minuten (vergl. Diagramm 13, Seite 16, linke Diagrammseite) und 120 Minuten (vergl. Diagramm 13, Seite 16, rechte Diagrammseite) Immersionszeit. Innerhalb der Reihe mit 60 Minuten war eine leicht abnehmende Tendenz mit sinkender Immersionshäufigkeit zu beobachten.

Wie in Diagramm 14 (Seite 16) zu erkennen ist, waren in allen Versuchsreihen, wie auch in der Kontrolle, die Mehrheit der Sprosse aus den Blättern der Primärexplantate gebildet worden.

Diagramm 15 (Seite 17) zeigt, dass bei den blattbürtigen Sprossen tendenziell mehr Sprosse <5 mm gebildet wurden. Bei den sprossbürtigen Sprossen überwogen hingegen Sprosse mit >5 mm, wobei die sprossbürtigen Sprosse bei 7x 120 Min. Immersion täglich, bei denen mehr kleine Sprosse gebildet wurden, eine Ausnahme darstellten (vergl. Diagramm 16, Seite 17). Auch in dieser Gefäßgröße verhielt sich

die Aufteilung der Sprossgrößengruppen der sprossbürtigen Sprosse im Allgemeinen umgekehrt proportional zu den blattbürtigen Sprossen.

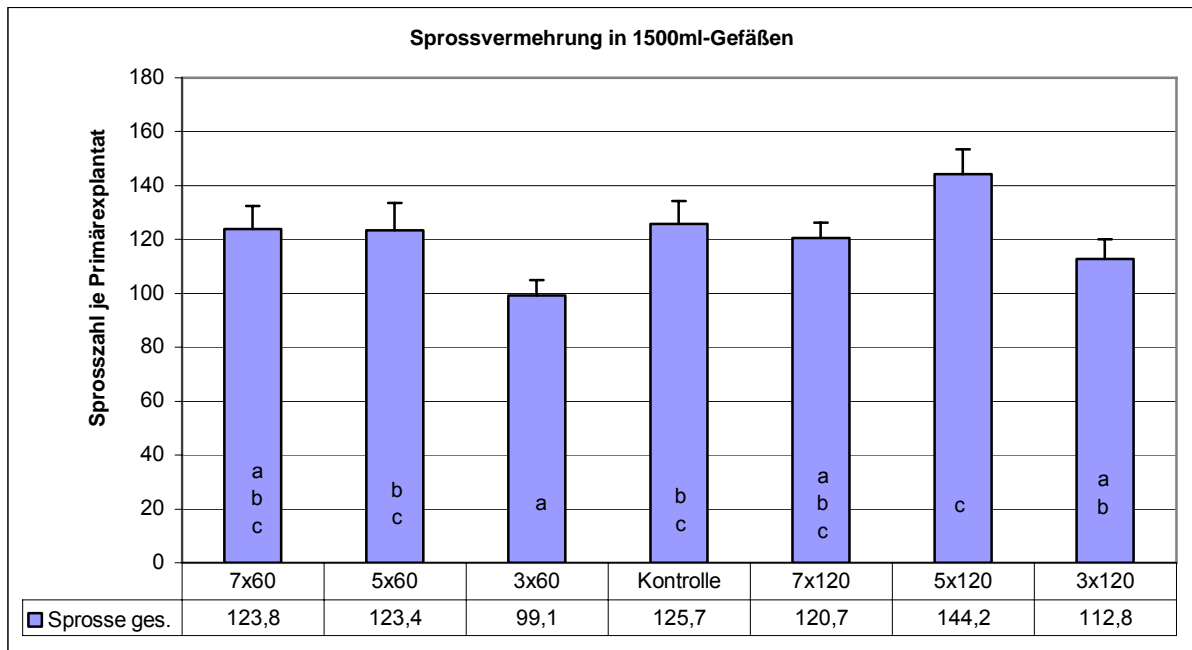


Diagramm 13: Sekundärsprosse je Primärexplantat in 1500ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der untersuchten Immersionsbedingungen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

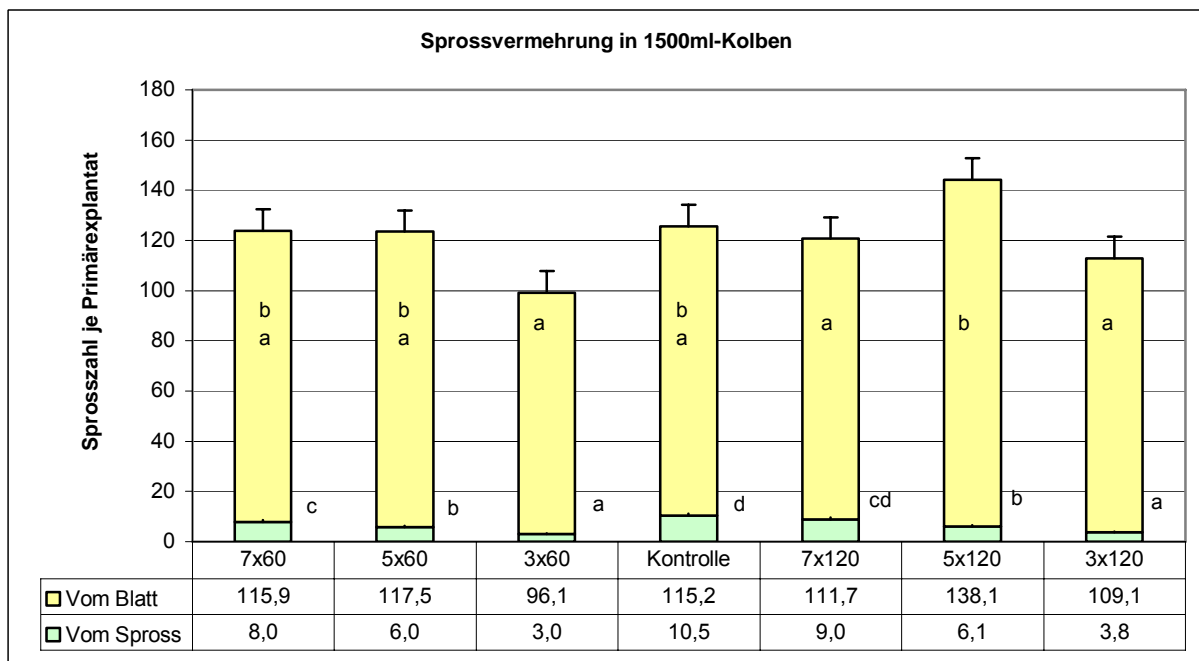


Diagramm 14: Aufteilung der Sekundärsprosse je Primärexplantat auf blatt- und sprossbürtige Sprosse in 1500ml-Kulturgefäßen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

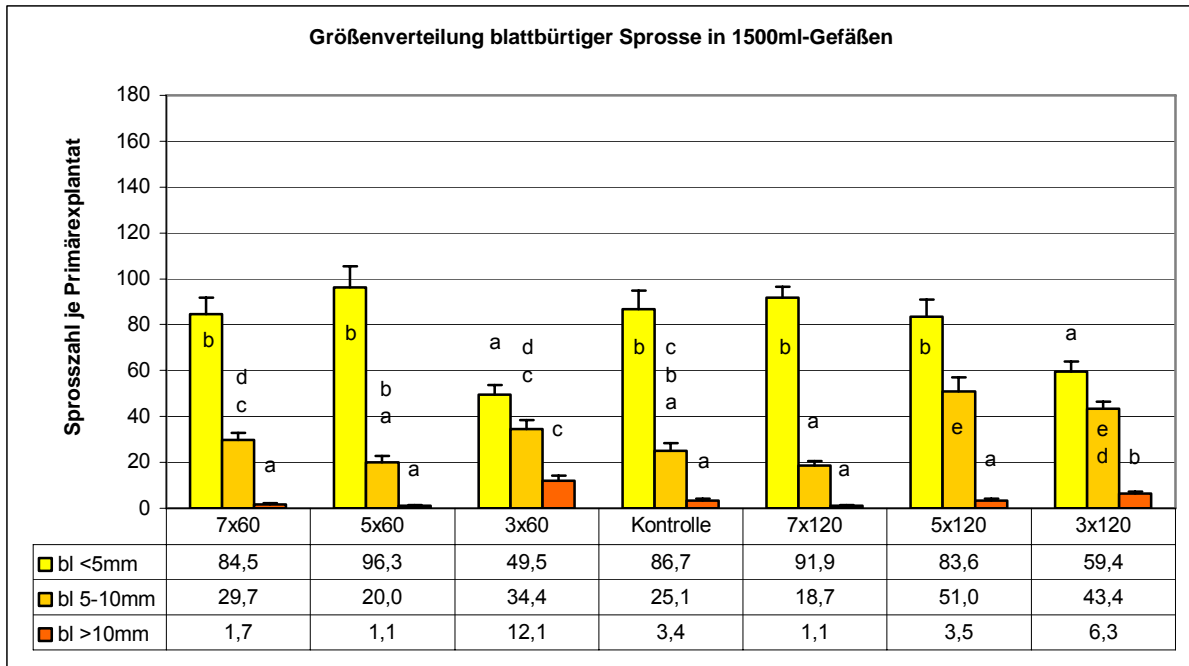


Diagramm 15: Größenverteilung der blattbürtigen Sekundärsprosse (bl) in 1500ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der untersuchten Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

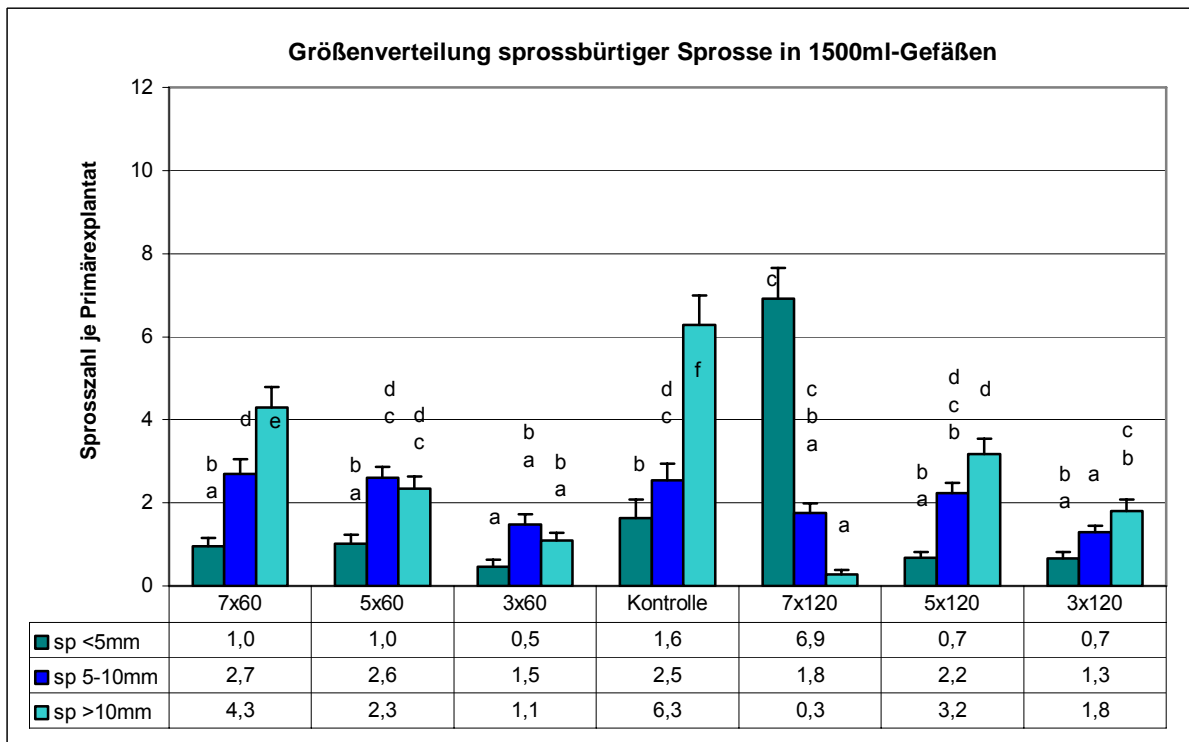


Diagramm 16: Größenverteilung der sprossbürtigen Sekundärsprosse (sp) in 1500ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der untersuchten Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

Bei den Immersionsbedingungen 7x 60 Min. täglich (vergl. Diagramm 17) schienen sich die signifikanten Unterschiede bei den Sprossgrößen <5 mm und 5-10 mm bei der Gesamtzahl der neu gebildeten Sprosse aufzuheben. Bei 5x 60 Min. Immersionen täglich wichen die Kulturgefäße I und II zwar in der Sprossgröße 5-10 mm (vergl. Diagramm 18, Seite 19) von einander ab, aber nicht hinsichtlich der Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse. Bei 3x 60 Min. tägl. (vergl. Diagramm 19, Seite 19) hoben sich die Unterschiede bei den Sprossgrößen <5 mm und 5-10 mm ähnlich wie bei 7x 60 Min. tägl. bei der Gesamtsprosszahl wieder auf. Lediglich bei den Immersionsbedingungen 7x 120 Min. täglich unterschieden sich die beiden Kulturgefäße weder in der Gesamtzahl der neu gebildeten Sprosse noch in den einzelnen Sprossgrößengruppen signifikant (vergl. Diagramm 20, Seite 20).

Auch bei den Immersionsbedingungen 5x 120 Min. täglich (vergl. Diagramm 21, Seite 20) hoben sich die signifikanten Unterschiede bei den Sprossgrößen <5 mm und 5-10 mm bei der Gesamtzahl der neu gebildeten Sprosse wieder auf.

Obwohl sich die Kulturgefäße I und II bei den Immersionsbedingungen 3x 120 Min. täglich bei den einzelnen Sprossgrößengruppen nicht signifikant unterschieden (vergl. Diagramm 22, Seite 21), sind sie als einzige in dieser Gefäßgröße hinsichtlich der Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse signifikant unterschiedlich.

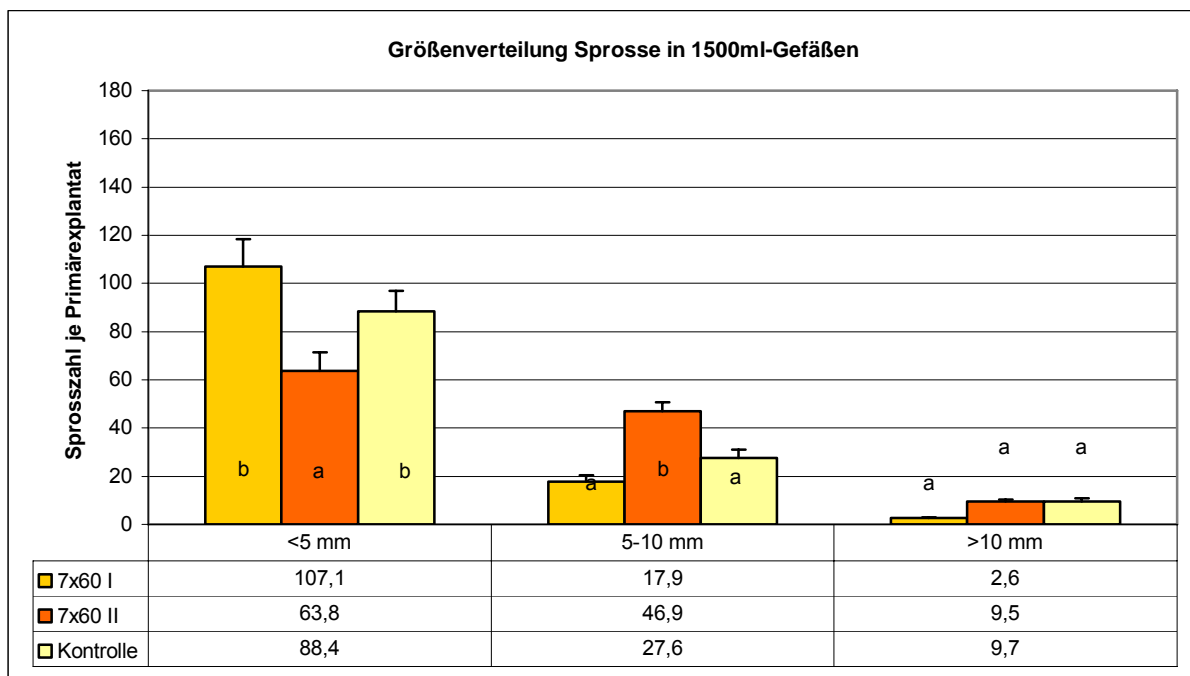


Diagramm 17: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 1500ml Volumen bei 7 Immersionen täglich für je 60 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

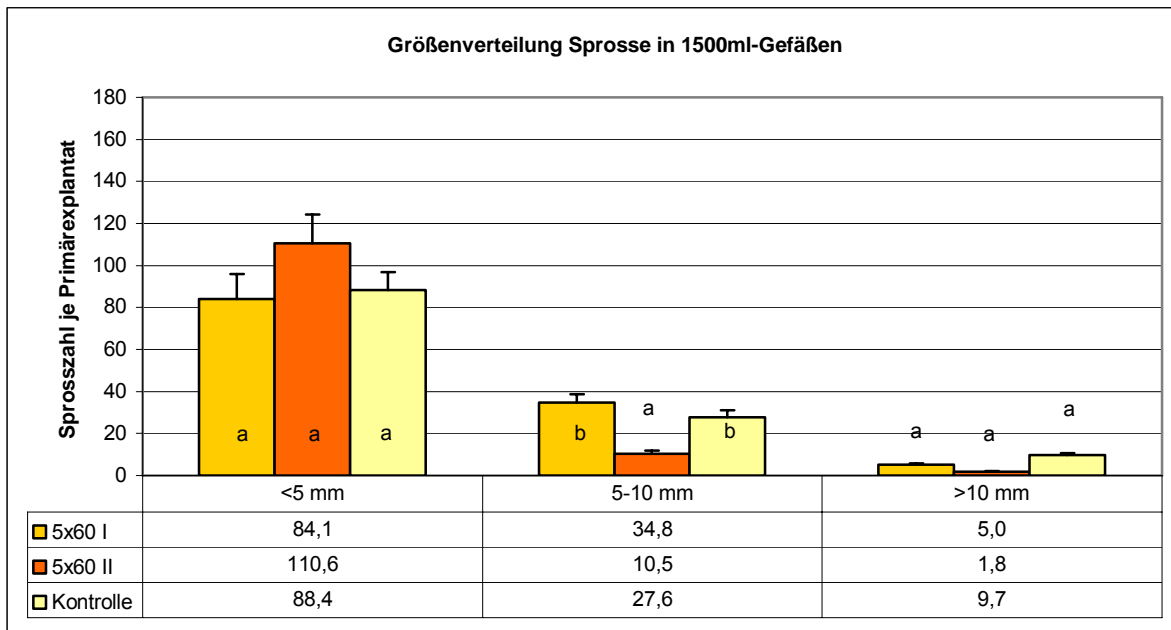


Diagramm 18: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 1500ml Volumen bei 5 Immersionen täglich für je 60 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

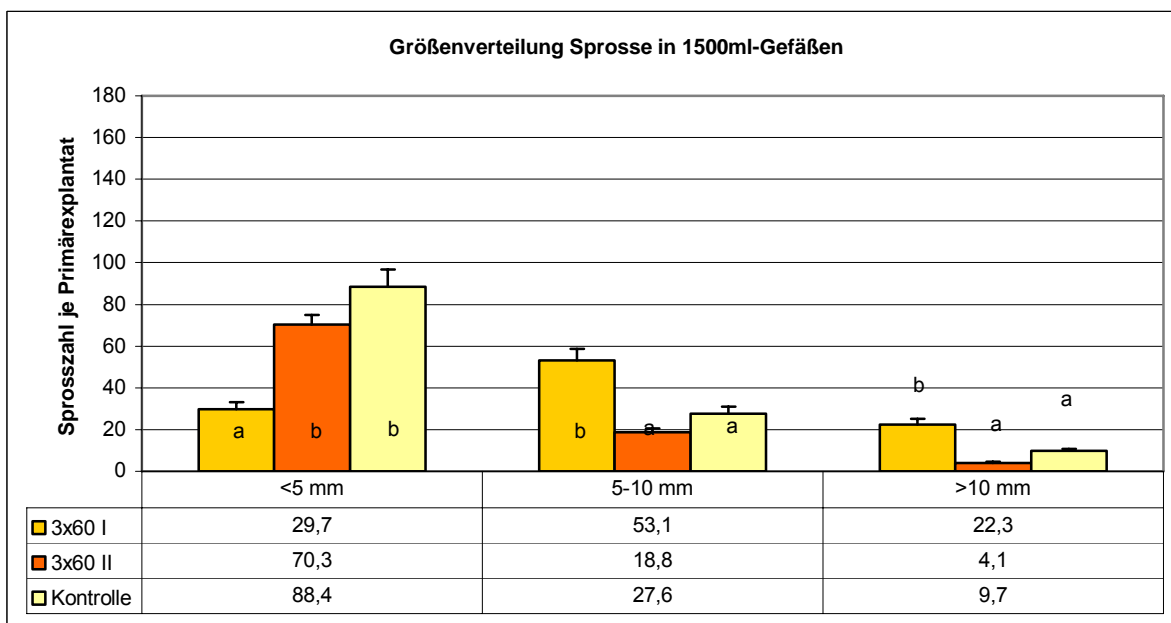


Diagramm 19: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 1500ml Volumen bei 3 Immersionen täglich für je 60 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

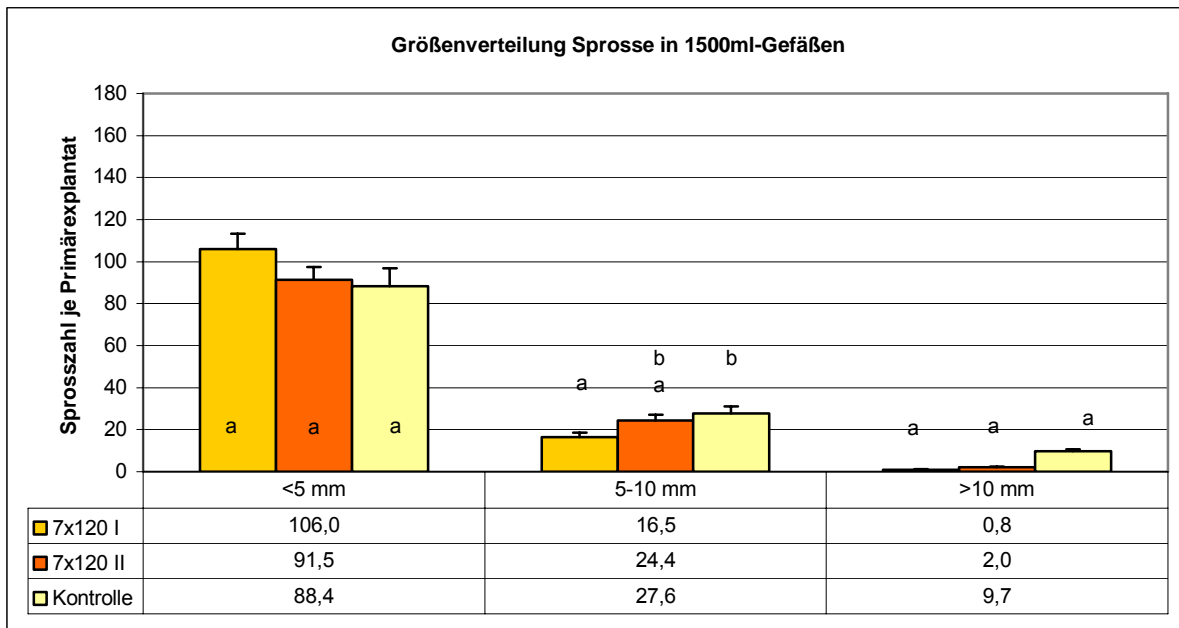


Diagramm 20: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 1500ml Volumen bei 7 Immersionen täglich für je 120 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

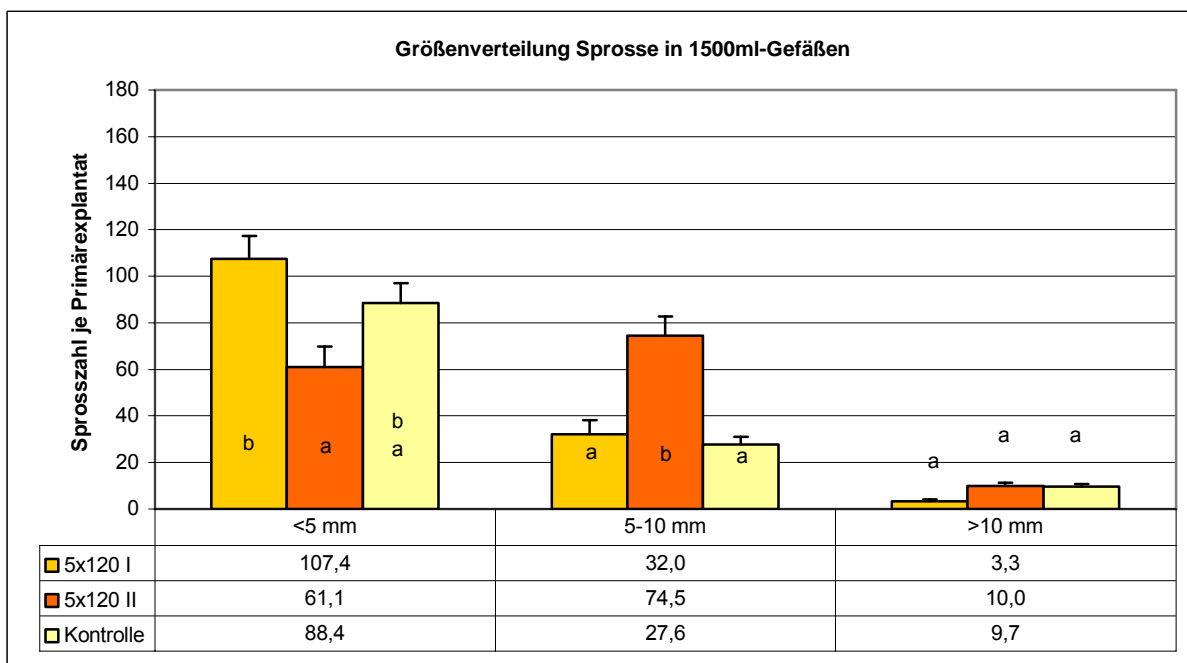


Diagramm 21: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 1500ml Volumen bei 5 Immersionen täglich für je 120 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

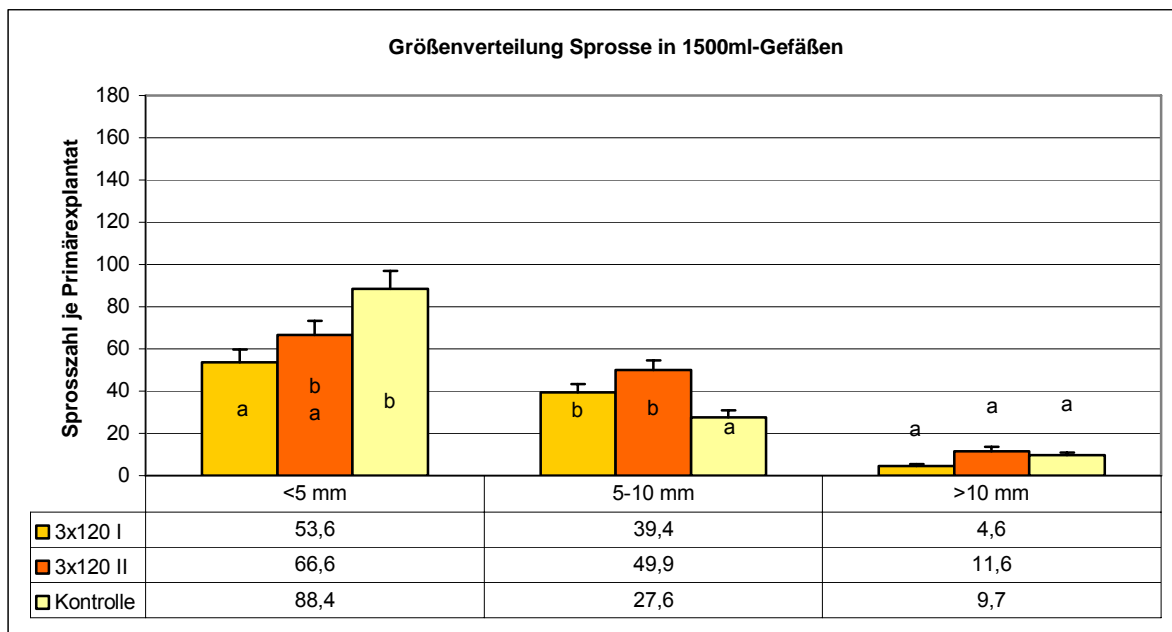


Diagramm 22: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse gebildet in Kulturgefäß I und II mit 1500ml Volumen bei 3 Immersionen täglich für je 120 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.1.3. Kulturgefäße mit einem Volumen von 2000 ml

In dieser Gefäßgröße wurden in der Versuchsreihe mit 120 Min. Immersionszeit signifikant mehr Sprosse gebildet als in der Versuchsreihe mit 60 Min. (vergl. Diagramm 23, Seite 22). Innerhalb der Reihe mit 120 Min. ist mit abnehmender Immersionshäufigkeit eine ansteigende Tendenz hinsichtlich der neu gebildeten Sprosse zu beobachten.

