

ARBEITSBERICHT

Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung

**Bioproduktion Verbund: Enzymatische Semisynthese von Baccatin-III als Beitrag zur nachhaltigen Gewinnung von Pharmaka der Taxan- Reihe -Teilprojekt 3.
- Abschlussbericht -**

von

Dietrich Ewald

Arbeitsbericht des Instituts für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung
2004/6



**Bundesforschungsanstalt
für Forst- und Holzwirtschaft**

und

Zentrum Holzwirtschaft
Universität Hamburg

Bundesforschungsanstalt für Forst - und Holzwirtschaft
Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung
Standort Waldsieversdorf

ABSCHLUSSBERICHT (letzter Zwischenbericht) zum Projekt

"Bioproduktion Verbund: Enzymatische Semisyntese von Baccatin-III als Beitrag zur nachhaltigen Gewinnung von Pharmaka der Taxan- Reihe- Teilprojekt 3"

Berichtszeitraum vom 1.1.2004 -31.08.2004

Zuwendungsvertrag zwischen der TU Berlin und der BFH, Inst II/W

D. Ewald

Technische Assistenz: H. Enkisch

Die biometrischen Auswertungen wurden dankenswerterweise von Herrn T. Stauber durchgeführt.

Zusammenfassung

Die erarbeitete In-vitro-Vermehrungsmethodik am Beispiel eines adulten Eibenklones wurde hinsichtlich der Verwendung verschiedener Cytokinine und Wachstumsregulatoren optimiert. Ebenso wurden Versuche zur Verbesserung der Bewurzelung gebildeter Sprosse durchgeführt, wobei die bisher besten Varianten mit einer höheren Anzahl von Explantaten pro Variante getestet wurden.

Die Übertragbarkeit der Methode auf andere selektierte Klone konnte gezeigt werden.

Im Weiteren wurden in größerem Umfang Eibenstecklinge (Klon LÜRSEN) für die Anlage von Hydrokulturen bewurzelt und Wurzelmaterial für Untersuchungen der TU Berlin nach Induktion mit Methyljasmonat bereitgestellt.

Erste Untersuchungen zur Fütterung von Vorstufen bzw. Metaboliten der Taxolbiosynthese an bewurzelte Eiben in unterschiedlichen Substraten deuten einen Einfluss auf die Steigerung der Taxolbiosynthese (-gehalt) an. Der Einfluss von Acetyl-CoA wurde wiederholt getestet, ein erster Versuch zur Fütterung mit Phenylisoserin durchgeführt und das Material der TU Berlin zur weiteren Analyse bereitgestellt.

Für die Anlage eines Feldversuches in Thüringen wurden ca. 1800 stecklingsvermehrte Eibenpflanzen unterschiedlicher Größe und verschiedener Klone zur späteren Untersuchung des Taxolgehaltes zur Verfügung gestellt. Darunter befanden sich Klone, die bereits aufgrund der hohen Bewurzelungsrate und ihres raschen Wurzelwachstums ausgelesen worden waren (MV31, MV38).

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Vermehrung von Stecklingsmaterial ausgewählter Eiben-Klone/ Einfluss der Applikation von Metaboliten der Taxolbiosynthese auf den Taxolgehalt der Pflanzen	4
2. In-vitro-Vermehrung von Sprosskulturen selektierter Eibenklone/Einflüsse auf Sprossvermehrung und –entwicklung	6
2.1 Einfluss der Konzentration des Basalmediums	6
2.2 Einfluss von Zeatin sowie Zeatin/Kinetin- Kombinationen in Verbindung mit Arginin und PVP	7
2.3 Einfluss von Thidiazuron	10
2.4 Einfluss einer wiederholten Thidiazuron-Applikation	13
3. Versuche zur Bewurzelung von Mikrosprossen aus der Sprosskultur	16
3.1 Testung des Einflusses der Vorkulturmedien auf die Bewurzelung	16
3.2 Testung des Einflusses von verschiedenen Behandlungen auf die nachfolgende Bewurzelung	18
4. Einfluss der In-vitro-Vermehrung auf den Habitus der Sprosse in vitro sowie nach der Überführung in die Erdkultur	23
5. Bereitstellung von Pflanzenmaterial für weiterführende Untersuchungen	28
5.1 Bereitstellung von Material für analytische Untersuchungen	28
5.2 Bereitstellung von Material für die Anlage zweier Feldversuche in Thüringen	30
6. Veranstaltungen und Veröffentlichungen im Berichtszeitraum	33
7. Literatur	34
8. Anhang	35