Auch in dieser Gefäßgröße wurde, wie in Diagramm 24 (Seite 22) ersichtlich, die Mehrheit der Sprosse aus den Blättern der Primärexplantate gebildet. Dabei zeigte sich einmal mehr, dass bei den blattbürtigen neu gebildeten Sprossen wieder die Sprosse <5 mm, außer bei den Immersionsbedingungen 7x 60 Min. und 3x 60 Min. täglich (vergl. Diagramm 25, Seite 23), überwogen. Mit Ausnahme der Immersionsbedingungen 7x 120 Min. täglich, bildeten sich bei den sprossbürtigen neu gebildeten Sprossen mehr Sprosse >5 mm (vergl. Diagramm 26, Seite 23).

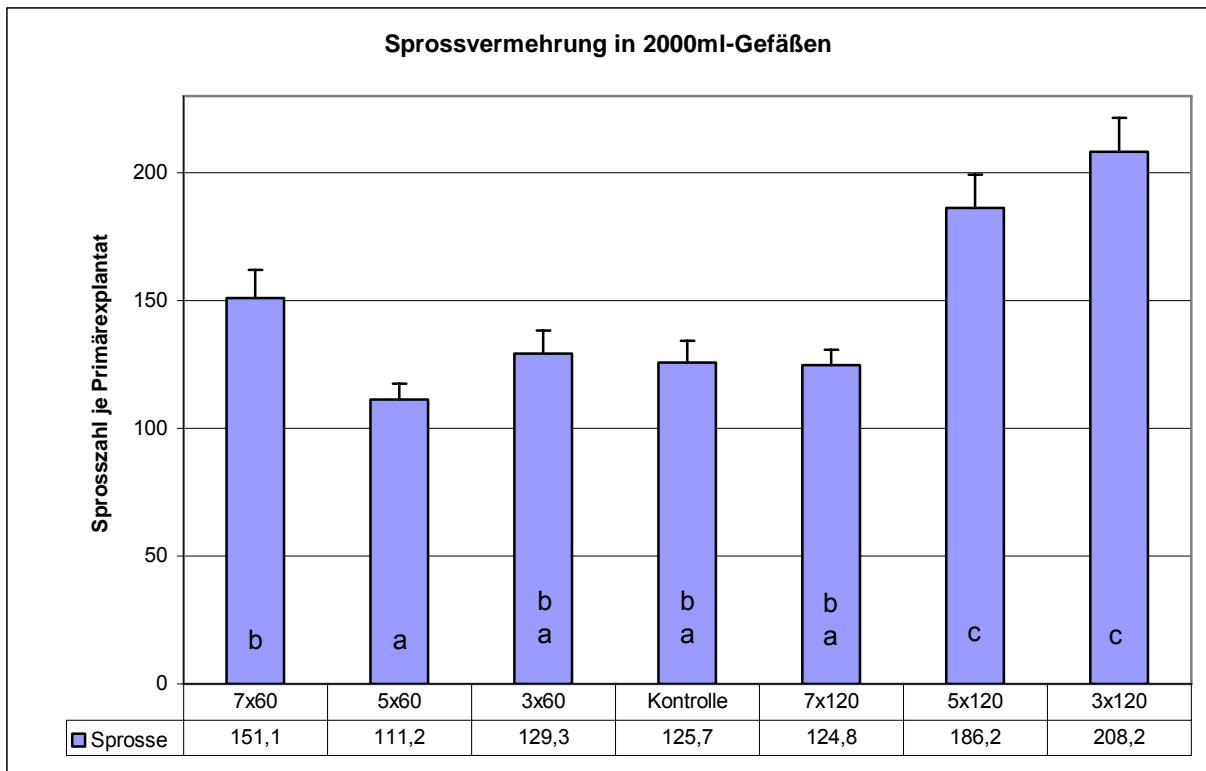


Diagramm 23: Sekundärsprosse je Primärexplantat in 2000ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der untersuchten Immersionsbedingungen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

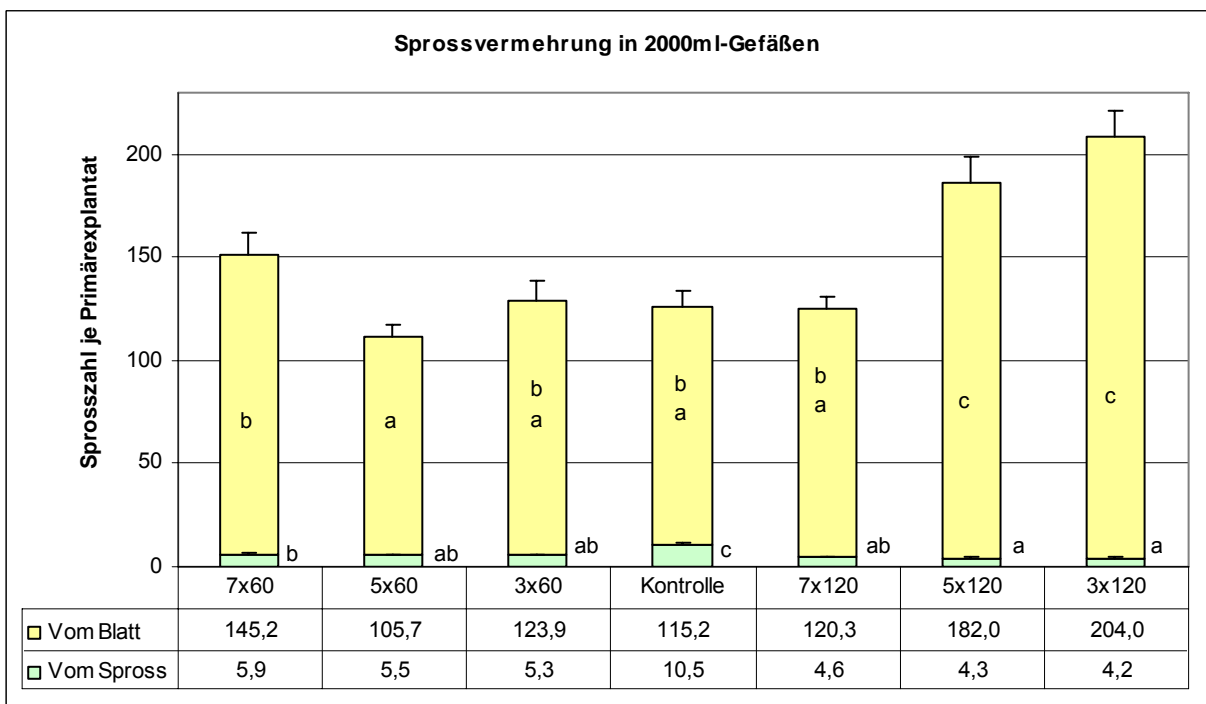


Diagramm 24: Aufteilung der Sekundärsprosse je Primärexplantat auf blatt- und sprossbürtige Sprosse in 2000ml-Kulturgefäßen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

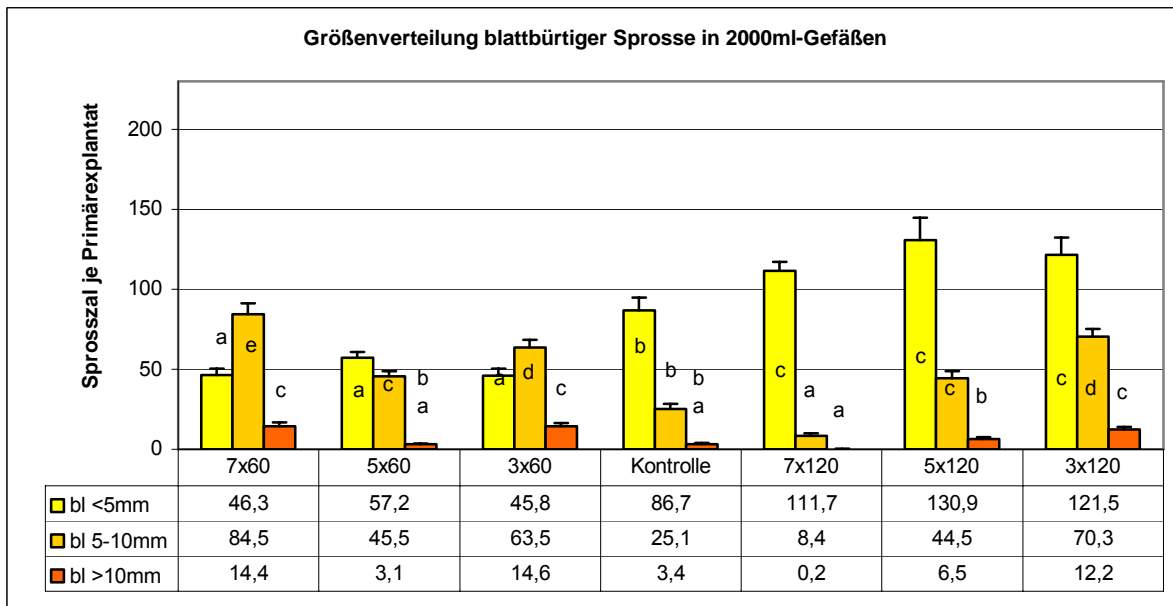


Diagramm 25: Größenverteilung der blattbürtigen Sekundärsprosse (bl) in 2000ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der untersuchten Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

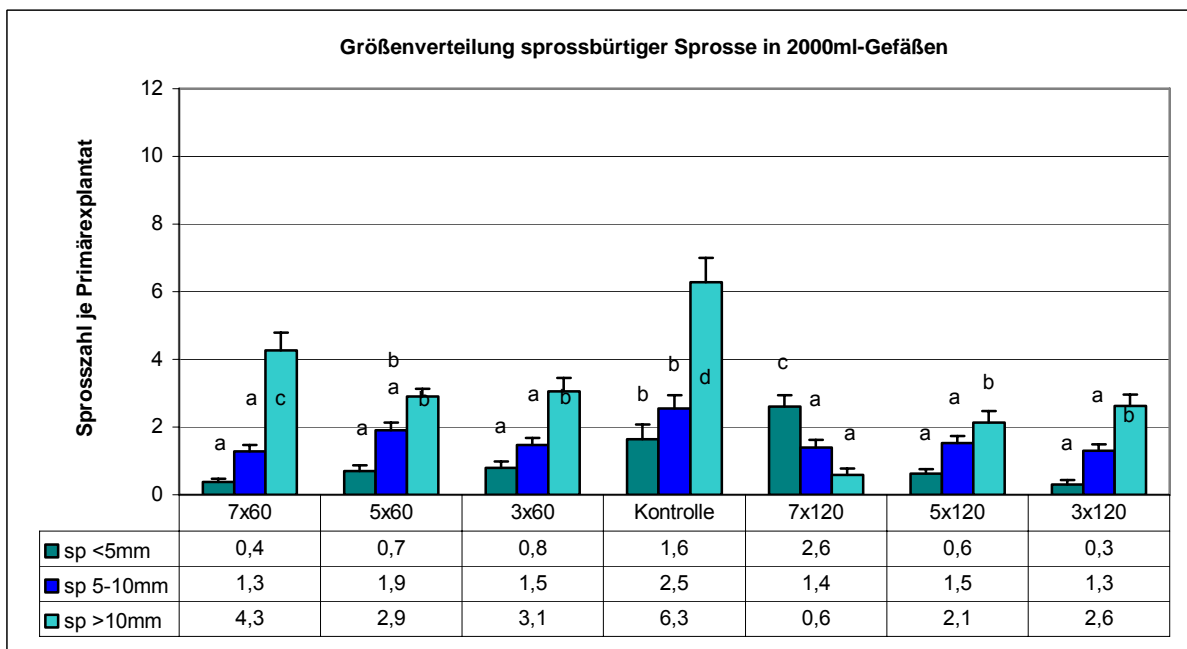


Diagramm 26: Größenverteilung der sprossbürtigen Sekundärsprosse (sp) in 2000ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der untersuchten Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturgefäßen I und II hinsichtlich der Sprossgrößengruppen zeigten sich bei 7x 60 Min. täglich (vergl. Diagramm 27, Seite 24), während bei 5x 60 Min. täglich (vergl. Diagramm 28, Seite 25) nicht nur die Kulturgefäße I und II deutlich voneinander abwichen, sondern sich bei der

Sprossgröße 5 – 10 mm auch signifikant von der Kontrolle unterschieden. Bei 3x 60 Min. täglich (vergl. Diagramm 29, Seite 25) waren die beiden Parallelansätze I und II nicht signifikant verschieden.

Ebenfalls nicht nur signifikant unterschiedlich zwischen Kulturgefäß I und II, sondern auch gegenüber der Kontrolle waren die Sprossgrößen 5 – 10 mm bei 7x 120 Min. täglich (vergl. Diagramm 30, Seite 26).

Bezüglich der Gesamtzahl der neu gebildeten Sprosse unterschieden sich die Kulturgefäße I und II in dieser Gefäßgröße nur bei den Immersionsbedingungen 5x 120 Min. täglich und 3x 120 Minuten täglich. Bei beiden resultiert diese Differenz aus den signifikanten Abweichungen bei den Sprossgrößen <5 mm und >5 mm (vergl. Diagramme 31, Seite 26 und Diagramm 32, Seite 27).

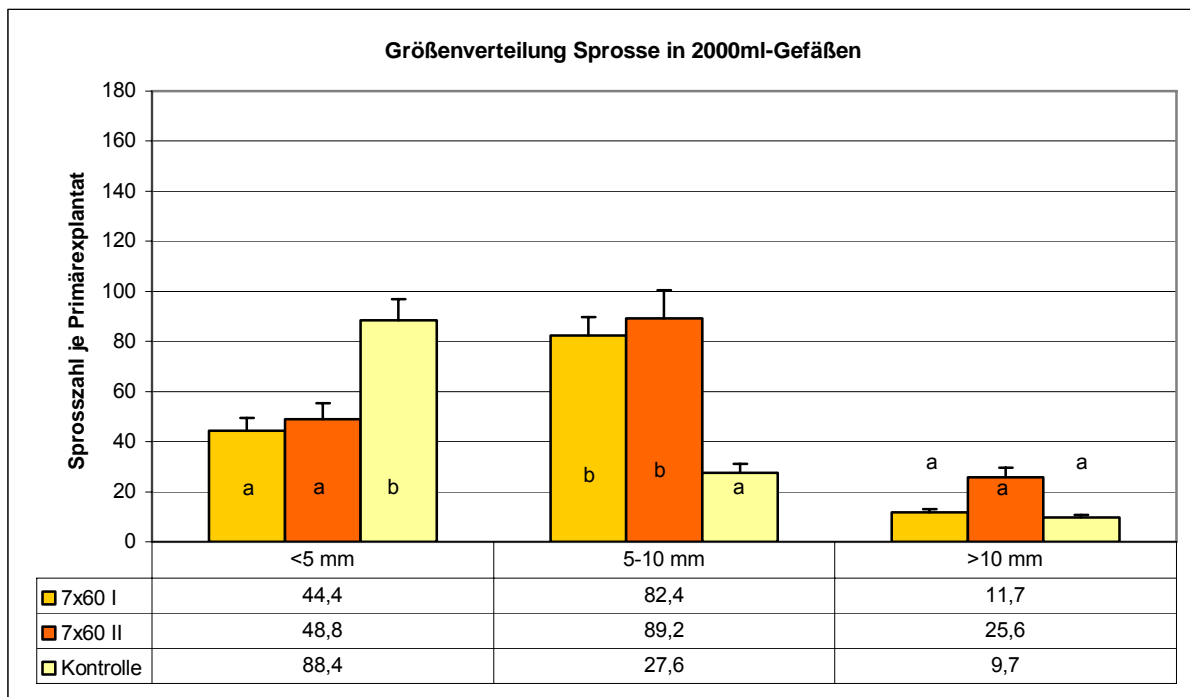


Diagramm 27: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 2000ml Volumen bei 7 Immersionen täglich für je 60 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

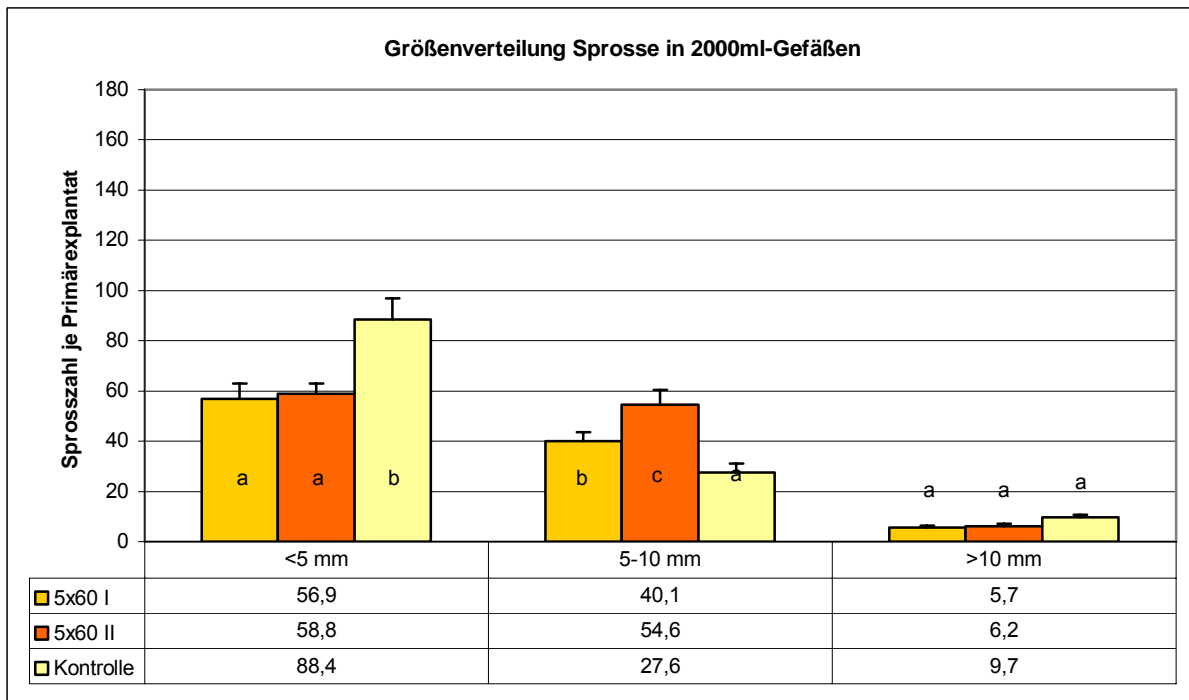


Diagramm 28: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 2000ml Volumen bei 5 Immersionen täglich für je 60 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

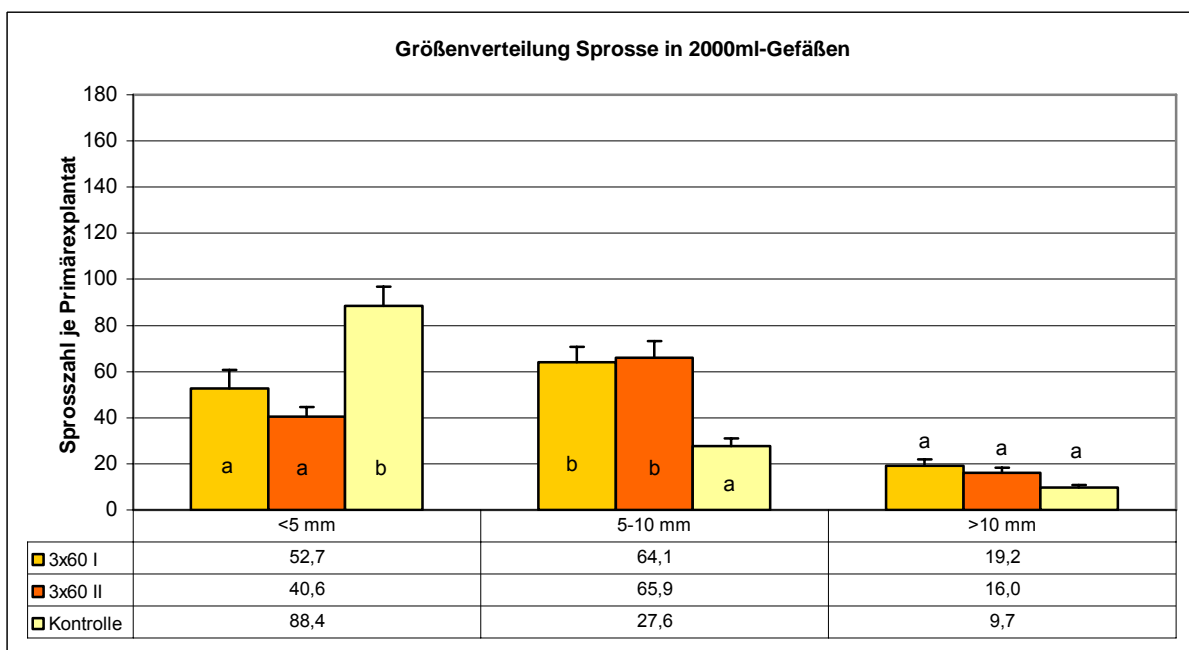


Diagramm 29: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 2000ml Volumen bei 3 Immersionen täglich für je 60 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

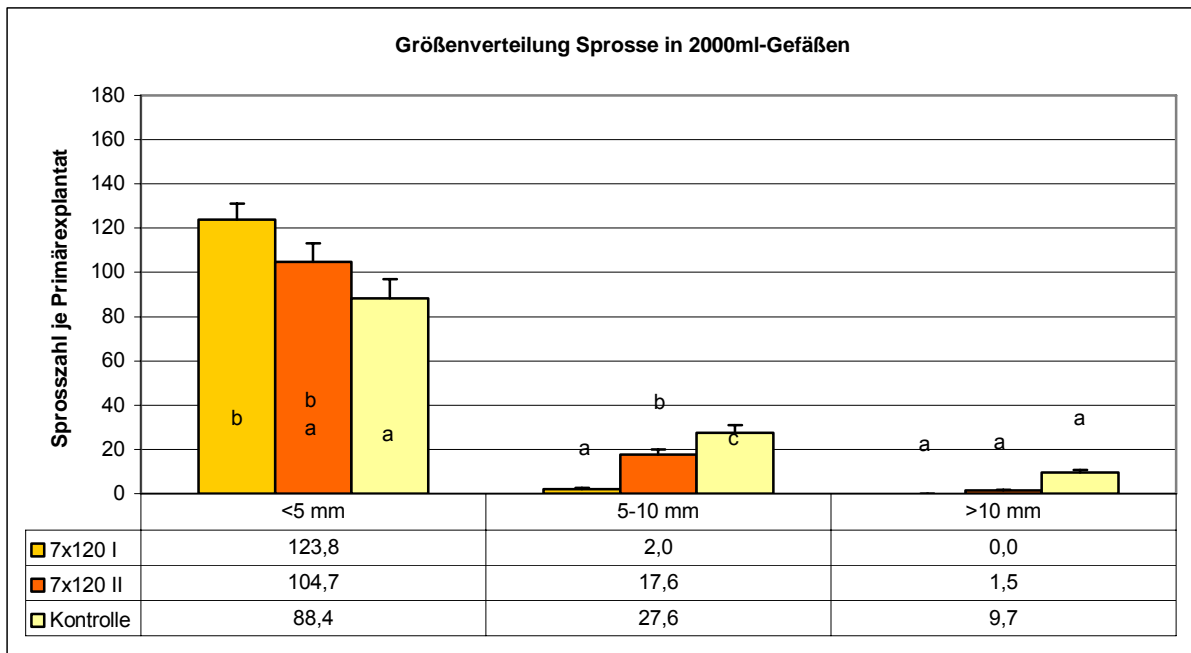


Diagramm 30: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 2000ml Volumen bei 7 Immersionen täglich für je 120 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

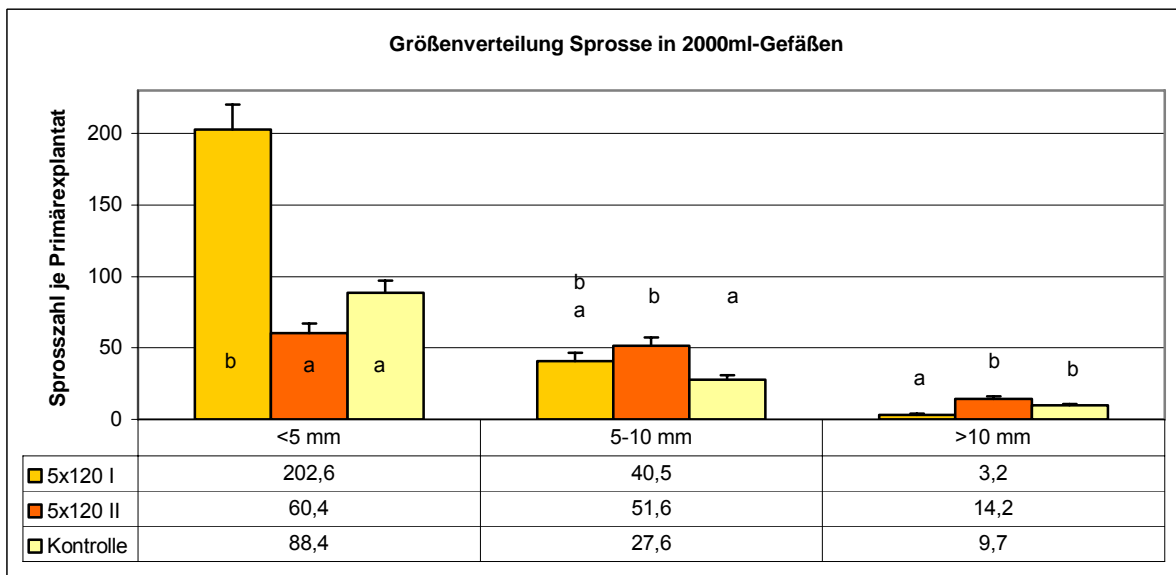


Diagramm 31: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 2000ml Volumen bei 5 Immersionen täglich für je 120 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

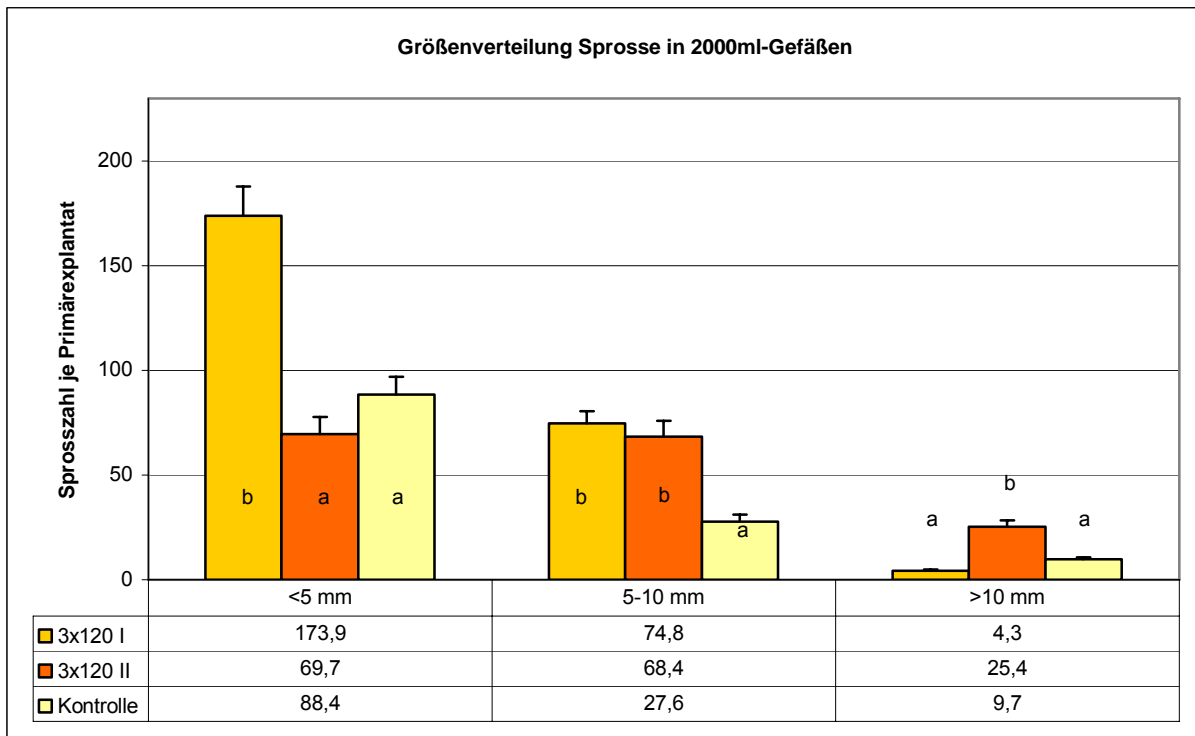


Diagramm 32: Vergleich der Größenverteilung der Sekundärsprosse in Kulturgefäß I und II mit 2000ml Volumen bei 3 Immersionen täglich für je 120 Minuten (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.2. Einfluss der Gefäßgröße auf Sprossvermehrung und –größe

Diagramm 33 zeigt die gesamten, neu gebildeten Sprosse bezogen auf die Versuchsreihen mit 60 und 120 Minuten Immersionsdauer, ohne Immersionshäufigkeit und Gefäßgröße zu berücksichtigen. Dabei fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle einerseits und den Versuchsreihen mit 60 Minuten und 120 Minuten Immersionsdauer andererseits auf. Der Anteil der Sprosse >5 mm war bei der Kontrolle am niedrigsten und bei der Versuchsreihe mit 60 Minuten Immersionsdauer am höchsten.

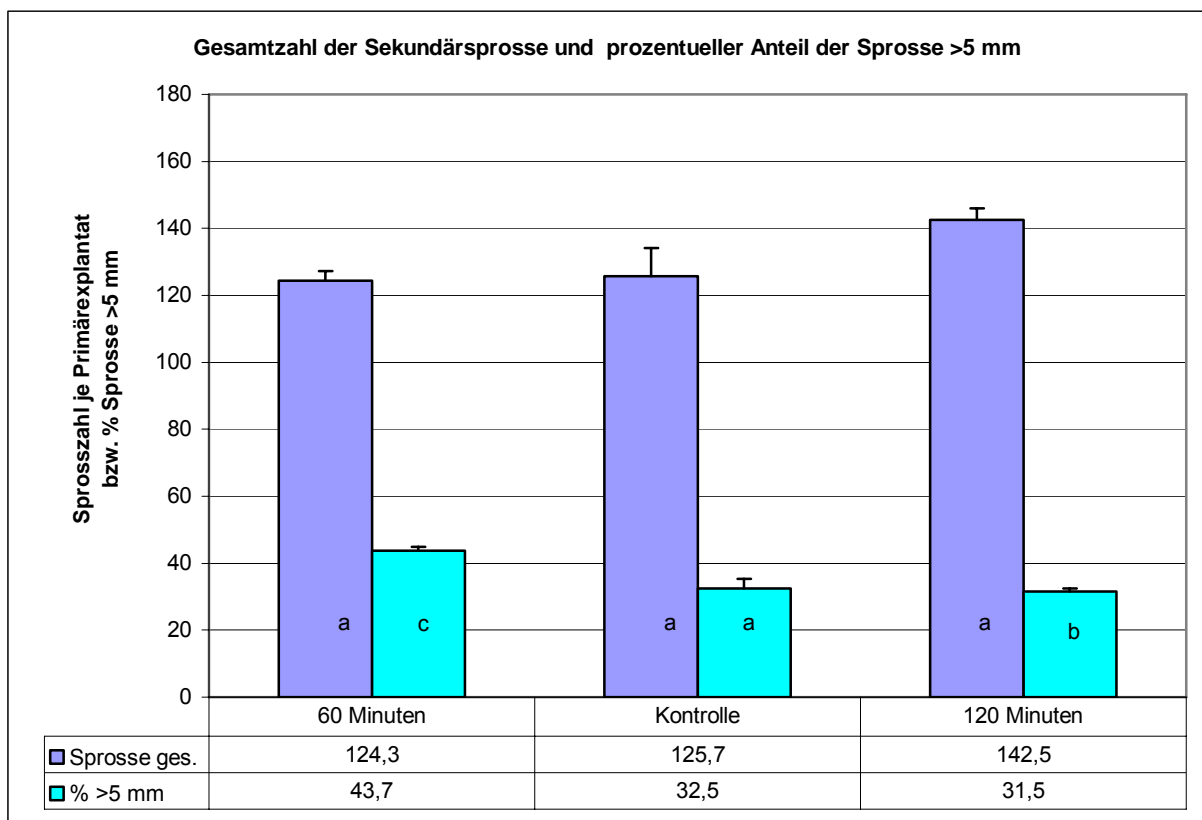


Diagramm 33: Sekundärsprosse je Primärexplantat sowie prozentueller Anteil der Sprosse >5 mm bei 60 und 120 Minuten Immersionsdauer ohne Berücksichtigung der Immersionshäufigkeit und der Kulturgefäßgröße (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

Betrachtet man die gesamten, neu gebildeten Sprosse in Bezug auf die Immersionshäufigkeit, ohne Immersionsdauer und Gefäßgröße zu beachten, kann man auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen 3x täglich, 5x täglich, 7x täglich und der Kontrolle erkennen. Der Anteil der Sprosse >5 mm nimmt hingegen mit steigender Immersionshäufigkeit stetig ab (vergl. Diagramm 34, Seite 29).

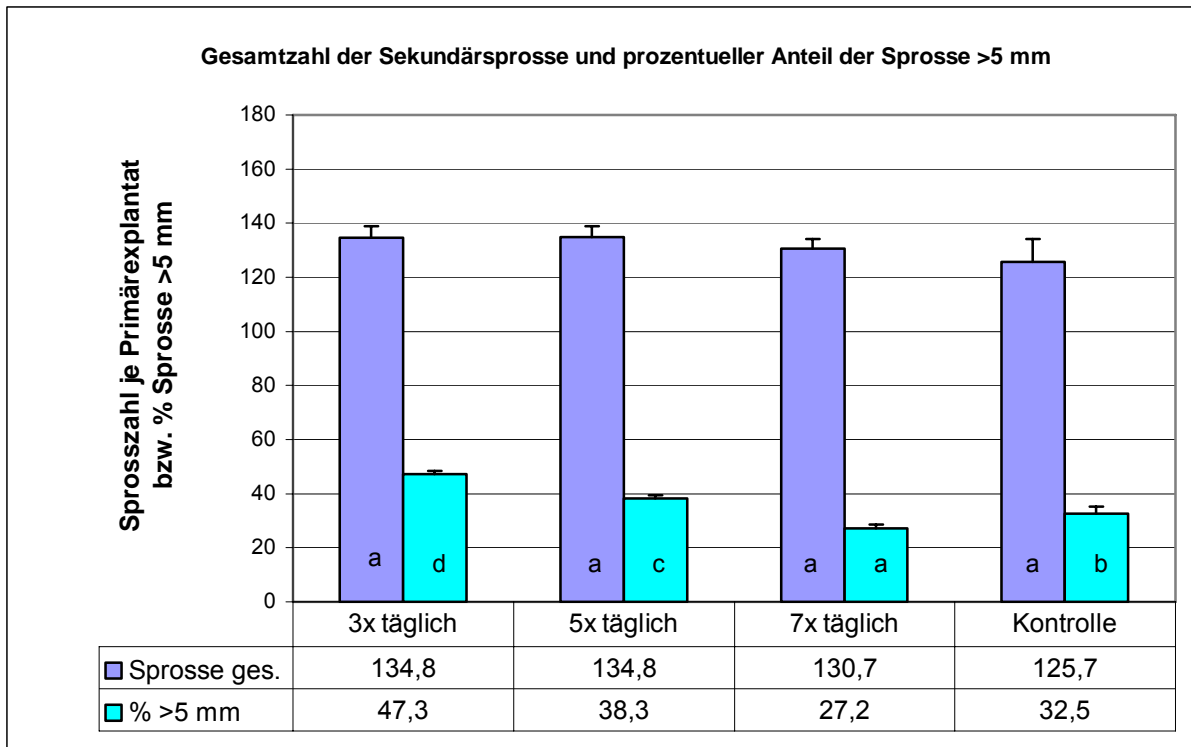


Diagramm 34: Sekundärsprosse je Primärexplantat, sowie prozentueller Anteil der Sprosse >5 mm bei 3, 5 und 7 Immersionen täglich ohne Berücksichtigung der Immersionsdauer und der Kulturgefäßgröße (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.2.1. Immersionsdauer von 60 Minuten

In dieser Versuchsreihe wurden bei 7 Immersionen täglich deutlich mehr Sprosse gebildet als bei 5 oder 3 Immersionen täglich (vergl. Diagramm 35, Seite 30). Diagramm 36 (Seite 30) zeigt, wie sich die Gesamtsprosszahl bezüglich der Größenkategorien <5 mm, 5 – 10 mm und >10 mm zusammensetzt.

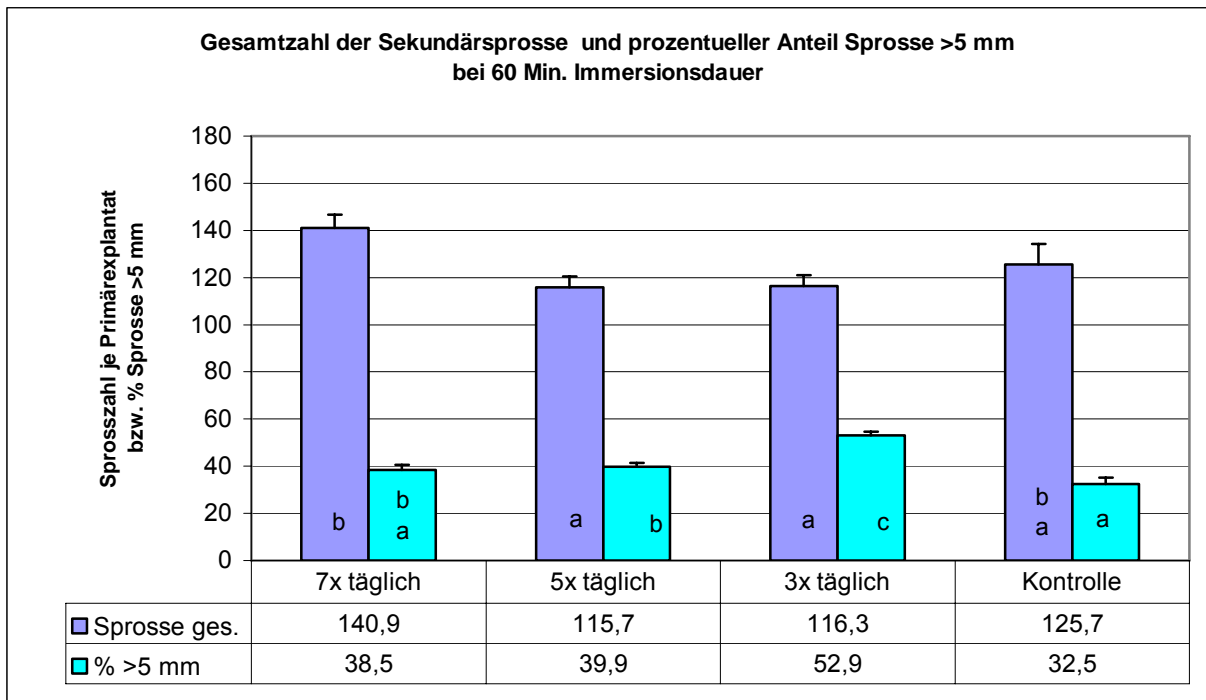


Diagramm 35: Sekundärsprosse je Primärexplantat, sowie prozentueller Anteil der Sprosse >5 mm bei 60 Minuten Immersionsdauer und 7, 5 oder 3 Immersionen täglich ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgröße (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

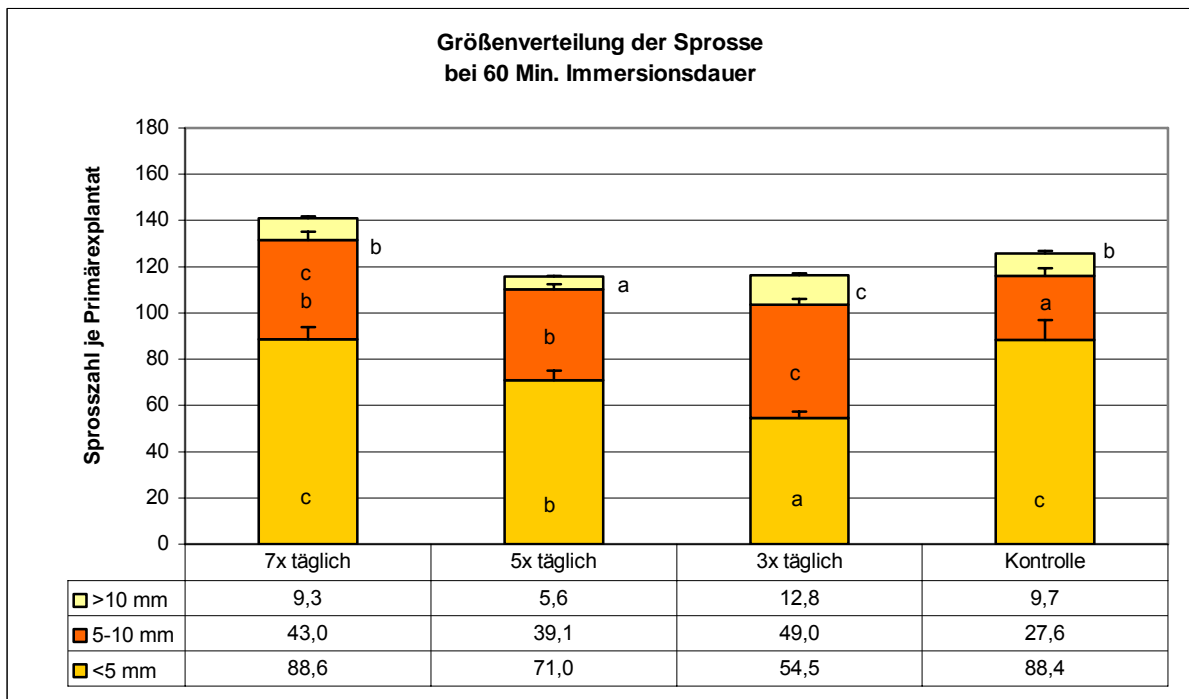


Diagramm 36: Größenverteilung der Sekundärsprosse je Primärexplantat bei 60 Minuten Immersionsdauer und 7, 5 oder 3 Immersionen täglich ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgröße (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.2.1.1. 7 Immersionen täglich für 60 Minuten

Hinsichtlich der gesamten Anzahl neu gebildeter Sprosse gab es in dieser Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gefäßgrößen (vergl. Diagramm 37). Erst wenn man die einzelnen Sprossgrößengruppen in den verschiedenen Gefäßgrößen vergleicht, zeigt sich, dass mit steigender Gefäßgröße auch die Größe der neu gebildeten Sprosse stieg (vergl. Diagramm 38, Seite 32).

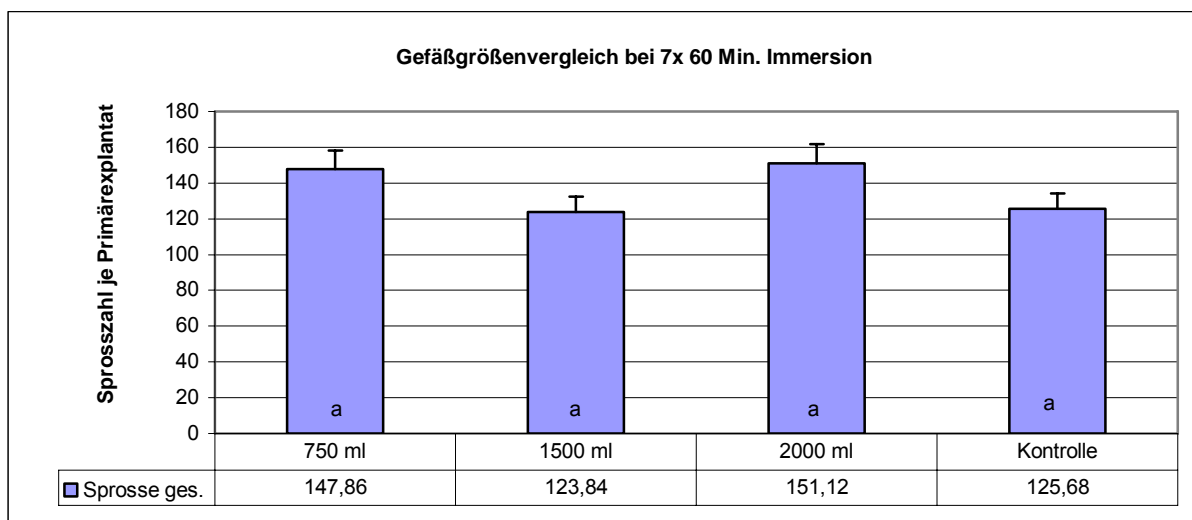


Diagramm 37: Sekundärsprosse bei 7 Immersionen täglich für je 60 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

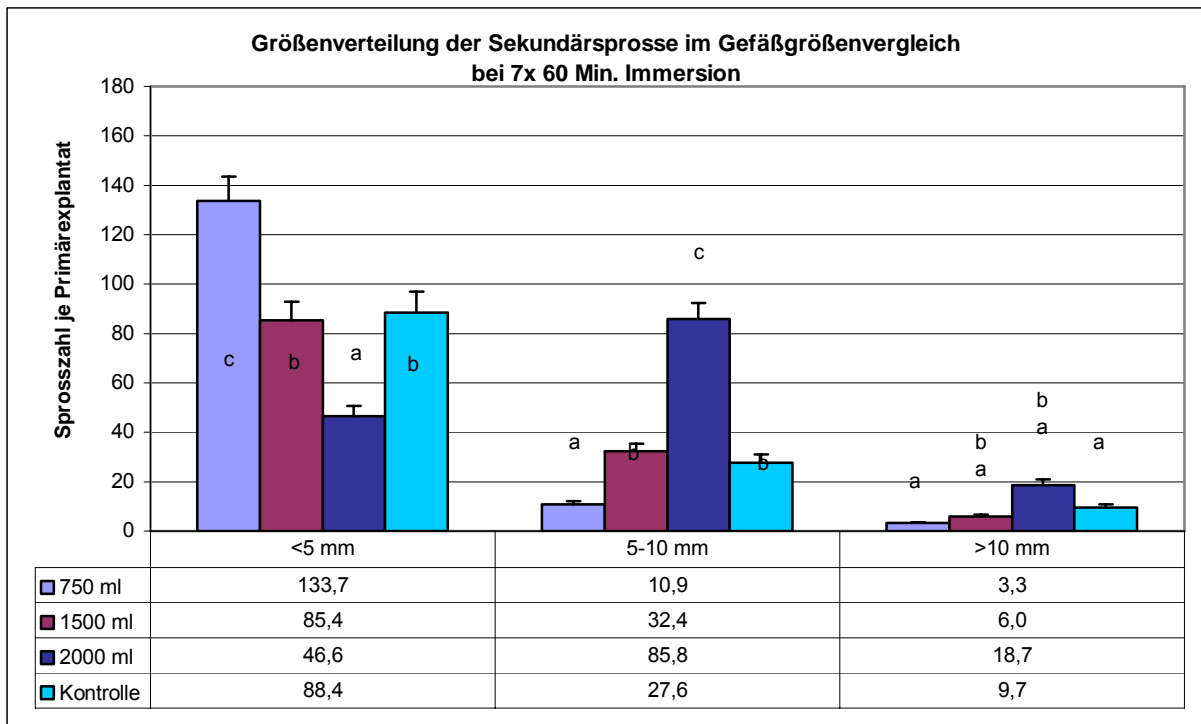


Diagramm 38: Größenverteilung der Sekundärsprosse bei 7 Immersionen täglich für je 60 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.2.1.2. 5 Immersionen täglich für 60 Minuten

Auch in dieser Gruppe ergaben sich hinsichtlich der Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gefäßgrößen (vergl. Diagramm 39, Seite 33). Diagramm 40 (Seite 33) zeigt den Vergleich der einzelnen Sprossgrößengruppen in Bezug auf die unterschiedlichen Gefäßgrößen.

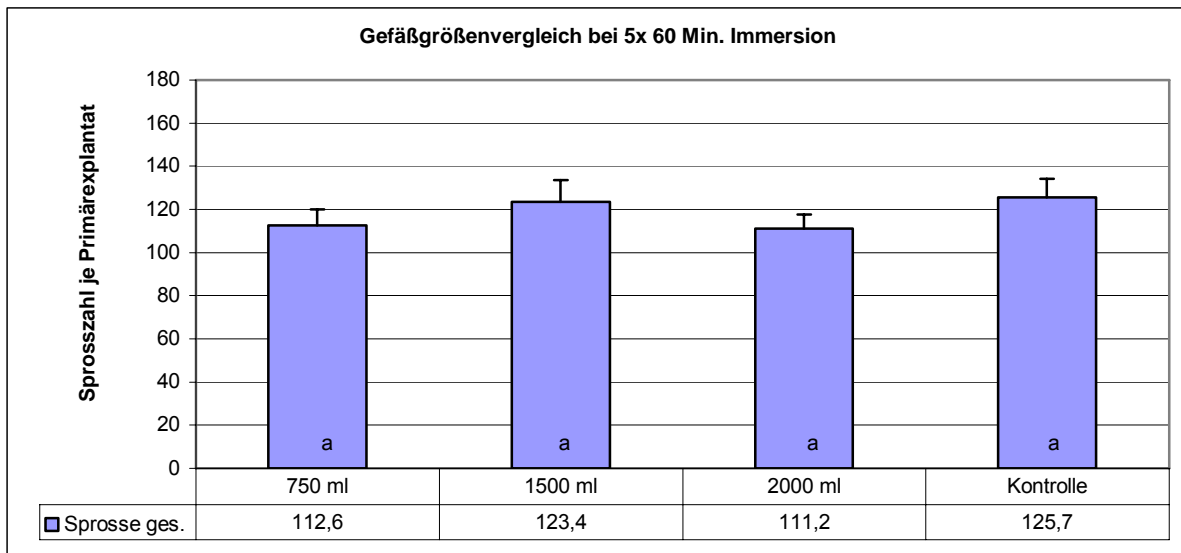


Diagramm 39: Sekundärsprosse bei 5 Immersionen täglich für je 60 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

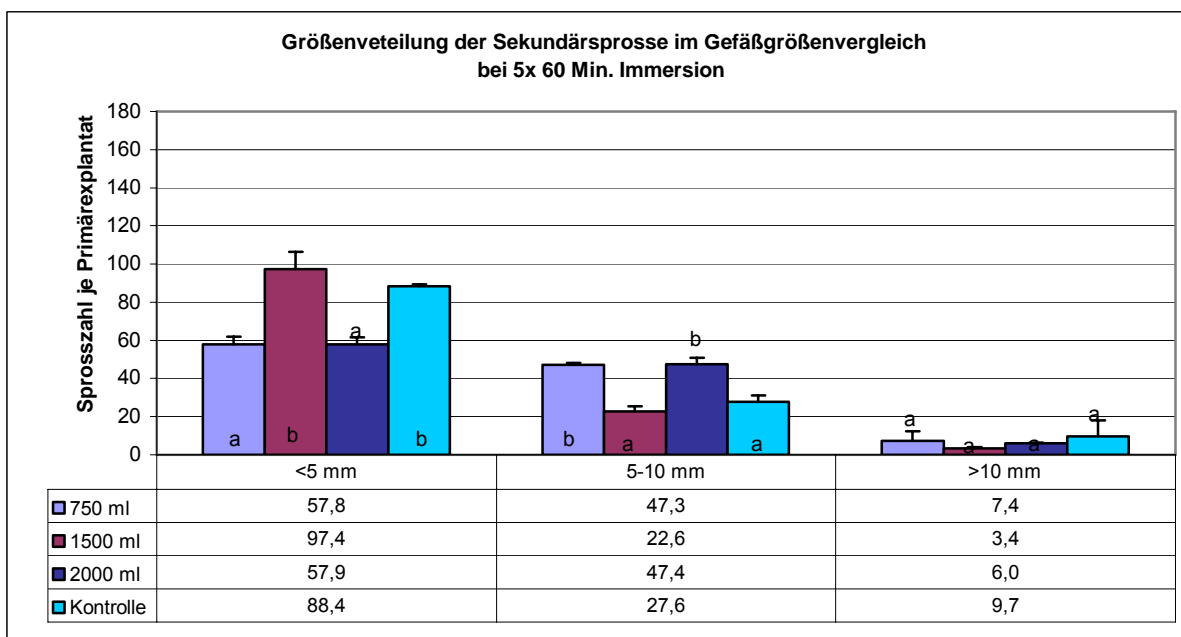


Diagramm 40: Größenverteilung der Sekundärsprosse bei 5 Immersionen täglich für je 60 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.2.1.3. 3 Immersionen täglich für 60 Minuten

Unter diesen Immersionsbedingungen wurden in den Kulturgefäßen mit 1500 ml weniger neue Sprosse gebildet als in der Kontrolle. In keiner der untersuchten Gefäßgrößen wurden signifikant mehr neue Sprosse gefunden, als in der Kontrolle (vergl. Diagramm 41, Seite 34). In Diagramm 42 (Seite 34) kann man aber erkennen, dass in den Kulturgefäßen mit 2000 ml Volumen deutlich mehr Sprosse >5 mm gebildet wurden als in den anderen Gefäßgrößen.

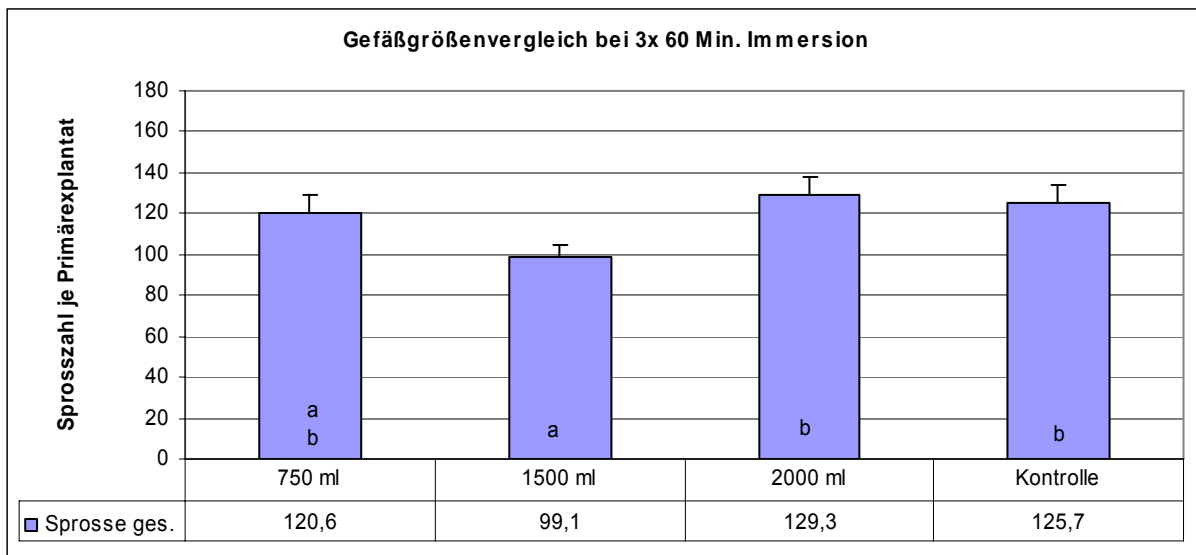


Diagramm 41: Sekundärsprosse bei 3 Immersionen täglich für je 60 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

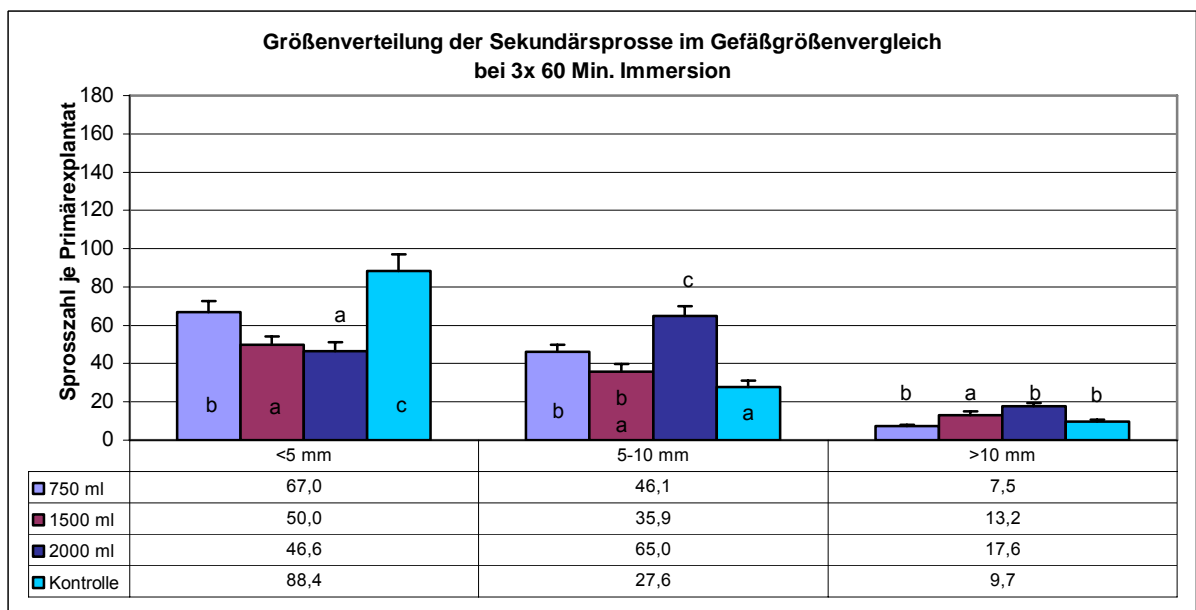


Diagramm 42: Größenverteilung der Sekundärsprosse bei 3 Immersionen täglich für je 60 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant.)

3.2.2. Immersionsdauer von 120 Minuten

In dieser Versuchsreihe wurden bei 7 Immersionen täglich deutlich weniger Sprosse gebildet, als bei 5 oder 3 Immersionen täglich (vergl. Diagramm 43, Seite 35). Diagramm 44 (Seite 35) zeigt, wie sich diese Gesamtsprosszahl aus den Sprossen <5 mm, 5 – 10 mm und >10 mm zusammensetzt.

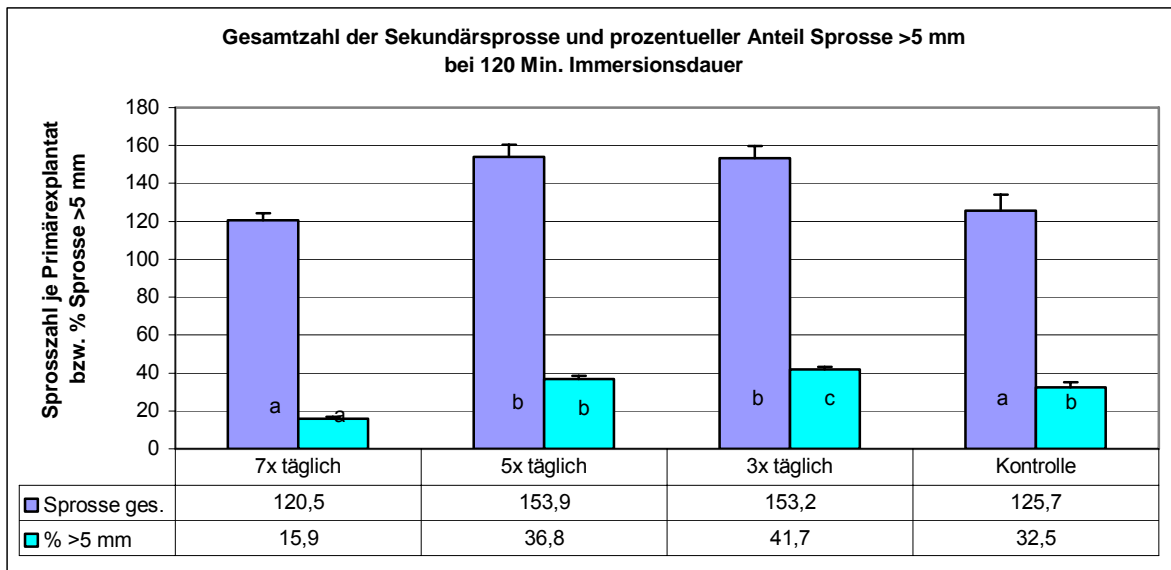


Diagramm 43: Sekundärsprosse je Primärexplantat sowie prozentueller Anteil der Sprosse >5 mm bei 120 Minuten Immersionsdauer bei 7,5 und 3 Immersionen täglich ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgröße (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

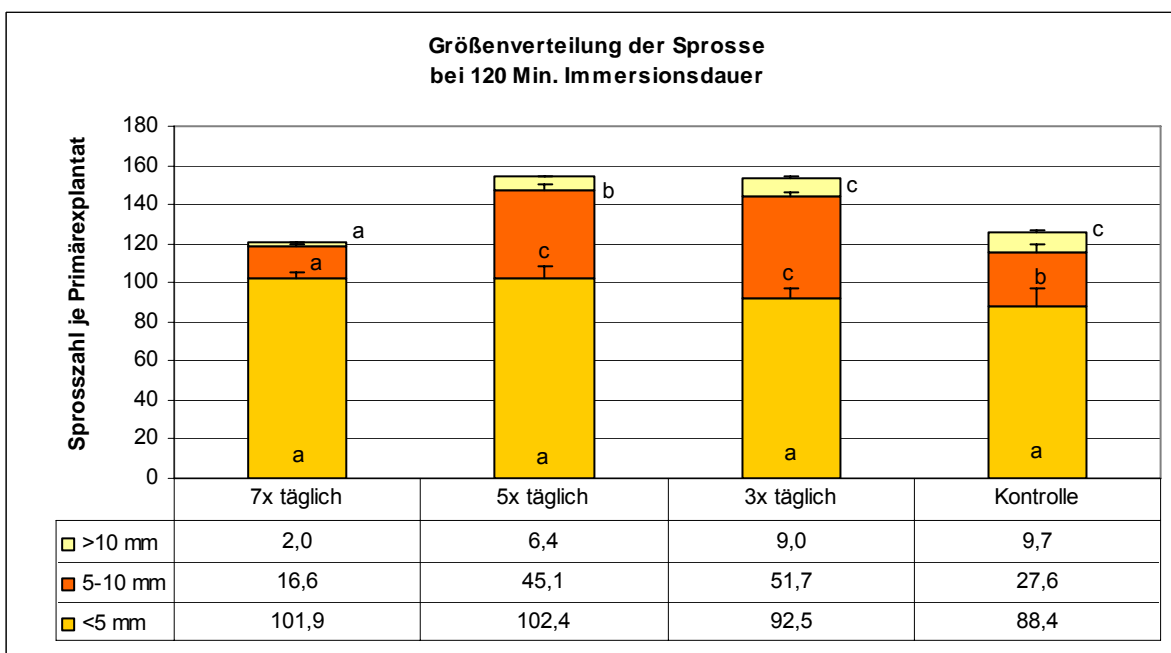


Diagramm 44: Größenverteilung der Sekundärsprosse je Primärexplantat sowie prozentueller Anteil der Sprosse >5 mm bei 120 Minuten Immersionsdauer bei 7,5 und 3 Immersionen täglich ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgröße (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.2.2.1. 7 Immersionen täglich für 120 Minuten

Hinsichtlich der gesamten Anzahl neu gebildeter Sprosse gab es in dieser Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gefäßgrößen (vergl. Diagramm 45). Diagramm 46 (Seite 37) zeigt den Vergleich der einzelnen Sprossgrößengruppen in Bezug auf die unterschiedlichen Gefäßgrößen. Unter diesen Immersionsbedingungen verstärkte sich mit zunehmender Größe der Kulturgefäße die Tendenz zur Bildung kleinerer Sprosse.

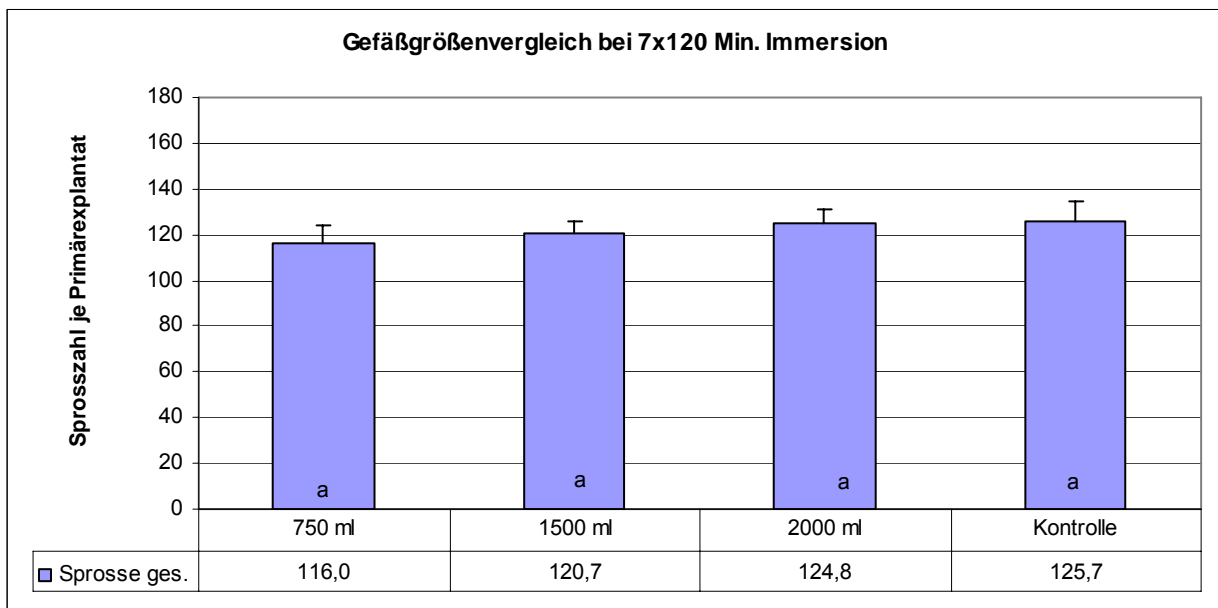


Diagramm 45: Sekundärsprosse bei 7 Immersionen täglich für je 120 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

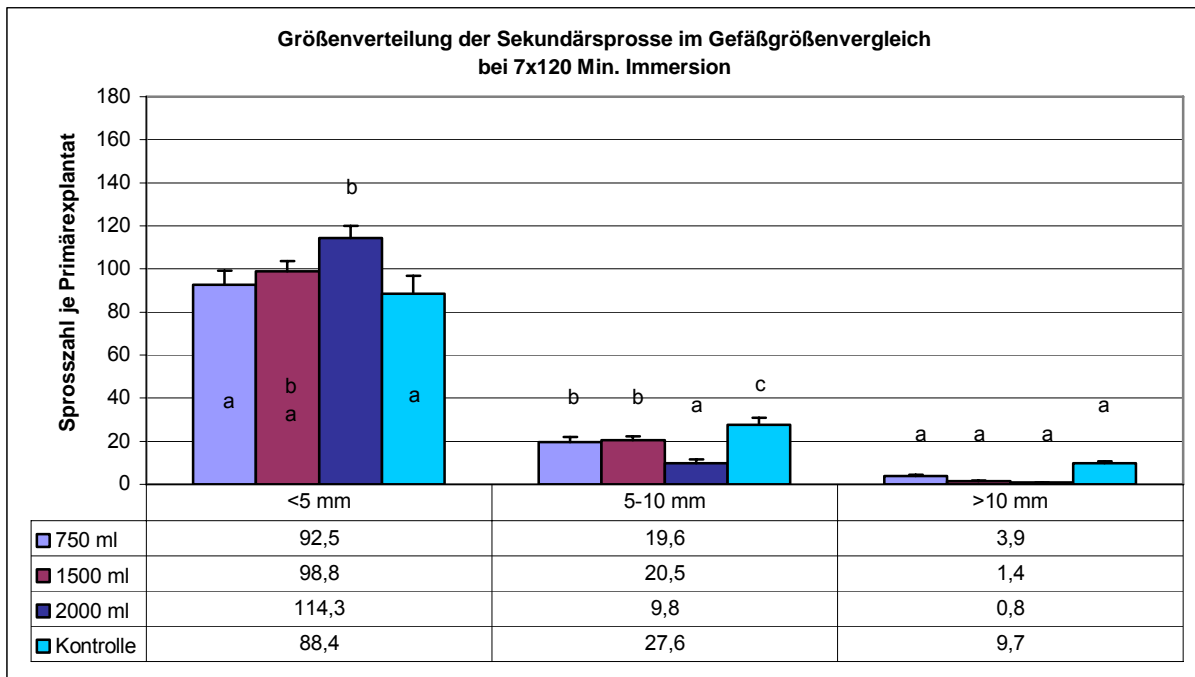


Diagramm 46: Größenverteilung der Sekundärsprosse bei 7 Immersionen täglich für je 120 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.2.2.2. 5 Immersionen täglich für 120 Minuten

Bei 5x 120 Min. Immersion täglich bildeten sich, wie in Diagramm 47 (Seite 38) zu sehen ist, in den Kulturgefäßen mit 2000 ml Volumen deutlich mehr neue Sprosse als in den restlichen Gefäßgrößen. Diagramm 48 (Seite 38) zeigt den Vergleich der einzelnen Sprossgrößengruppen in Bezug auf die unterschiedlichen Gefäßgrößen. Auch bei diesen Immersionsbedingungen wurden mit zunehmender Größe der Kulturgefäße immer kleinere Sprosse gebildet.

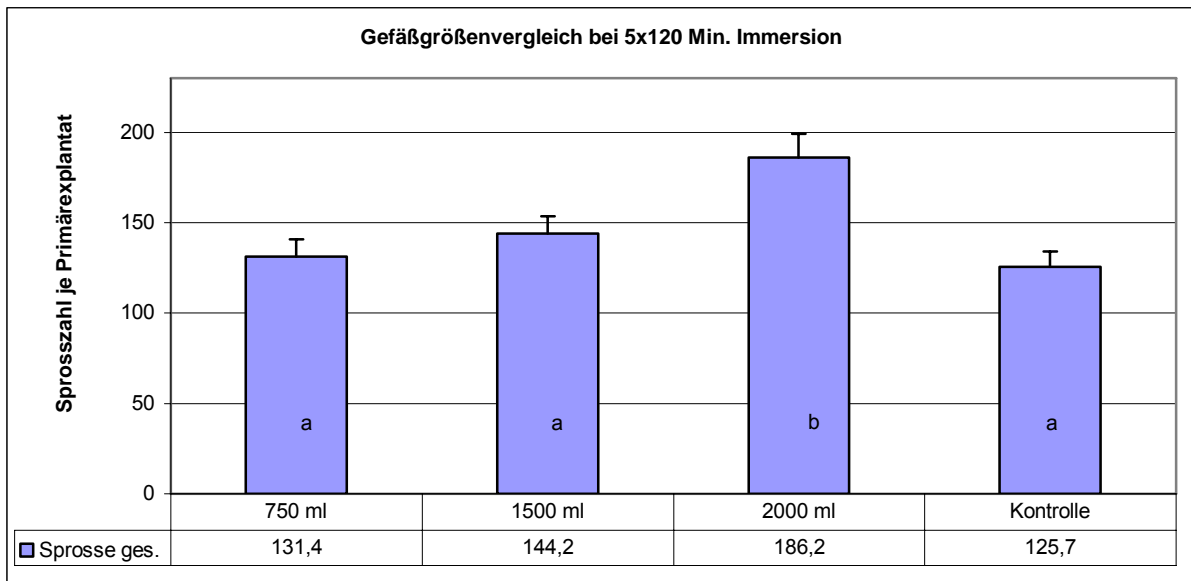


Diagramm 47: Sekundärsprosse bei 5 Immersionen täglich für je 120 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

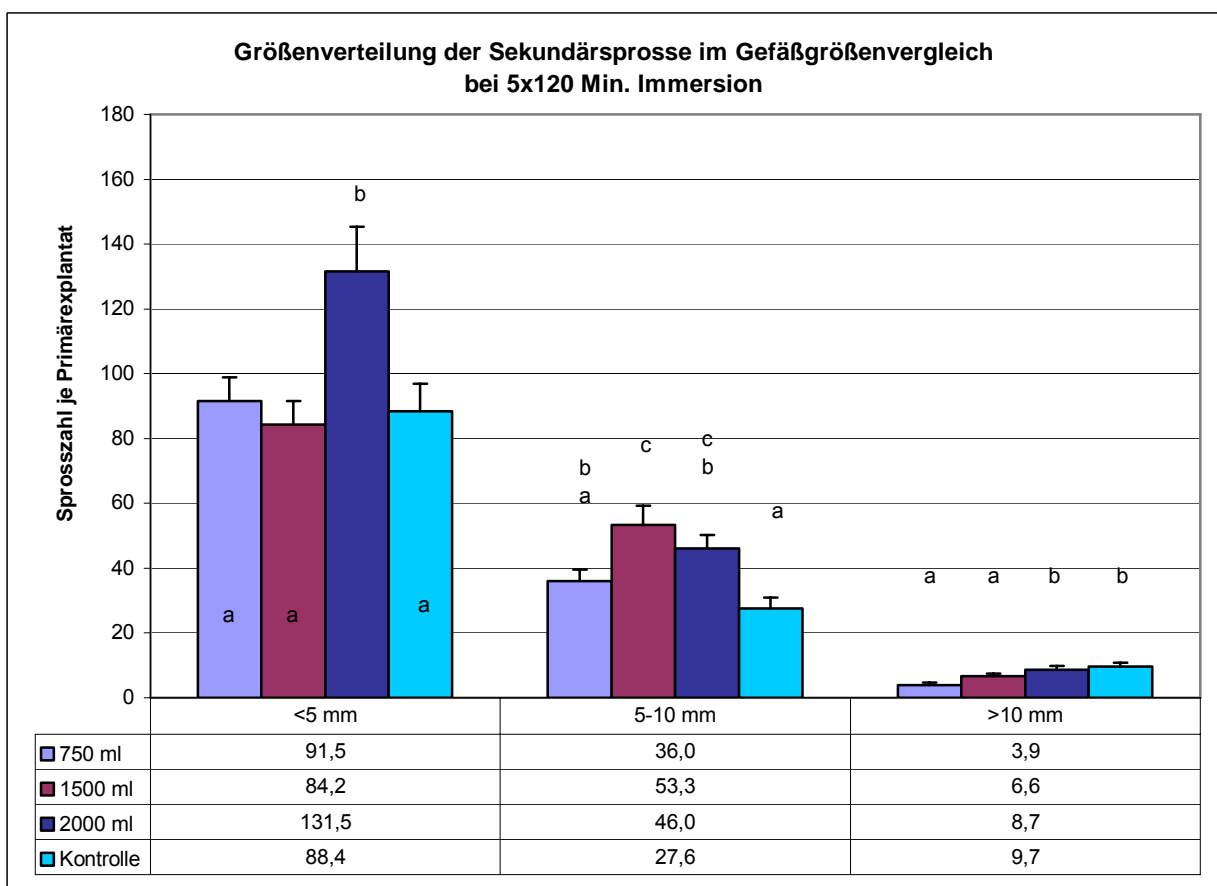


Diagramm 48: Größenverteilung der Sekundärsprosse bei 5 Immersionen täglich für je 120 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.2.2.3. 3 Immersionen täglich für 120 Minuten

In dieser Gruppe wurden bei Einsatz der Kulturgefäße mit 2000 ml Volumen nicht nur deutlich mehr Sprosse als in den übrigen Gefäßgrößen gebildet (vergl. Diagramm 49), sondern es war auch der Anteil an Sprossen >5 mm höher (vergl. Diagramm 50).

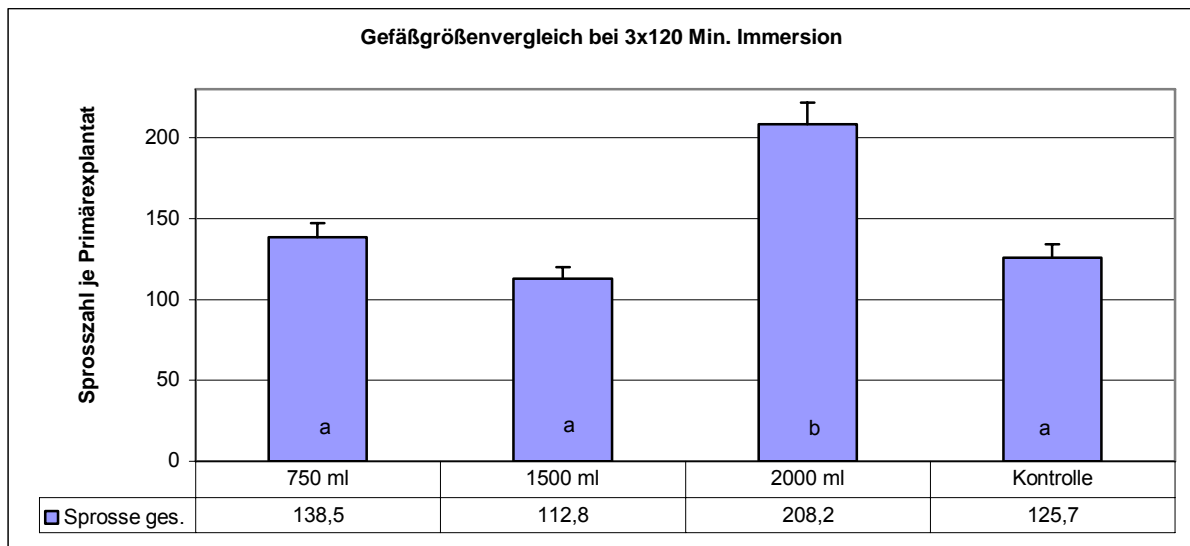


Diagramm 49: Sekundärsprosse bei 3 Immersionen täglich für je 120 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

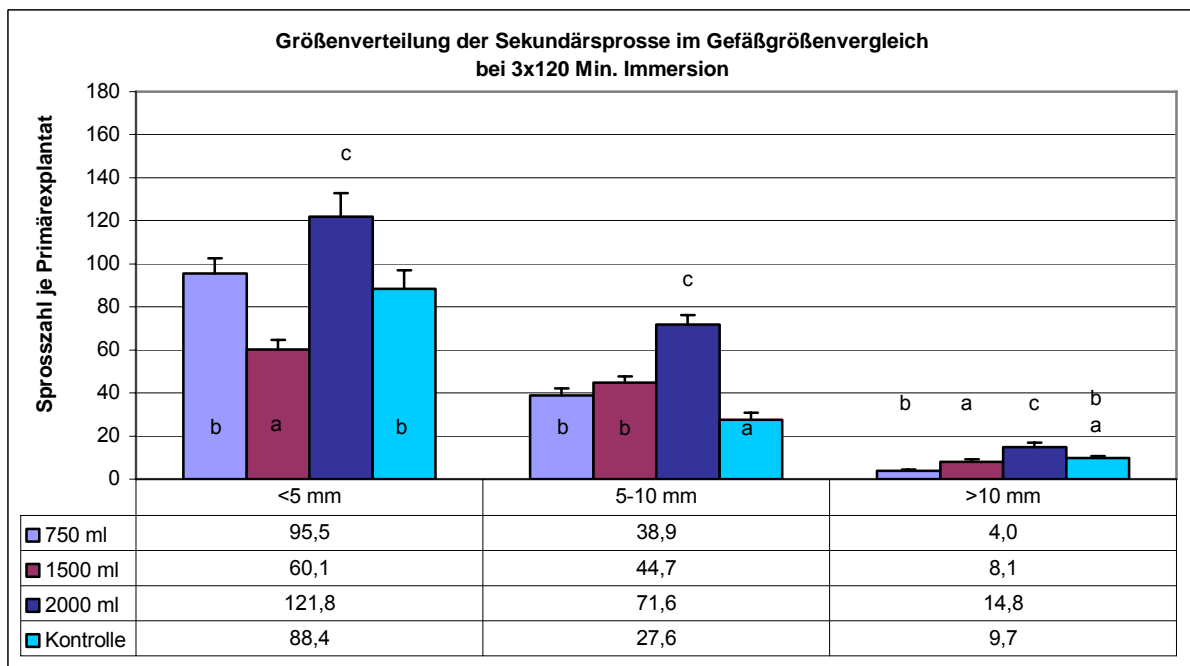


Diagramm 50: Größenverteilung der Sekundärsprosse bei 3 Immersionen täglich für je 120 Minuten in den unterschiedlichen Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Sprossgröße unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

3.3. Einfluss der Immersionsbedingungen auf Frisch- und Trockengewicht

Diagramm 51 zeigt das über die jeweilige Gefäßgröße gemittelte Frisch- und Trockengewicht je Kulturgefäß. Während man beim Frischgewicht einen leichten Anstieg mit der Größe der Gefäße beobachten kann, bleibt das Trockengewicht bei allen Gefäßgrößen mehr oder weniger gleich.

Der Trocknungsverlust lag bei allen Kulturgefäßen in gleichem Ausmaße niedriger als bei der Kontrolle (vergl. Diagramm 52, Seite 41).

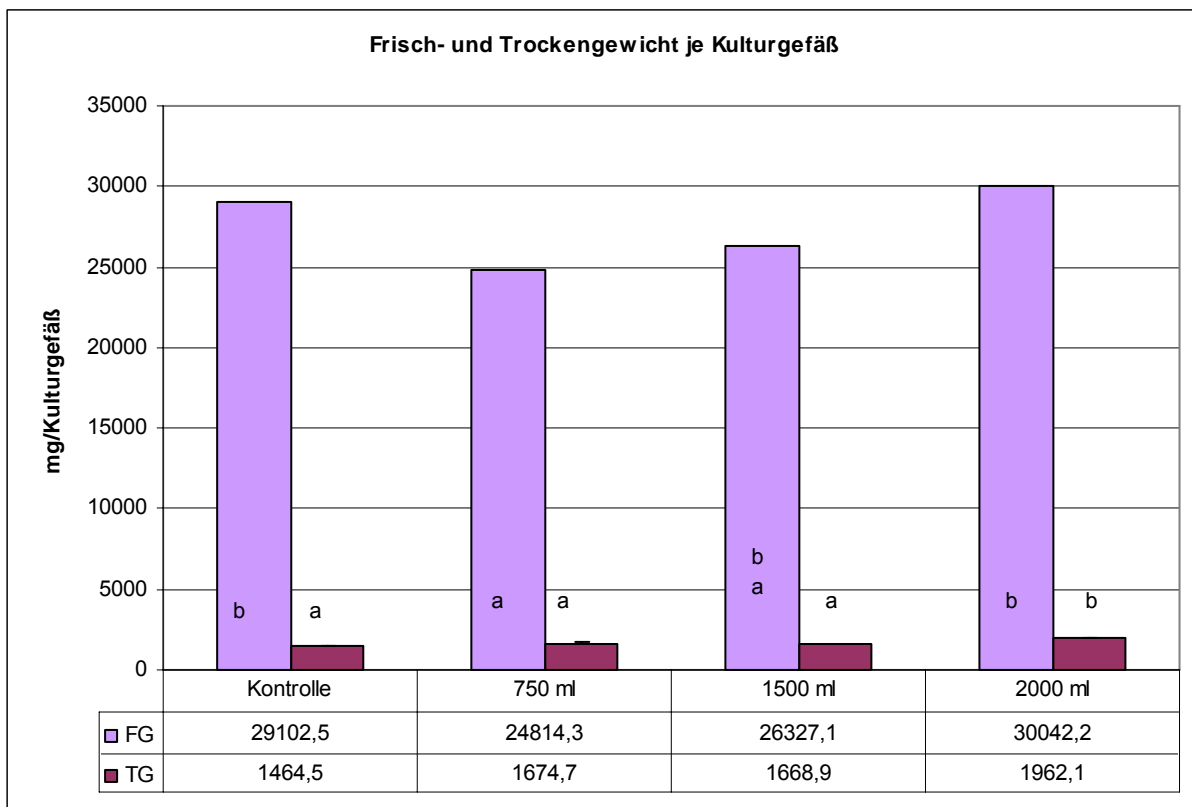


Diagramm 51: Frischgewicht (FG) und Trockengewicht (TG) je Kulturgefäß in den untersuchten Kulturgefäßgrößen ohne Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

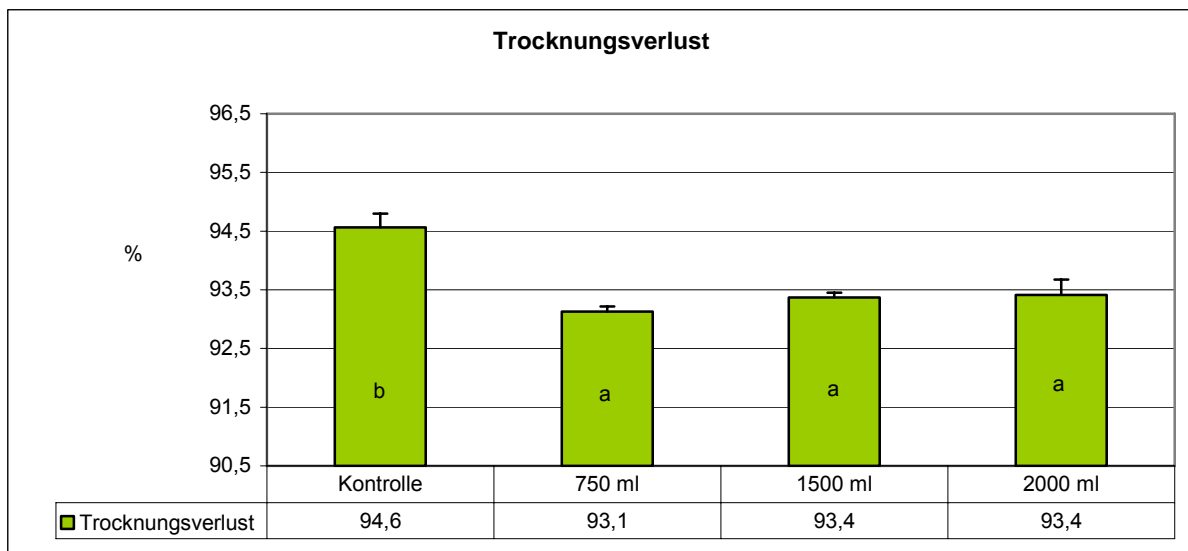


Diagramm 52: Trocknungsverlust in den untersuchten Kulturgefäßgrößen ohne Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

3.3.1. Kulturgefäße mit einem Volumen von 750 ml

Vergleicht man das durchschnittliche Frisch- und Trockengewicht eines Sekundärsprosses in 750ml-Kulturgefäßen bei den unterschiedlichen Immersionsbedingungen, lassen sich keine klaren Tendenzen ablesen. Dieser Trend setzte sich auch bei den Trockengewichten fort (vergl. Diagramm 53, Seite 42). Mit Ausnahme des Kulturgefäßes mit 5x 60 Min. Immersionen, bei welchem der Trocknungsverlust etwa so hoch wie in der Kontrolle war, lag er bei allen anderen deutlich unter der Kontrolle (vergl. Diagramm 54, Seite 42).

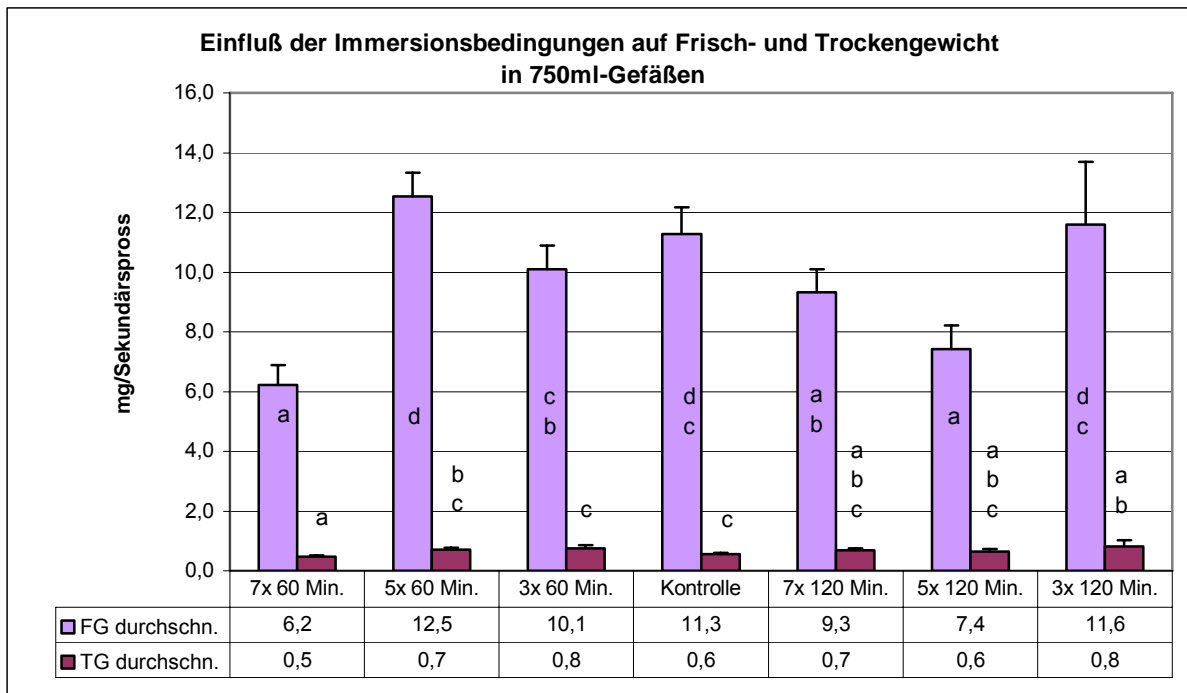


Diagramm 53: Durchschnittliches Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Sekundärspross in 750ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

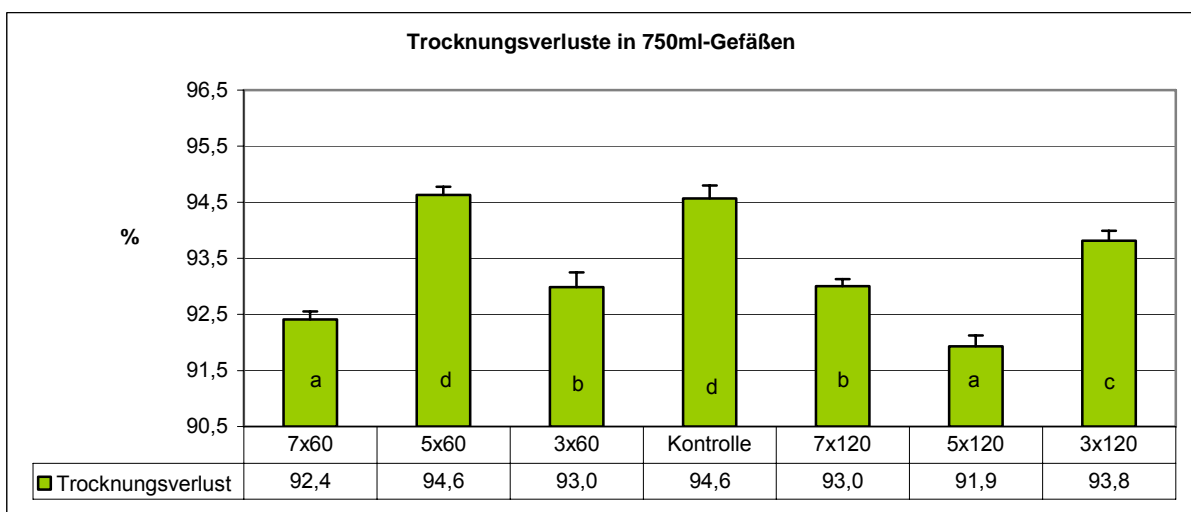


Diagramm 54: Trocknungsverlust in 750ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

3.3.2. Kulturgefäße mit einem Volumen von 1500 ml

Während in der Versuchsreihe mit 60 Minuten Immersionsdauer keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Immersionshäufigkeiten zu beobachten waren, konnte man bei der Versuchsreihe mit 120 Minuten Immersionsdauer eine

leicht ansteigende Tendenz mit abnehmender Immersionsfrequenz sowohl bezüglich des durchschnittlichen Frischgewichtes als auch des durchschnittlichen Trockengewichtes erkennen (vergl. Diagramm 55). Beim Trocknungsverlust ergab sich hingegen bei der Versuchsreihe mit 60 Minuten Immersionsdauer ein leichter Anstieg mit abnehmender Immersionshäufigkeit, während bei der Reihe mit 120 Minuten keine derartigen Tendenzen zu erkennen waren (vergl. Diagramm 56).

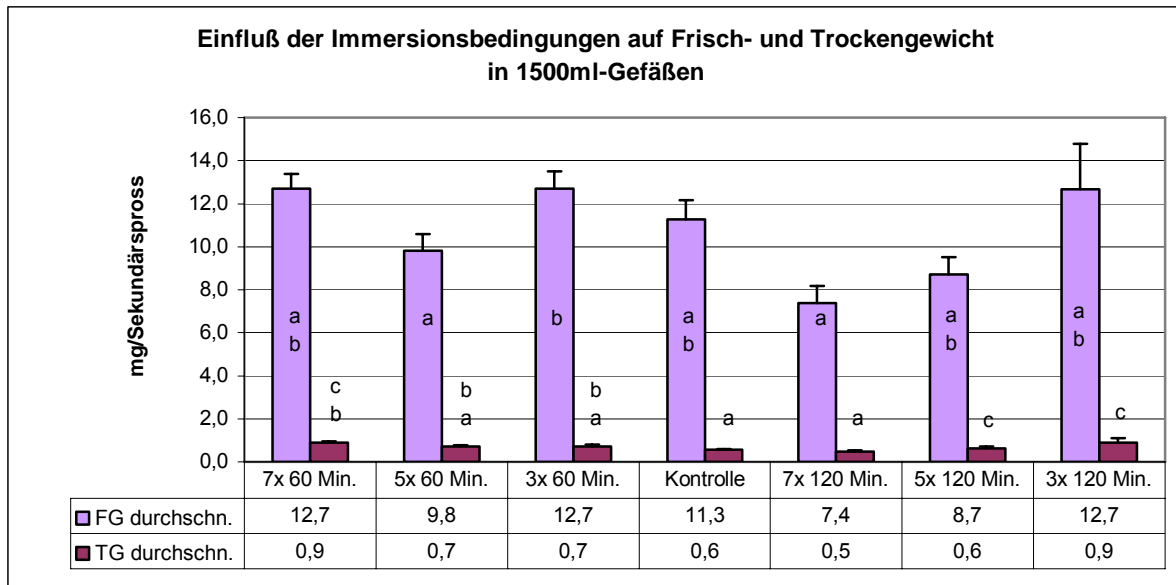


Diagramm 55: Durchschnittliches Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Sekundärspross in 1500ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

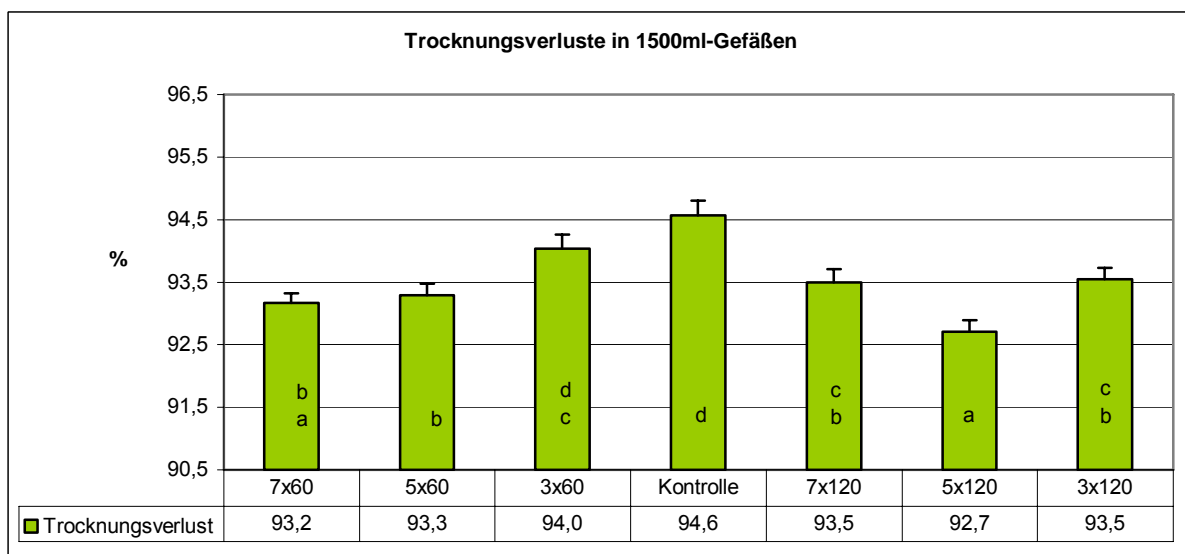


Diagramm 56: Trocknungsverlust in 1500ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

3.3.3. Kulturgefäße mit einem Volumen von 2000 ml

Auch hier waren in der Versuchsreihe mit 60 Minuten Immersionsdauer keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Immersionshäufigkeiten zu beobachten. Hingegen konnte man bei der Versuchsreihe mit 120 Minuten Immersionsdauer bei abnehmender Immersionsfrequenz einen leichten Anstieg sowohl in Bezug auf das durchschnittliche Frischgewicht als auch auf das durchschnittliche Trockengewicht erkennen (vergl. Diagramm 57). Beim Trocknungsverlust fiel in dieser Gefäßgröße besonders die Immersionsbedingung 7x 120 Minuten täglich auf, bei welcher der Trocknungsverlust nicht nur deutlich über dem der übrigen Versuchsanordnungen, sondern auch leicht über dem Wert der Kontrolle lag (vergl. Diagramm 58, Seite 45).

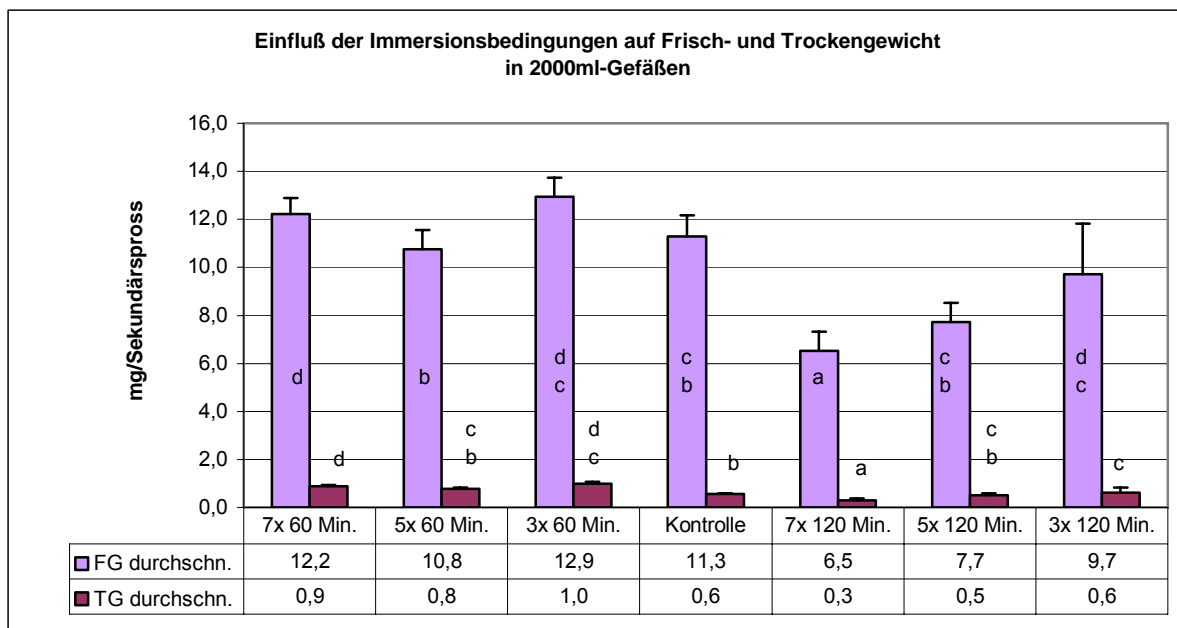


Diagramm 57: Durchschnittliches Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Sekundärprozess in 2000ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

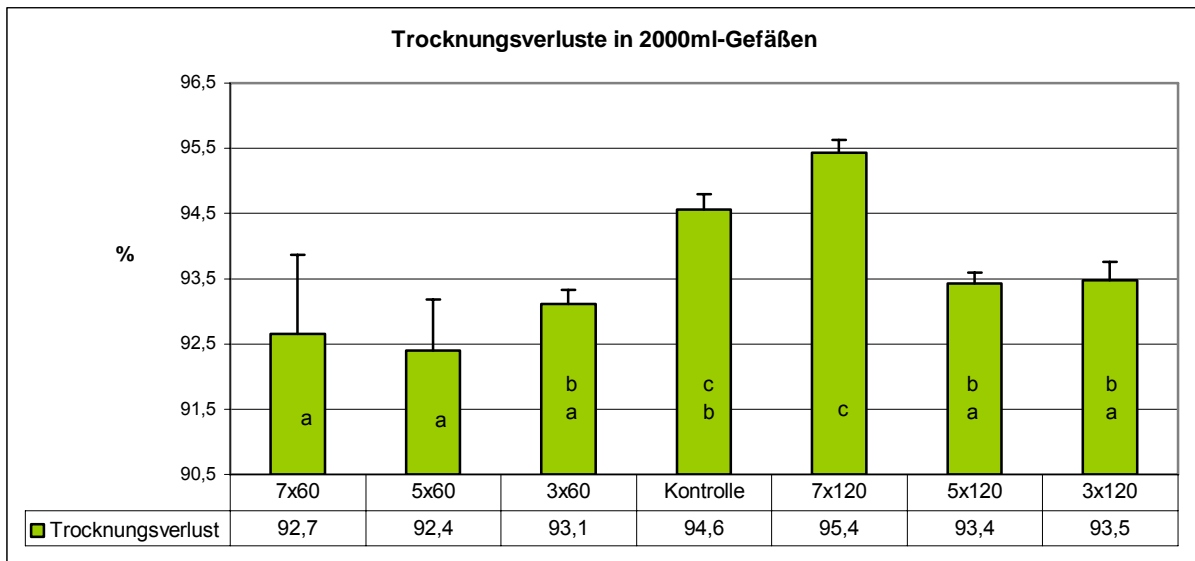


Diagramm 58: Trocknungsverlust in 2000ml-Kulturgefäßen unter Berücksichtigung der Immersionsbedingungen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

3.4. Einfluss der Gefäßgrößen auf Frisch- und Trockengewicht bei unterschiedlichen Immersionsbedingungen

Hinsichtlich des pro Kulturgefäß erzielten Frischgewichts gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsreihen mit 60 und 120 Minuten Immersionsdauer. Beim Trockengewicht lag lediglich die Versuchsreihe mit 60 Minuten Immersionsdauer deutlich über der Kontrolle (vergl. Diagramm 59, Seite 46).

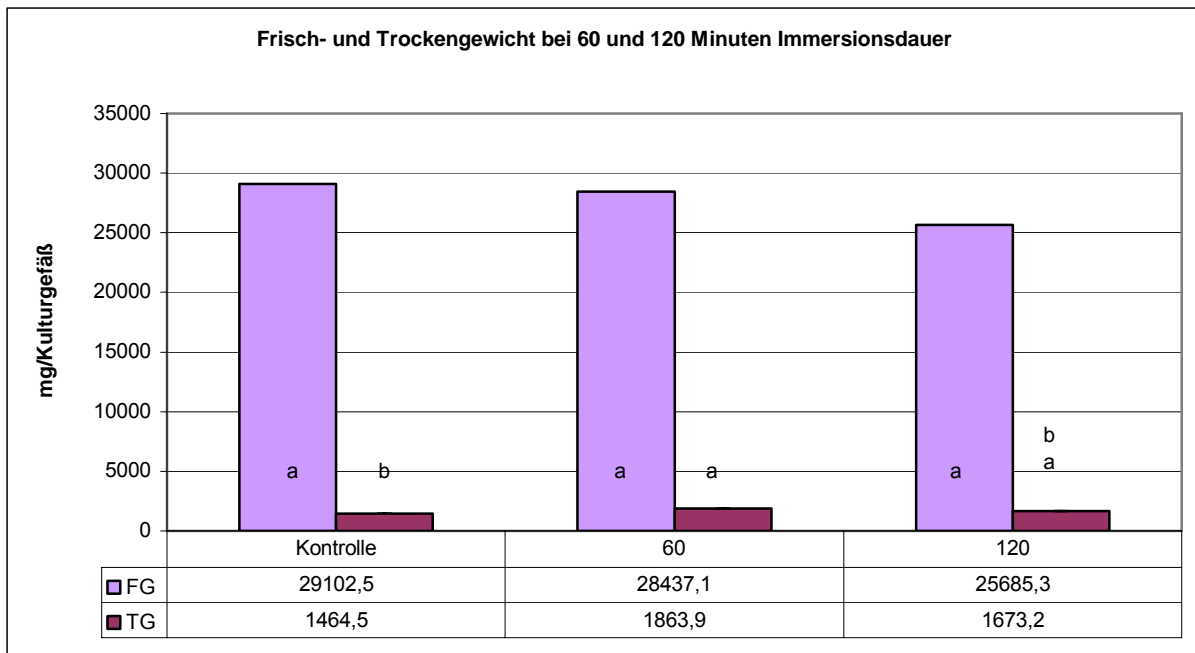


Diagramm 59: Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Kulturgefäß bei 60 und 120 Minuten Immersionsdauer ohne Berücksichtigung der untersuchten Kulturgefäßgrößen und der Immersionshäufigkeit (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

Bezüglich des Trocknungsverlustes unterschieden sich die beiden Versuchsreihen mit 60 und 120 Minuten Immersionsdauer nicht, beide lagen aber deutlich unter dem Wert der Kontrolle (vergl. Diagramm 60).

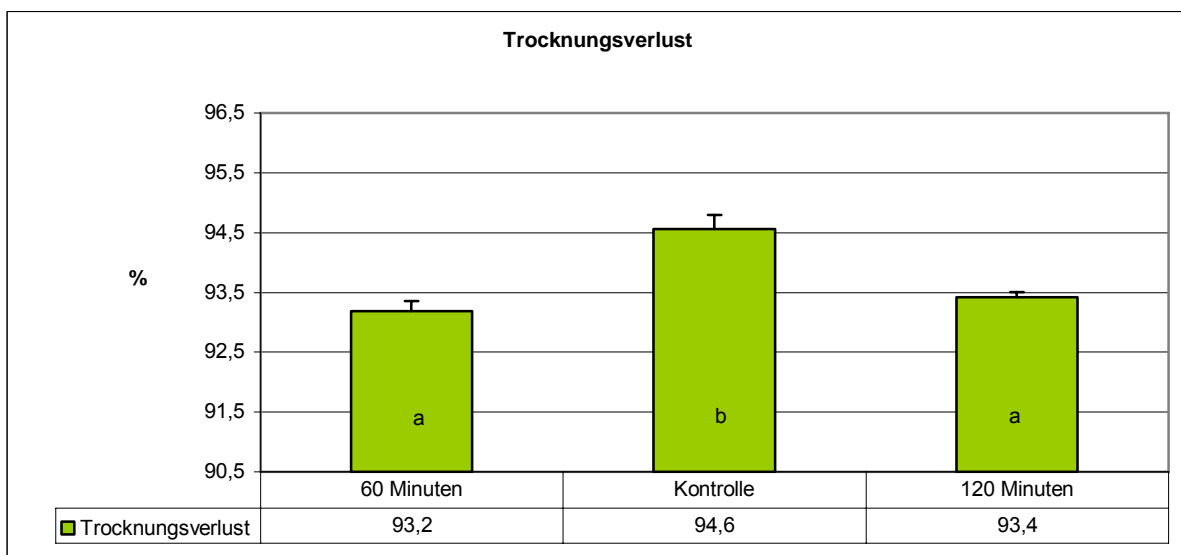


Diagramm 60: Trocknungsverlust bei 60 und 120 Minuten Immersionsdauer ohne Berücksichtigung der untersuchten Kulturgefäßgrößen und der Immersionshäufigkeit (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

Betrachtet man das durchschnittlich in einem Kulturgefäß produzierte Frischgewicht unter Berücksichtigung der Immersionsfrequenz, aber nicht der Immersionsdauer, kann man feststellen, dass dieses mit steigender Immersionshäufigkeit sinkt, wobei in keiner der drei Gruppen ein besseres Ergebnis als bei der Kontrolle erreicht wurde. Die pro Kulturgefäß produzierten Trockengewichte lagen bei 3 und 5 Immersionen täglich deutlich über dem der Kontrolle (vergl. Diagramm 61). Die Trocknungsverluste lagen in allen drei Gruppen unter dem Wert der Kontrolle (vergl. Diagramm 62, Seite 48).

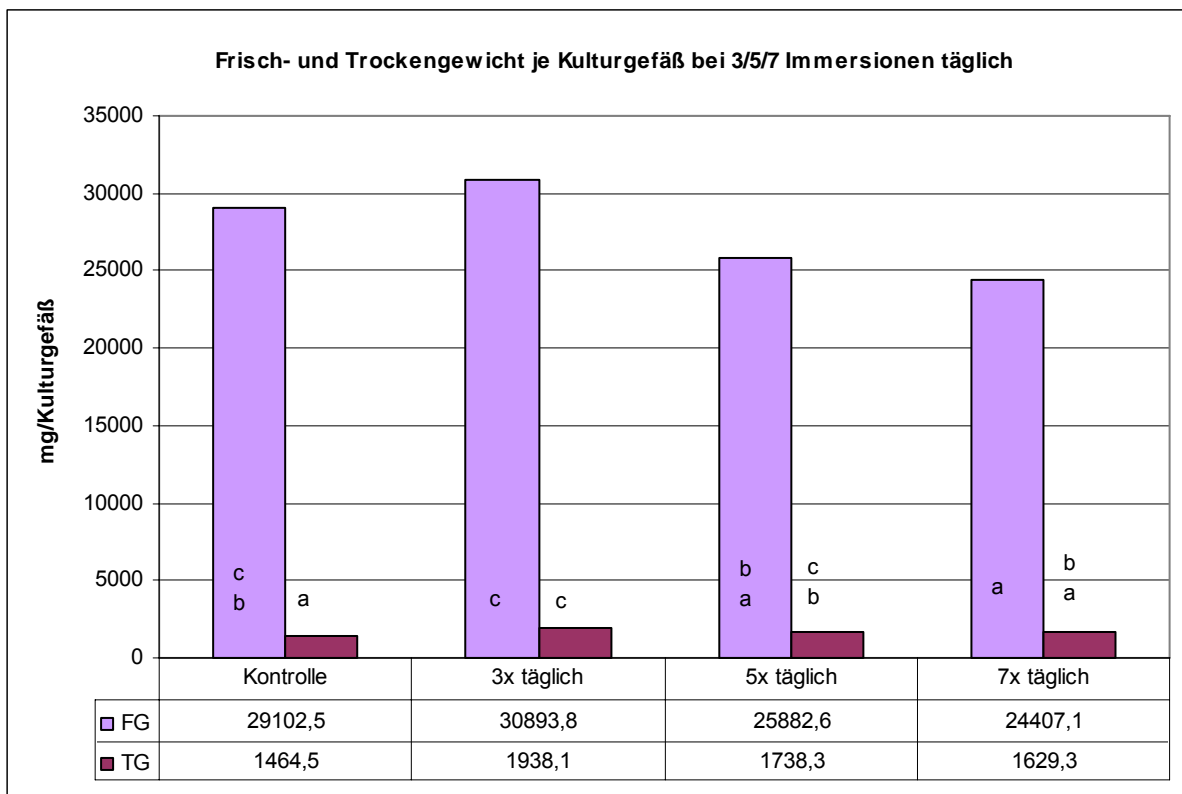


Diagramm 61: Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Kulturgefäß bei 3, 5 und 7 Immersionen täglich ohne Berücksichtigung der untersuchten Kulturgefäßgrößen und der Immersionsdauer (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

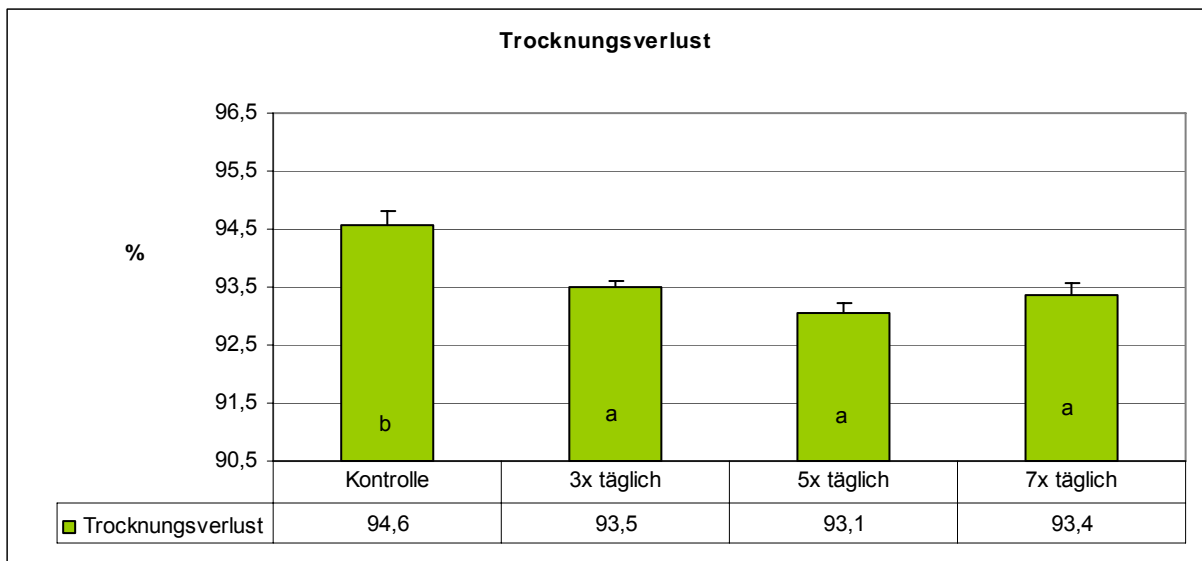


Diagramm 62: Trocknungsverlust bei 3, 5 und 7 Immersionen täglich, ohne Berücksichtigung der untersuchten Kulturgefäßgrößen und der Immersionsdauer (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit demselben Buchstaben nicht signifikant).

Betrachtet man das durchschnittlich aus einem Kulturgefäß erhaltene Frisch- und Trockengewicht wie in Diagramm 63 (Seite 49) unter Berücksichtigung der Immersionsfrequenz und der Immersionsdauer, fällt auf, wie unterschiedlich sich die beiden Versuchsreihen mit 60 und 120 Minuten Immersionsdauer hinsichtlich der Immersionsfrequenz verhielten. Während bei 60 Minuten Immersionsdauer Frisch- und Trockengewicht nicht signifikant schwankten, konnte man bei der Reihe mit 120 Minuten einen Anstieg mit sinkender Immersionsfrequenz sowohl beim Frisch- als auch beim Trockengewicht feststellen.

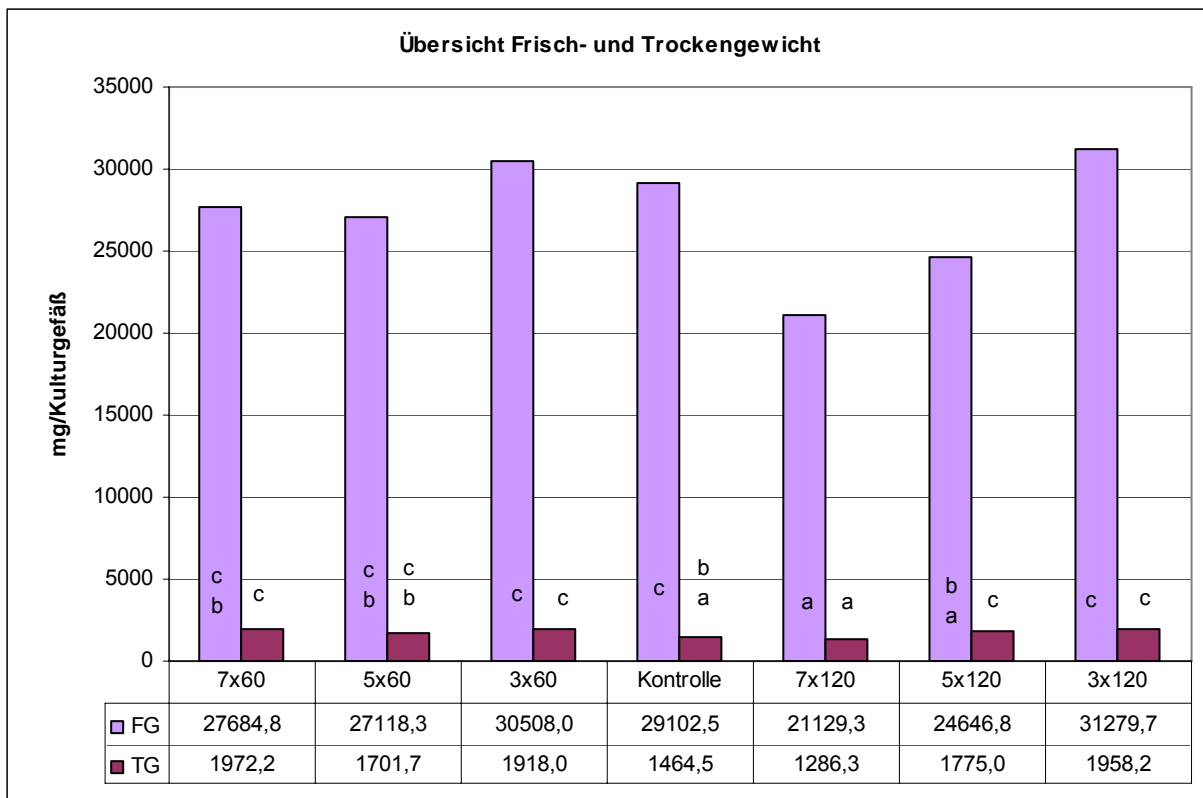


Diagramm 63: Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Kulturgefäß bei den untersuchten Immersionsbedingungen ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

Nachfolgend soll kurz auf die bei jeder einzelnen untersuchten Immersionsbedingung erzielten Ergebnisse ohne Berücksichtigung der Größe der Kulturgefäße eingegangen werden. Wie in den Diagrammen 64 bis 75 auf den Folgeseiten im Einzelnen zu sehen ist, lassen sich keine Tendenzen ableiten, die über alle Immersionsbedingungen gültig wären. Alleine beim Trocknungsverlust lässt sich sagen, dass er bei allen Immersionsbedingungen in fast allen Gefäßgrößen unter dem Wert bei der Kontrolle liegt.

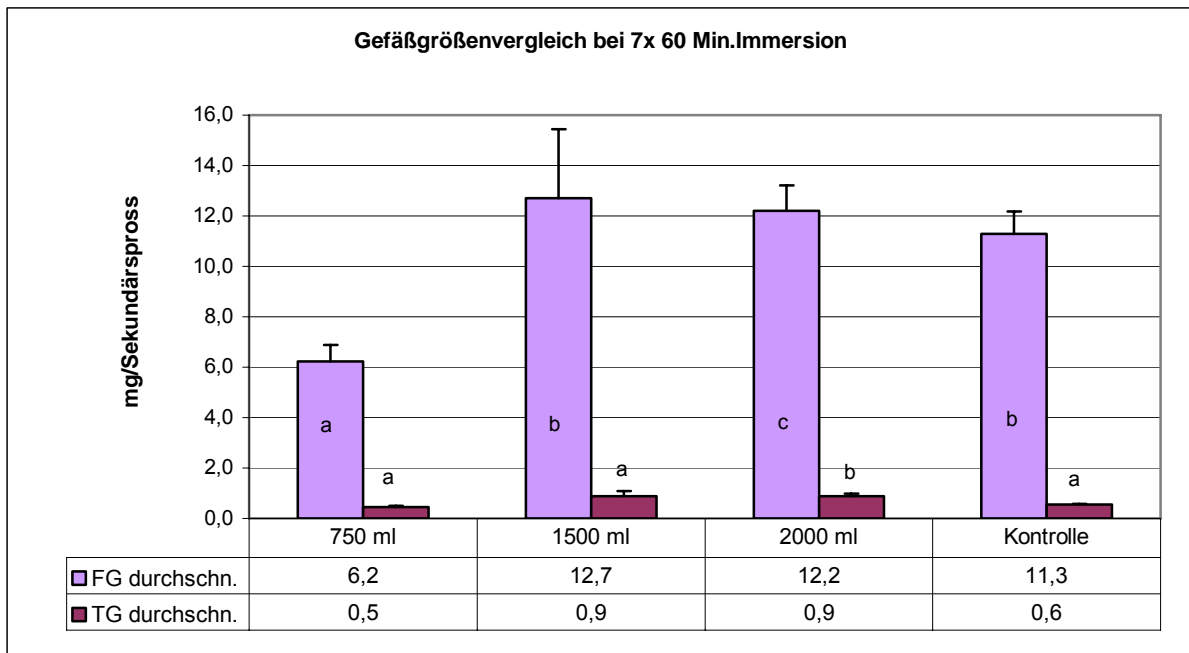


Diagramm 64: Durchschnittliches Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Sekundärspross bei 7 Immersionen täglich für je 60 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

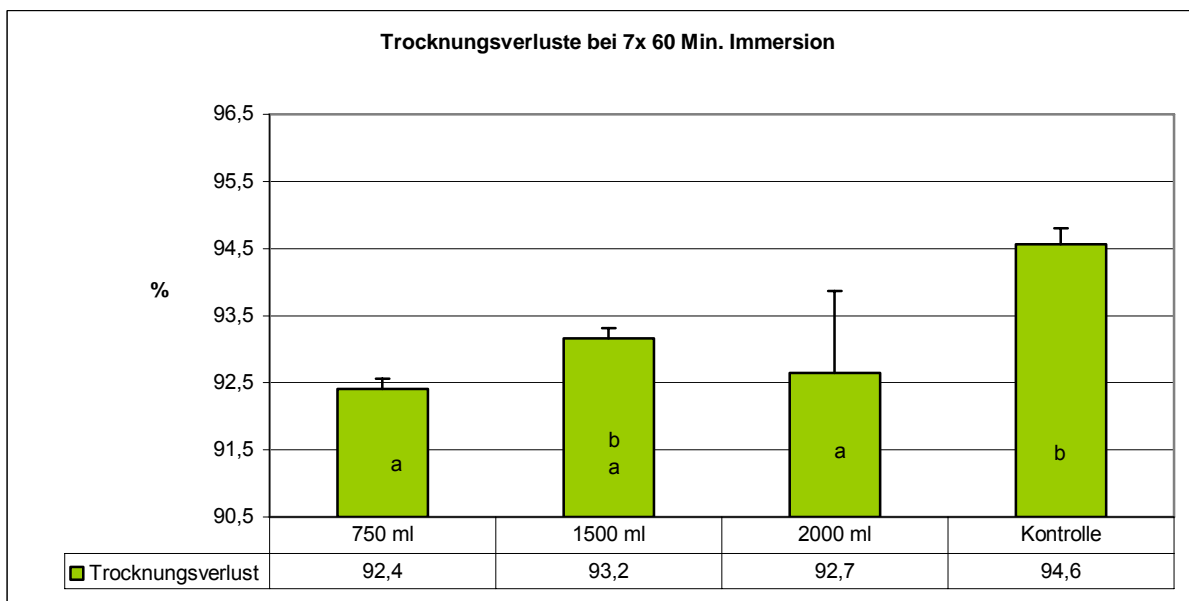


Diagramm 65: Trocknungsverlust bei 7 Immersionen täglich für je 60 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (Werte mit dem selben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

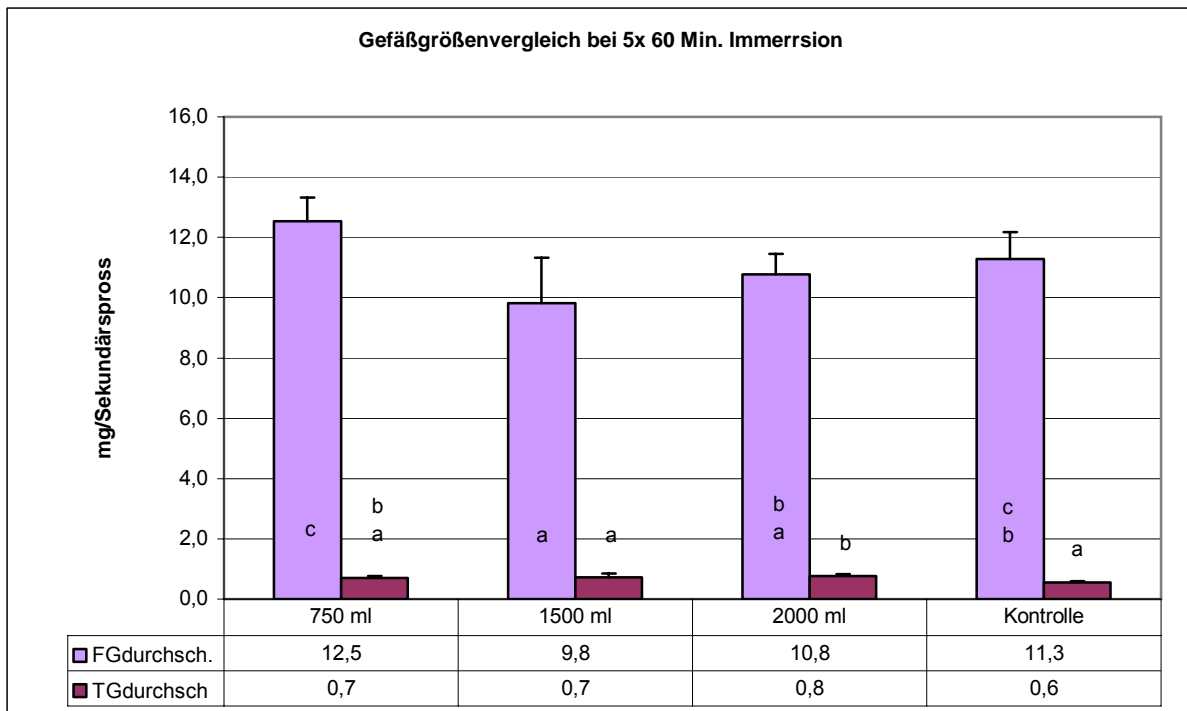


Diagramm 66: Durchschnittliches Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Sekundärspross bei 5 Immersionen täglich für je 60 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

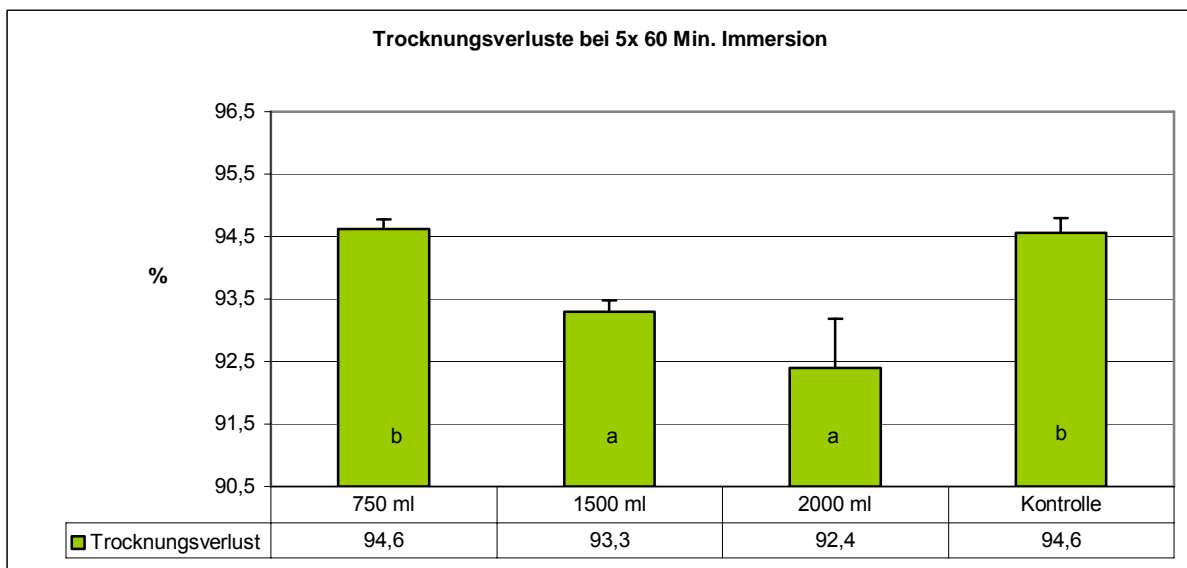


Diagramm 67: Trocknungsverlust bei 5 Immersionen täglich für je 60 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

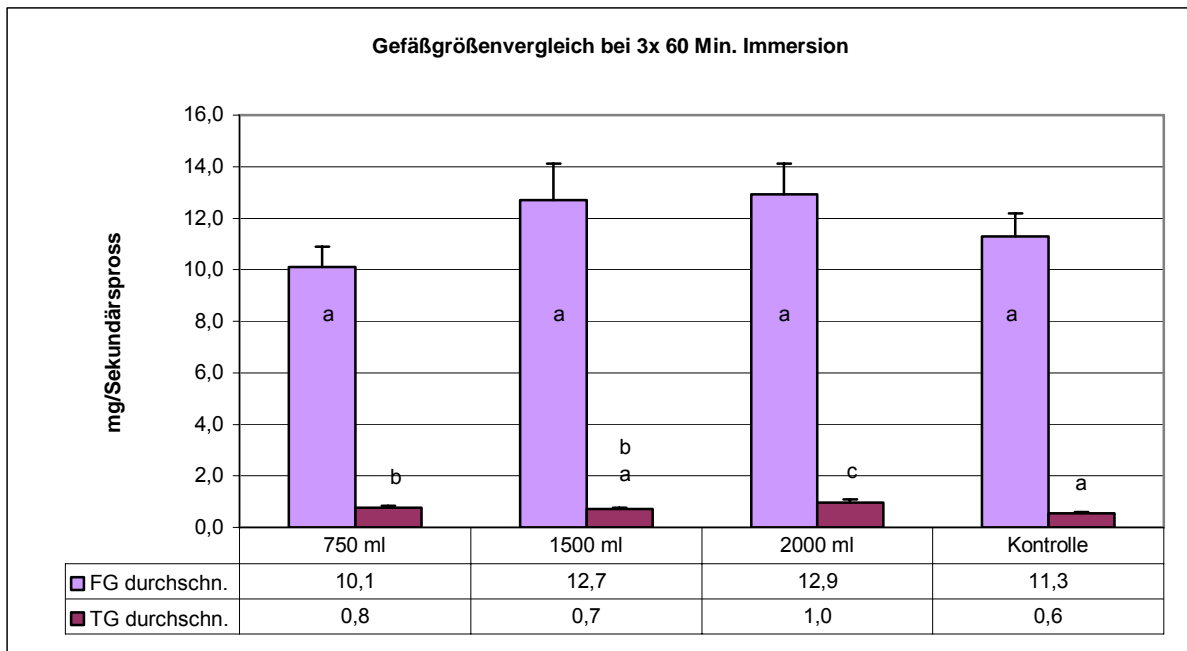


Diagramm 68: Durchschnittliches Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Sekundärspross bei 3 Immersionen täglich für je 60 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

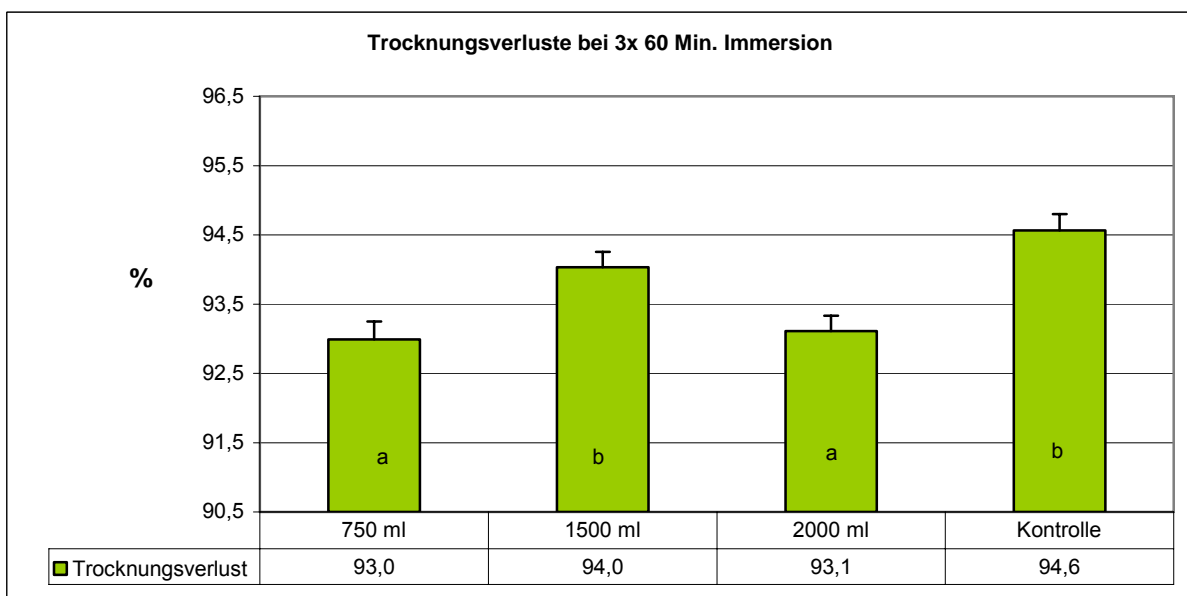


Diagramm 69: Trocknungsverlust bei 3 Immersionen täglich für je 60 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

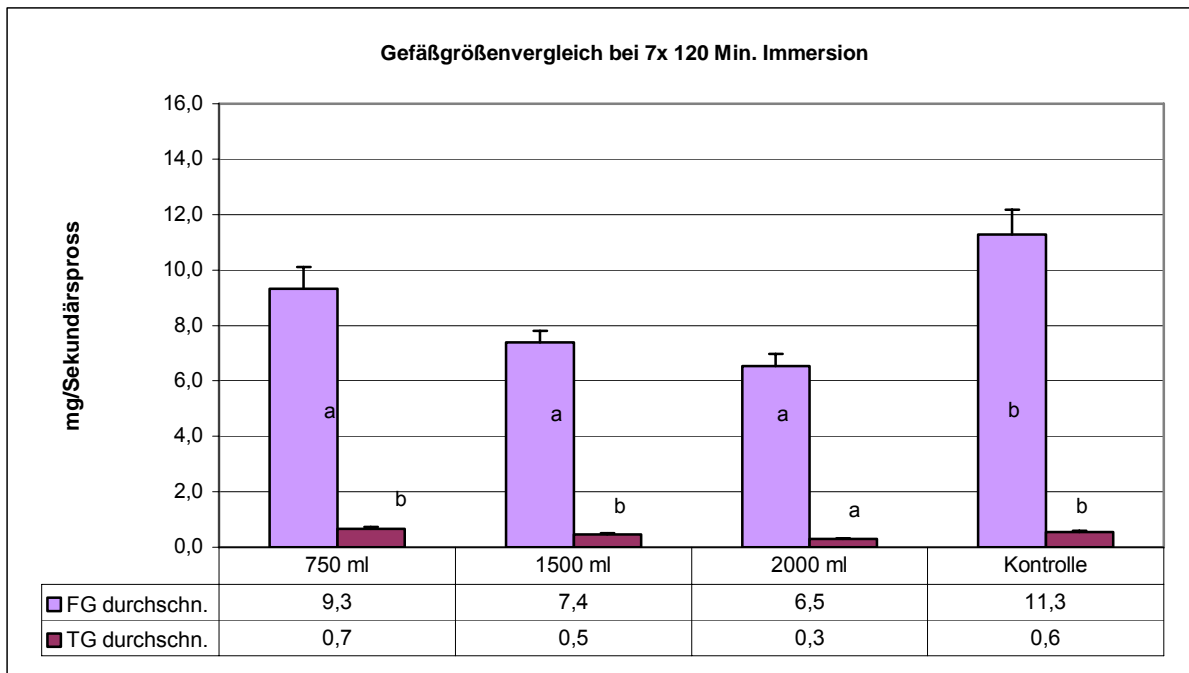


Diagramm 70: Durchschnittliches Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Sekundärspross bei 7 Immersionen täglich für je 120 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

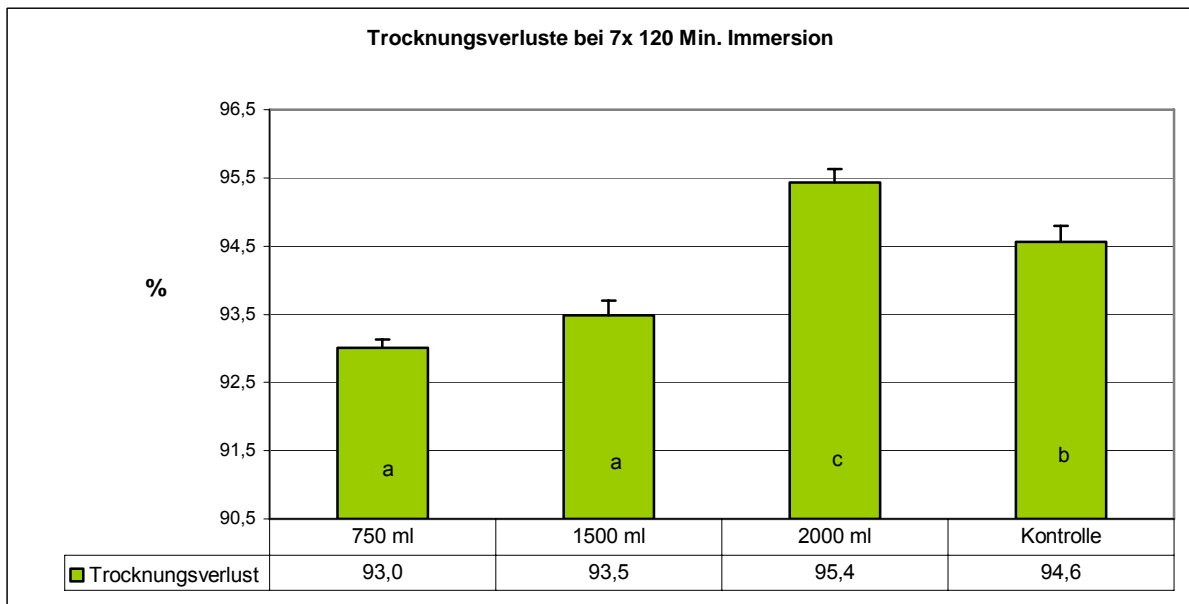


Diagramm 71: Trocknungsverlust bei 7 Immersionen täglich für je 120 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

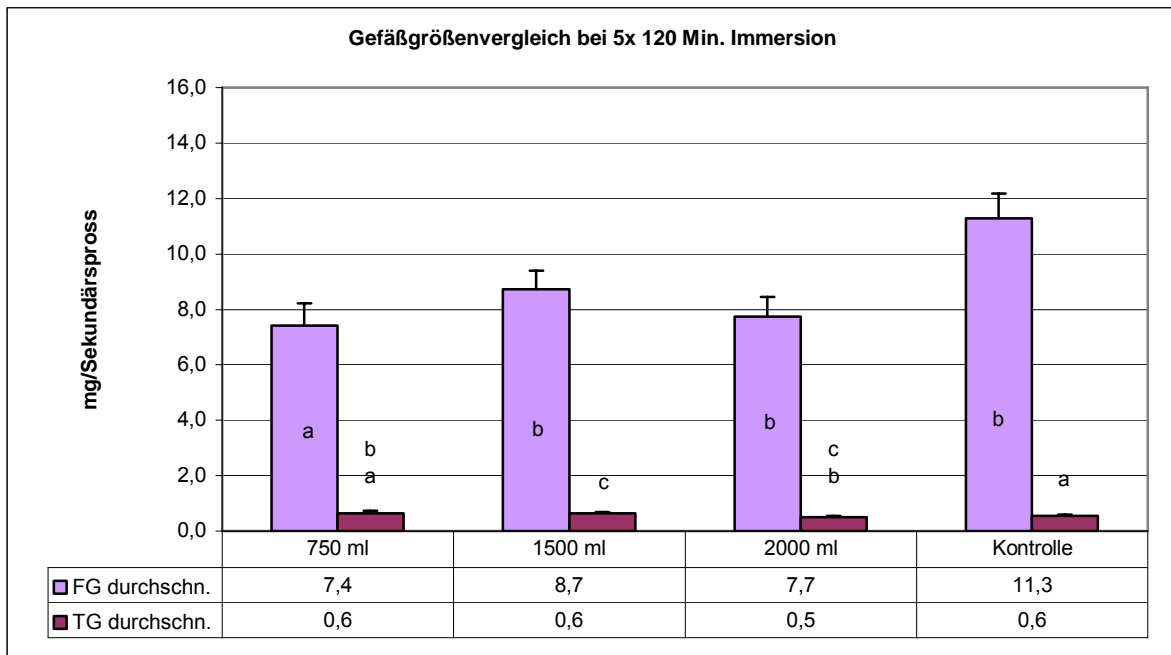


Diagramm 72: Durchschnittliches Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Sekundärspross bei 5 Immersionen täglich für je 120 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

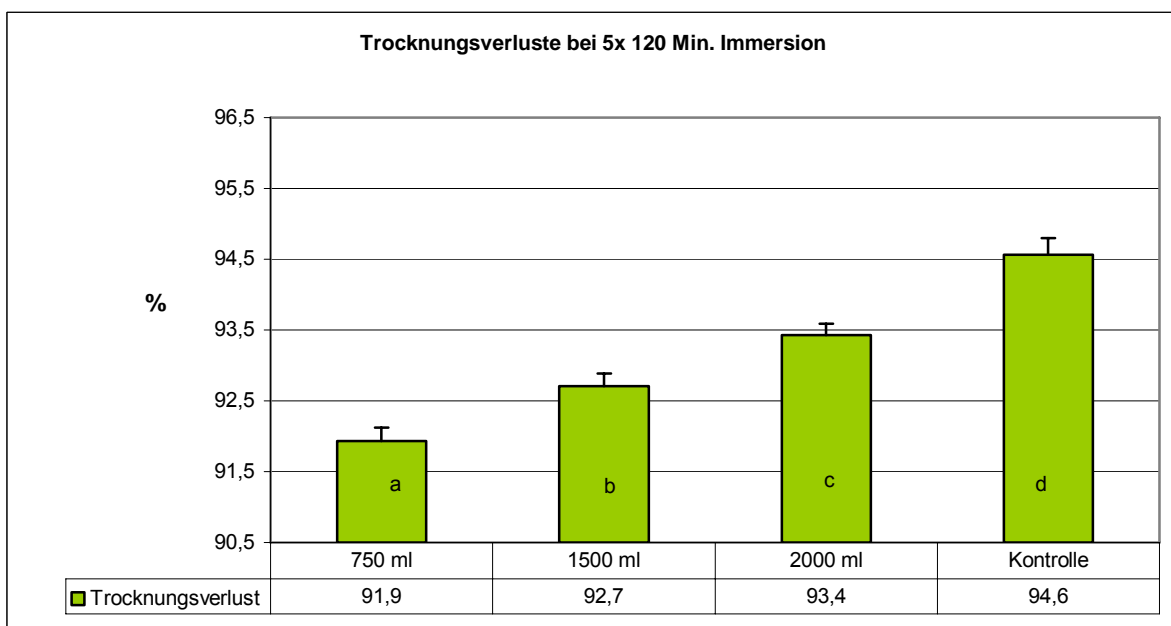


Diagramm 73: Trocknungsverlust bei 5 Immersionen täglich für je 120 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

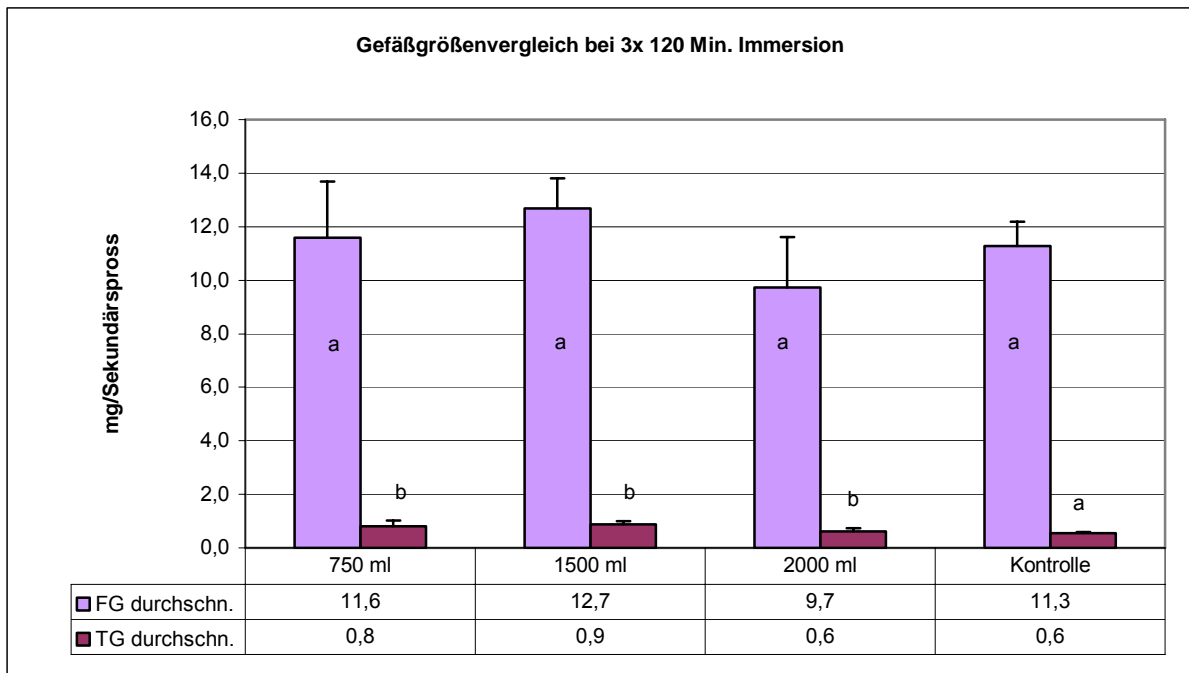


Diagramm 74: Durchschnittliches Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) je Sekundärspross bei 3 Immersionen täglich für je 120 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (innerhalb einer Datenreihe unterscheiden sich Werte mit dem selben Buchstaben nicht signifikant).

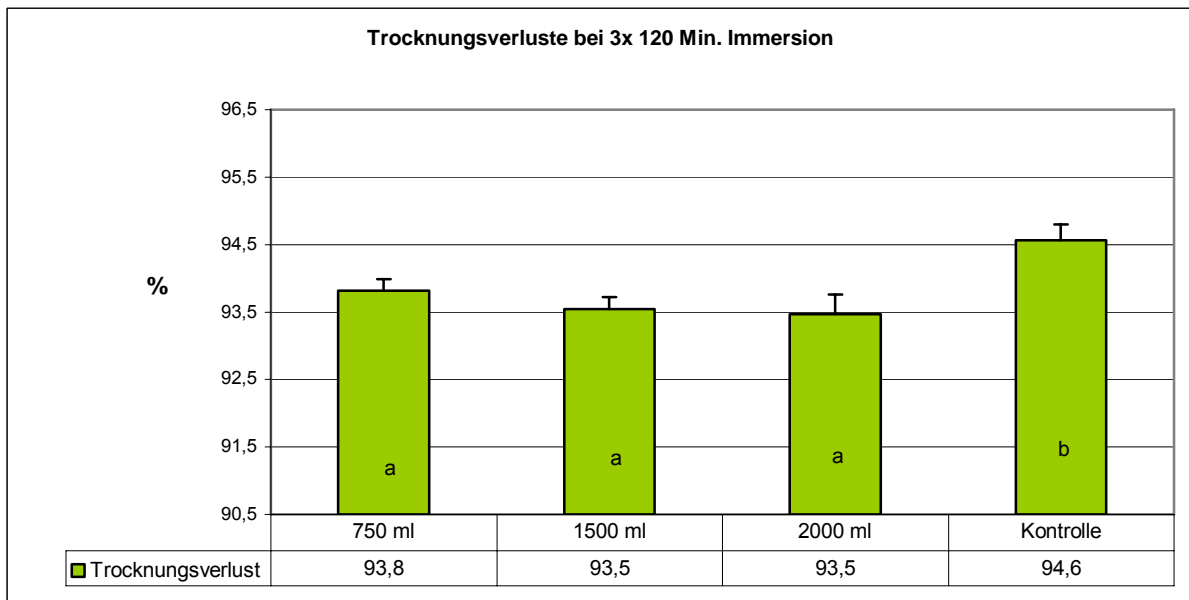


Diagramm 75: Trocknungsverlust bei 3 Immersionen täglich für je 120 Minuten ohne Berücksichtigung der Kulturgefäßgrößen (Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant).

4. Diskussion

TI-Systeme haben im Vergleich zur Kultivierung auf festen Nährböden und zur Submerskultur mehrere Vorteile. Auf festen Nährböden kann es vor allem bei längerer Kulturdauer zu einem Konzentrationsgefälle der Nährstoffe im Medium kommen. Zudem ist die Aufnahme von Nährstoffen auf jene Pflanzenteile beschränkt, die mit dem Medium in Kontakt stehen. Bei Submerskultur stehen zwar alle Pflanzenteile mit dem Nährmedium in Kontakt und Nährstoffgradienten sind kaum vorstellbar, dafür besteht hier durch den ständigen Kontakt mit flüssigem Nährmedium eine erhöhte Gefahr der Hyperhydratisierung, wodurch gewonnenes Pflanzenmaterial unbrauchbar würde. Ein wesentlicher Vorteil flüssiger Nährmedien besteht in der einfacheren Handhabbarkeit. Nicht nur sind viele Schritte der Nährlösungsherstellung durch den Verzicht auf Gelbildner einfacher und daher kostengünstiger, es entfallen auch die Kosten für Gelbildner selbst. Darüber hinaus sind diese Gelbildner nicht völlig inert und können das Wachstum in pflanzlichen Gewebekulturen beeinflussen (Etienne und Berthouly, 2002).

Bei TI-Systemen kommt die weniger arbeitsintensive Methode mit flüssigem Nährmedium zum Einsatz und durch den zeitlich begrenzten Kontakt zwischen Nährlösung und Pflanzenmaterial kann man Hyperhydratisierung vermeiden, ohne auf die oben genannten Vorteile flüssiger Nährmedien verzichten zu müssen.

Der wichtigste Vorteil von TI-Systemen ist aber wohl die Senkung der Kosten. Lorenzo et al. (1998) errechneten zum Beispiel für die Vermehrung von *Saccharum* spp. eine Reduktion der Kosten um 46% im Vergleich zum Standardverfahren auf festen Medien.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde ein Twin-Flask-System eingesetzt, das nach dem gleichen Prinzip aufgebaut war wie schon bei Escalona et al. (1998) beschrieben, welches aber nach Akita und Takayama (1994) um die forcierte Belüftung erweitert wurde, um so den Gasraum in den Kulturgefäßen austauschen zu können. Dadurch wurde es möglich etwaige, auf das Wachstum hemmend wirkende gasförmige Metaboliten entfernen zu können und das pflanzliche Material mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Wurde das pneumatische System des TI-Systems von Kongbangkerd und Wawrosch (2003) noch manuell betrieben, verfügte das

Departement für Pharmakognosie Wien seit der Untersuchung von Ruprecht (2005) bereits über eine automatisierte, pneumatische Anlage.

Die Ausbeute und Qualität des pflanzlichen Materials, welches aus TI-Systemen gewonnen werden kann, wird von vielen Parametern beeinflusst. Als wichtigste Faktoren, welche man gezielt ändern kann, gelten Immersionsdauer und –frequenz, gefolgt von Nährmedienvolumen und Kulturgefäßgröße (Etienne und Berthouly, 2002). Während das eingesetzte Volumen an Nährlösung je Primärexplantat bei dieser Arbeit immer 10 ml betrug, variierten Immersionsdauer (60 und 120 Minuten), Immersionsfrequenz (3, 5 und 7 mal täglich) und Größe der Kulturgefäße (750, 1500 und 2000 ml). Bei den Arbeiten von Dorfer (2007) und Buol-Wischenau (2008) wurden die selben Gefäßgrößen eingesetzt, aber andere Immersionsbedingungen untersucht. Buol-Wischenau (2008) führte die Versuchsreihen mit 1 und 5 Immersionen täglich für 5, 10 oder 20 Minuten durch. Dorfer (2007) untersuchte die Reihen mit 3 und 7 Immersionen täglich für 10, 20 und 30 Minuten und zusätzlich 1x tgl. 30 Minuten und 5x tgl. 30 Minuten.

Vergleicht man die im Rahmen dieser Diplomarbeit untersuchten, verschiedenen Kulturgefäßgrößen, ohne die weiteren Immersionsbedingungen zu berücksichtigen, hoben sich lediglich die Gefäße mit einem Volumen von 2000 ml ab (vergl. Diagramm 1, Seite 7). Während bei der Versuchsreihe mit 60 Min. Immersionszeit keine deutliche Verbesserung bezüglich der Sprosszahl zu erkennen war (vergl. Diagramm 37, Seite 30; Diagramm 39, Seite 32 und Diagramm 41, Seite 33), stechen bei der Reihe mit 120 Minuten Immersionszeit besonders die Immersionshäufigkeiten von 5 und 3 Immersionen täglich deutlich positiv hervor (vergl. Diagramm 47, Seite 37 und Diagramm 49, Seite 38). Bei 5x täglich 120 Min. Immersion war diese verbesserte Ausbeute vor allem auf einen Anstieg der Sekundärsprosszahl in der Größenkategorie <5 mm zurückzuführen (vergl. Diagramm 48, Seite 37), bei 3x tgl. 120 Min. war zusätzlich noch ein Anstieg bei den Sekundärsprossen von 5-10 mm und bei >10 mm zu verzeichnen (vergl. Diagramm 50, Seite 38). Darüber hinaus lag bei den Gefäßen mit 2000 ml Volumen der Anteil der Sekundärsprosse mit >5 mm mit 45,3 % deutlich über jenen bei 750 und 1500 ml (vergl. Diagramm 1, Seite 7).

Hinsichtlich der Immersionsfrequenzen war bei der Versuchsreihe mit 60 Min. Immersionsdauer die Frequenz von 7 Immersionen täglich bezüglich der Gesamtzahl gebildeter Sekundärsprosse je Primärexplantat signifikant besser als bei 3 und 5 Immersionen, aber bei 3 Immersionen täglich wurden nicht nur prozentuell mehr Sprosse >5 mm gebildet, sondern auch in absoluten Zahlenwerten (vergl. Diagramme 35 und 36, Seite 29). Bei der Versuchsreihe mit 120 Min. erweisen sich bezüglich der Gesamtzahl Sekundärsprosse je Primärspross die Frequenzen von 3 und 5 Immersionen tägl. als signifikant besser geeignet als bei 7 Immersionen täglich, wobei bei 3 Immersionen täglich nicht nur prozentuell mehr Sprosse mit >5 mm gebildet wurden, sondern auch in absoluten Zahlen (vergl. Diagramm 43, Seite 34 und Diagramm 44, Seite 34).

In keiner der Versuchsanordnungen lag die Ausbeute an Frischgewicht je Kulturgefäß signifikant über der Kontrolle, lediglich bei Einsatz der Gefäße mit 2000 ml reichten die Werte an die Kontrollgruppe heran (vergl. Diagramm 51, Seite 39). In der Kontrolle, welche in Submerskultur kultiviert wurde, war der Trocknungsverlust erwartungsgemäß am höchsten (vergl. Diagramm 52, Seite 40), sodass die Trockengewichtsausbeute bei den 2000ml-Gefäßen deutlich über der der Kontrolle lag (Diagramm 51, Seite 39). Ohne Berücksichtigung der restlichen Faktoren liesen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Frisch- und Trockengewicht zwischen den Reihen mit 60 und 120 Minuten Immersionsdauer feststellen (Diagramm 59, Seite 45). Hinsichtlich der Immersionshäufigkeit zeigen sich die Versuchsreihen mit 3 Immersionen täglich am effizientesten. Hier lagen die Werte in absoluten Zahlen beim FG leicht, beim TG sogar signifikant über der Kontrolle, während bei 7 Immersionen täglich sowohl beim FG, als auch beim TG die schlechtesten Ergebnisse erzielt wurden (Diagramm 61, Seite 46). Besonders deutlich traten diese Unterschiede bei der Immersionsdauer von 120 Minuten zu Tage (Diagramm 63, Seite 48). Hier war die Abnahme der FG- und TG-Ausbeute pro Kulturgefäß mit steigender Immersionshäufigkeit besonders gut zu erkennen.

Die Zahl der aus Blattachsen der Primärsprosse gebildeten Sekundärsprosse lag in allen drei Gefäßgrößen weit unter der Anzahl der aus den Blättern der Primärexplantate gebildeten Adventivsprosse (Diagramm 4, Seite 9; Diagramm 14, Seite 15 und Diagramm 24, Seite 21). Trotzdem sollen diese blatt- und

sprossbürtigen Sekundärsprosse hier getrennt betrachtet werden. Die sprossbürtigen Sekundärsprosse lagen zahlenmäßig zwar weit hinter den blattbürtigen zurück, zeichneten sich aber durch eine Reihe interessanter Vorteile aus. Während bei den aus Blättern entstandenen Sprossen die Größengruppe von <5 mm sowohl bei 750, 1500 als auch 2000 ml bei fast allen Immersionsbedingungen überwog, stellten bei den sprossbürtigen Sekundärsprossen die Sprosse mit >5 mm, bis auf bei 1500 ml und 7x 120 Min. und bei 2000 ml und 7x 120 Min., die Mehrheit (Diagramm 6, Seite 10; Diagramm 16, Seite 16 und Diagramm 26, Seite 22). Hier überwog, bis auf wenige Ausnahmen vor allem bei der Gefäßgröße von 1500 ml, sogar die Gruppe von >10 mm. Durch den Einsatz entsprechender Explantate ließe sich die Ausbeute bei den sprossbürtigen Sprossen sicher noch erhöhen. Aufgrund der Beobachtungen beim Auswerten obiger Versuchsreihen scheinen Primärsprosse mit längeren Sprossachsen, also möglichst vielen Nodien und möglichst langen Internodien, viel versprechend. Darüber hinaus könnte man bei den Explantaten Platz einsparen, indem man die Blätter kurz unterhalb der Blattspreite entfernen würde und nur die Blattstiele am Explantat verblieben. Auf diese Weise wäre eine deutliche Erhöhung der Ausbeute pro Kulturgefäß denkbar.

Insbesondere für Anwendungen, bei denen großer Wert auf genetisch einheitliches Pflanzenmaterial gelegt wird, hätten sprossbürtige Sprosse gegenüber blattbürtigen Sprossen einen Vorteil. Bei blattbürtigen Sprossen erfolgt die Sprossung über hormonell induzierte Adventivsprosse direkt aus den Blättern der Primärexplantate. Hier ist das Auftreten von somaklonaler Variation zwar wesentlich unwahrscheinlicher als etwa bei Adventivprossbildung über Kallusgewebe, aber dennoch eher möglich als bei einer Sprossung aus bereits bestehendem meristematischem Gewebe wie in den Blattachsen der Primärexplantate (George, 1996).

Beim Vergleich der vorliegenden Arbeit mit denen von Dorfer (2007) und Buol-Wischenau (2008) fällt auf, dass dort in der **Kontrollgruppe** die Sprossgröße mit 5-10 mm Größe überwog, während in unseren Untersuchungen die Sprosse mit <5 mm eindeutig die Mehrzahl der neu gebildeten Sprosse darstellen. Betrug das Verhältnis von Sekundärsprossen mit <5 mm zu Sekundärsprossen mit >5 mm bei Buol-Wischenau (2008), bei der der experimentelle Teil der Arbeit zeitlich vor Dorfer

(2007) durchgeführt wurde, noch 1:5,6; sank dieses Verhältnis bei Dorfer (2007) bereits auf 1:3,8 und kehrte sich bei der vorliegenden Arbeit zu 2,4:1 um.

Laut Dorfer (persönliche Mitteilung) lag der Großteil der Sprosse mit 5-10 mm bei ihrer Arbeit nur sehr knapp über 5 mm, während die meisten Sprosse der Kontrollgruppe dieser Arbeit nur sehr knapp unter 5 mm lagen. Die Unterschiede in den Kontrollen dieser drei Arbeiten relativieren sich dadurch zwar, ein Vergleich ist aber dennoch nur mit Vorbehalten möglich, zumal auch die Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse je Primärexplantat variierte. Betrug die Multiplikationsrate in der Kontrollgruppe bei Buol-Wischenau (2008) noch 56,2; stieg sie bei Dorfer (2007) bereits auf 83,3 und betrug in der vorliegenden Diplomarbeit 125,7. Man kann also gleichzeitig mit einem chronologischen Anstieg der Vermehrungsrate einen Trend zu kleineren Sekundärsprossen beobachten. Es liegt die Vermutung nahe, dass die neu gebildeten Sprosse um so kleiner bleiben, je mehr pro Primärexplantat gebildet werden.

Als Grund für diesen Anstieg der Vermehrungsrate wäre vorstellbar, dass durch die an den stark verzweigten Primärexplantaten haftenden Reste hormonhaltiger Nährlösung der Vorbehandlung geringe Mengen Zeatin in das an sich hormonfreie Nährmedium mit eingebracht werden und dort weiterhin Einfluss auf die Induktion von Adventivsprossen ausüben. In weiterer Folge könnte nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass sich Zeatin u. U. im Nährmedium sogar anreichert. Dafür würde auch die Tatsache sprechen, dass nach häufigerer, forcierter Vermehrung, wie etwa zur Gewinnung ausreichender Menge genetisch einheitlichen Pflanzenmaterials für wissenschaftliche Untersuchungen, die Vermehrungsrate unabhängig von weiteren Faktoren erhöht zu sein scheint.

Bei Vackar (2000) wurde zwar mit einem zweiphasigen System mit flüssigen Medien gearbeitet, aber auf die zweiwöchige Sprossinduktionsphase in hormonhaltigem Flüssigmedium folgte keine vier-, sondern eine fünföchige Sprosselongationsphase in hormonfreiem Flüssigmedium. Berücksichtigt man, dass sich in der zusätzlichen Woche mit hormonfreiem Medium ebenfalls neue Sprosse gebildet haben können (Ringl, 1998), fällt trotz einer abweichenden Primärexplantatgröße von 1,5 cm Durchmesser eine erstaunlich niedrige Vermehrungsrate von 51,9 auf.

Bei Tammaa (1999) wurde für zwei Wochen auf zeatinhaltigem, festen Medium vorkultiviert und anschließend fünf Wochen in flüssiger, hormonfreier Nährlösung

inkubiert. Hier ergab sich eine Multiplikationsrate von 66,6. Diese lag somit entgegen dem bisherigen Trend höher als bei Vackar (2000). Dabei wurden nicht nur die meisten Sprosse in der Gruppe $<0,5$ cm gebildet, es fällt auch auf, dass kurz zuvor, ähnlich wie bei der vorliegenden Arbeit, zwei Diplomarbeiten mit dem selben Klon durchgeführt worden waren (Ringl, 1998; Ruzsits 1999) während Vackar ein Jahr später (2000) wieder damit arbeitete. Bei weiter zurück liegenden Arbeiten mit dem Klon *Drosera rotundifolia* II weichen die Kulturbedingungen zu sehr ab, als dass diese Daten bei den aktuellen Überlegungen berücksichtigt werden könnten. Es stellt sich trotzdem die Frage, ob die Pulsbehandlung mit zeitweiligem Zeatinzusatz zum Nährmedium, die zum Vermehren von *D. rotundifolia* II eingesetzt wird, längerfristig mehr Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Klons hat, als bisher berücksichtigt wurde.

Weiterführende Untersuchungen, wie etwa die Bestimmung der Wachstumsstoffkonzentration in den Nährmedien nach Kultur, könnten Klarheit schaffen.

Aufgrund der oben erörterten Tatsache, dass die Kontrollen bei Dorfer (2007) und Buol-Wischenau (2008) sehr unterschiedlich zur Kontrollgruppe dieser Arbeit ausfielen, scheint ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht sinnvoll. Stattdessen sollten die gewonnenen Daten immer in Relation zur jeweiligen Kontrolle betrachtet werden. In allen drei Arbeiten fällt auf, dass die in den Gefäßen mit 2000 ml erzielten Ergebnisse, sowohl hinsichtlich der Gesamtzahl neu gebildeter Sprosse, als auch der Sekundärsprosse >5 mm, besser ausfielen als bei den Kulturgefäßen mit 750 und 1500 ml, aber im Allgemeinen nicht signifikant besser als in den Kontrollen. Ein ähnlicher Trend zeigte sich beim Frisch- und vor allem beim Trockengewicht. Bei Dorfer (2007) und in der vorliegenden Arbeit waren die Ausbeuten mit 2000 ml-Gefäßen sogar bessere als in den Kontrollen, wobei bezüglich des Frischgewichtes der Einfluss der Immersionsbedingungen größer zu sein schien als der des Gefäßvolumens.

Konnte Buol-Wischenau (2008) eine deutliche Verbesserung der Vermehrungsrate bei der Versuchsreihe mit fünf Immersionen täglich gegenüber der Reihe mit einer Immersion täglich beobachten, fallen diese Unterschiede bei den hier untersuchten Bedingungen von 3, 5 und 7 Immersionen täglich nicht mehr so stark auf. Während bei der Immersionsdauer von 60 Minuten bei 7 Immersionen täglich mehr Sprosse

als bei den anderen Immersionshäufigkeiten gezählt wurden, war bei 120 Minuten die Sprossbildungsrate bei 3 Immersionen täglich am höchsten. Hier wurden auch signifikant mehr Sprosse als in der Kontrolle gebildet (vergl. Diagramm 35, Seite 29 und Diagramm 43, Seite 34). Bei 120 Minuten Immersion schien vor allem bei den höheren Immersionsfrequenzen das Optimum der Kulturbedingungen schon überschritten worden zu sein. Betrachtet man das Frischgewicht, erhält man auch bei der Reihe mit 60 Minuten mit weniger Immersionen pro Tag bessere Ergebnisse (vergl. Diagramm 63, Seite 48). Generell konnte eine bessere Ausbeute bei Frisch- und Trockengewicht bei den kürzeren Immersionszeiten einer Versuchsreihe festgestellt werden. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass bei beiden Immersionszeiten diese Ausbeute mit abnehmender Immersionshäufigkeit zunahm, bei 3x 60 Min. Immersion wurde das beste Ergebnis erzielt.

Schon Ringl (1998) stellte fest, dass sich der Einsatz flüssiger Nährmedien positiv auf die Elongationsphase von *Drosera rotundifolia* II auswirkte. Tammaa (1999) bewies, dass bereits in der zweiwöchigen Vorkultur mit zeatinhaltigem Flüssigmedium eine weitere Verbesserung der Biomasseproduktion erreicht werden kann. Vackar (2000) konnte dies sehr deutlich auch für die Vermehrungsrate des Klons zeigen.

Der Einsatz flüssiger Nährmedien in Submerskultur war also ohne Zweifel sowohl für Biomasseproduktion als auch für die Vermehrung von *D. rotundifolia* II von Vorteil. Eine weitere Verbesserung der erzielten Ausbeuten durch den Einsatz von Temporärimmersions-Systemen war möglich und rechtfertigt den höheren technischen Aufwand. Besonders in Kulturgefäßen mit großem Volumen konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Wie schon Buol-Wischenau (2008) feststellte, könnte dies mit dem größeren, durchschnittlichen Gasraum in Zusammenhang stehen. Dies wäre wiederum ein deutlicher Hinweis, dass sich gasförmige Metabolite bei der Kultur von *D. rotundifolia* hemmend auf das Wachstum auswirken.

In weiteren Versuchsreihen mit verlängerter Belüftungsphase und/oder zusätzlichen Belüftungsphasen ohne gleichzeitiger Flutung der Kulturgefäße mit Nährlösung könnte die Ausbeute so noch weiter verbessert werden. Auch ein vereinfachtes System, ähnlich dem hier eingesetzten TIS, bei dem die Primärexplantate in

Submerskultur gehalten werden und in regelmäßigen Abständen der Gasraum durch eine pneumatische Anlage ausgetauscht wird, scheint eine interessante Alternative. Man könnte so nicht nur das Vorratsgefäß für die Nährlösung einsparen und dadurch Platz für zusätzliche Kulturgefäße gewinnen, auch die technischen Anforderungen an die pneumatische Anlage und deren Steuerung fielen einfacher und dadurch kostengünstiger in der Anschaffung und Instandhaltung aus.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit galt es, die in vitro-Vermehrung von *Drosera rotundifolia* L. im Temporärimmersions-System zu optimieren. Dazu wurden in Kulturgefäßen mit 750, 1500 und 2000 ml unterschiedliche Immersionsbedingungen untersucht und bezüglich Vermehrungsrate und Biomasseproduktion ausgewertet.

Es zeigte sich, dass vor allem die Wahl des Gefäßvolumens für die Kultur von entscheidender Bedeutung ist. Generell wurden in den Gefäßen mit 2000 ml Volumen nicht nur mehr Biomasse, sondern auch mehr Sprosse gebildet. Dabei stieg vor allem der Anteil an Sprossen >5 mm, die für eine Akklimatisation und anschließende Freilandkultur ohne zusätzliche Elongationsphase geeignet scheinen. Während bei der Versuchsreihe mit 60 Minuten Immersionszeit noch eine Verbesserung der Vermehrungsrate mit zunehmender Immersionshäufigkeit beobachtet werden konnte, scheint es, dass die optimalen Kulturbedingungen bei 120 Minuten Immersionsdauer vor allem bei den höheren Immersionsfrequenzen bereits überschritten wurden. Beim produzierten Frisch- und Trockengewicht dürfte die optimale Immersionsdauer schon bei 60 Minuten überschritten worden sein, da hier die Ausbeute ähnlich wie bei 120 Minuten, wenngleich in weitaus geringerem Ausmaße, mit steigender Immersionshäufigkeit sank.

Bei entsprechender Wahl der Immersionsbedingungen und möglichst großvolumigen Kulturgefäßen konnte eine Steigerung der Vermehrungsrate und der Biomasseproduktion in TI-Systemen gegenüber Submerskultur beobachtet werden. Die Wahl der Immersionsbedingungen hängt dabei davon ab, welche Qualitätskriterien an das zu gewinnenden Pflanzenmaterial gestellt werden.

6. Literaturverzeichnis

AKITA M., TAKAYAMA S. (1994), Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control, *Plant Cell Reports* **13**: 184-187

BUOL-WISCHENAU I. (2008), In vitro Vermehrung von *Drosera rotundifolia* über temporäre Immersion, Diplomarbeit, Univ. Wien

CYGAN F.-C., HILLER K. (2002, *Droserae herba*, in: WICHTL M. (Hrsg.), *Teedrogen und Phytopharmaka* (4. Auflage), Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S 176-178

DORFER T. (2007), Massenvermehrung von Sonnentau im TIS, Diplomarbeit, Univ. Wien

ESCALONA M., LORENZO J.C., GONZÁLEZ B., DAQUINTA M., FUNDORA Z., BORROTO C.G., ESPINOSA D., ARIAS E., ASPIOLEA M.E. (1998), New system for in vitro propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr), *Pineapple News* **5**: 5-7

ETIENNE H., BERTHOULY M (2002), Temporary immersion system in plant micropropagation, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **69**: 215-231

GALAMBOSI B., GALAMBOSI Z., REPCÁK M. (2000), Growth, yield and secondary metabolite production of *Drosera* species cultivated in peat beds in Finland, *Suo* **51**: 47-57

GEORGE E.F. (1996), *Plant propagation by tissue culture, Part 2*, Exegetic Ltd., Edington, England, S. 758

Homöopathisches Arzneibuch (2006), Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart

HUSSEY G. (1986), Problems and prospects of in vitro propagation of herbaceous plants, in WITHERS L. A., ALDERSON P. G. (Hrsg.), Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications, Butterworth, London, S. 69–84.

KONGBANGKARD A., WAWROSCHE C. (2003), Improved shoot regeneration from nodules of *Charybdis numidica* in a temporary immersion system, J. Hort. Sci. Biotechnol. **78**: 650-655

KRENN L., KARTNIG T. (2005), Sonnentau, Z. Phytother. **26**: 197-202

LANGE D. (1998), Europe's medicinal and aromatic plants: their use, trade and conservation, TRAFFIC International, Cambridge

LORENZO J. C., GONZALEZ B. L., ESCALONA M., TEISSON C., ESPINOSA P., BORROTO C. (1998), Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system, Plant Cell Tissue Organ Cult. **54**: 197-200

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

RINGL A. (1998), Mikrovermehrung von *Drosera rotundifolia* L. und *Drosera peltata* Sm., Diplomarbeit, Univ. Wien

RUPRECHT D. (2005), In vitro-Vermehrung von *Helichrysum italicum* und *Hypericum perforatum* im TI-System, Diplomarbeit, Univ. Wien

RUZSITS CH. (1999), Mikrovermehrung von *Drosera*-Arten über Adventivsprossbildung und Knolleninduktion, Diplomarbeit, Univ. Wien

TAMMAA R. (1999), In-vitro-Vermehrung und Kultivierung von *Drosera rotundifolia* L. und *Drosera peltata* Sm., Diplomarbeit, Univ. Wien

VACKAR E.M. (2000), Biotechnologie und Analytik von *Drosera*-Arten, Diplomarbeit, Univ. Wien

WAWROSCH C., VACKAR E., GRAUWALD B., KRENN L. (2005); Variations of naphthoquinone levels in micropropagated *Drosera* species in vitro, under greenhouse and outdoor growth conditions, Sci. Pharm. **74**: 251-262

Lebenslauf

Name: Hannes Einfalt

Adresse: Liniengasse 53/8a; A-1060 Wien

Geburtsdaten: 14. Juni 1978 in Allentsteig; Niederösterreich

Eltern: Johann Einfalt
Christine Einfalt, geb. Hartner

Geschwister: Horst Einfalt
Christa Einfalt
Regina Einfalt

Bildungsweg: 1984 - 1986 All. Öffentl. Volksschule Hohenwarth-Mühlbach
1986 - 1988 Peter Rosegger-Volksschule Gmünd/NÖ
1988 - 1992 Hauptschule II Gmünd/NÖ
1992 - 1997 Höhere Lehranstalt für Umwelt und Wirtschaft
Yspertal
1997 Beginn des Studiums der Pharmazie an der Universität
Wien
7/2004 - 6/2005 Zivildienst beim ASBÖ Wien
2007 und 2008 Tutorium „In vitro-Kultivierung von
Arzneipflanzen“, Universität Wien