1. Vermehrung von Stecklingsmaterial ausgewählter Eiben-Klone/ Einfluss der Applikation von Metaboliten der Taxolbiosynthese auf den Taxolgehalt der Pflanzen

In einigen Versuchsserien wurde auf bewurzelte Stecklinge der Baumschulfirma LÜRSEN, Denzerheide, zurückgegriffen, die im August 2002 abgesteckt worden waren (Klongemisch aus 2 Klonen). Diese wurden entweder im Stecksubstrat (Sand) belassen oder nach dem Einkürzen der Wurzeln in die Hydrokultur (PEUKE-Nährmedium) überführt.

Zur Untersuchung des Einflusses einzelner Metaboliten der Taxolbiosynthese wurde die Methode einer direkten Applikation über den Saftstrom erprobt. Die Methode wurde in Anlehnung an frühere Experimente zur Blühstimulation von Koniferen in Waldsiedersdorf ausgeführt. Aus diesem Grund erfolgte in einem Vorversuch eine Infiltration mit Lebensmittelfarben, die nach Auftrennung der Sprossachse erste Aufschlüsse über den Transport von Substanzen in der Pflanze zuließ.

Die Sprossachse eines 20 cm großen Stecklings wurde dazu ca. 2 cm über dem Wurzelansatz beginnend auf ca. 1 cm in Längsrichtung aufgetrennt. Über einen Docht konnte dann die zu infiltrierende Flüssigkeit mit dem Saftstrom aufgenommen werden. Es zeigte sich nach den Vorversuchen, dass ein Transport bis in die Sprossspitze erfolgte. Auch in Richtung der Wurzel wurden die Farbstoffe transportiert (ca. 3 cm weit, s. Abb.1).



Abb.1 Taxusstecklinge (Klon LÜRSEN), Vorversuche zur Applikation von Metaboliten der Taxolbiosynthese(links: Transport der Lebensmittelfarbe in Richtung Wurzel, rechts: vollständiger Transport bis in die Sprossspitze)

Innerhalb von 24 Stunden war es so möglich, ein Flüssigkeitsvolumen von mindestens 400µl einer wässrigen Lösung in die Pflanze zu infiltrieren. Ausgehend von diesen Werten wurden die späteren Applikationen durchgeführt.

Zehn Milligramm AcetylCoA (C2:0) Sodium prepared, SIGMA (A-2056) wurden in 2,5 ml sterilem Wasser gelöst. Dies entspricht einer Lösung von 4000 ppm (4000mg/l) = 4,94 mM. Vierhundert Mikroliter dieser Lösung wurden pro Pflanze verwendet (appliziert).

Je drei bewurzelte Pflanzen (Sand und Hydrokultur des Klones LÜRSEN) wurden mit AcetylCoA infiltriert. Die Lösung (in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß) wurde über einen Docht in eine Schnittstelle am Übergang vom Spross zur Wurzel eingebracht. Je drei bewurzelte Pflanzen (Sand und Hydrokultur) dienen als Kontrolle.

Nach Aufsaugen der Lösung durch die Pflanze (nach ca. 2 Stunden) wurde mit 400µl sterilem Wasser nachgewaschen.

Die Eppendorf-Gefäße verblieben an der Pflanze bis zur Ernte nach 48 Stunden (Entnahme aus dem jeweiligen Substrat).

Die Pflanzgefäße befanden sich in einem Gewächshaus bei etwa 23°C. Die Pflanzen wurden nach Abschluss der Applikation entnommen, die Wurzeln wurden abgewaschen.

Anschließend wurden die Pflanzen bis zur Aufarbeitung durch die TU Berlin bei -80°C gelagert.

Applikationstermine von **Acetyl-CoA** bisher:

26.03.04 – 28.03.04

30.06.04 – 1.07.04

30.07.04 – 1.08.04 je 6 Pflanzen/Var.

26.10.04 – 28.10.04 je 6 Pflanzen/Var.

Applikationstermine von **Phenylisoserin (BACHEM)**:

(6 mg/3ml 5% Ethanol, 500µl/Pfl.)

30.07.04 – 1.08.04 je 6 Pfl./Var

Applikationstermine von **Benzoylphenylisoserin** :

(40mg/ 6ml 50% MeOH, 1 ml/Pfl.)

26.10.04 – 28.10.04 je 6 Pfl./Var.

2. In-vitro-Vermehrung von Sprosskulturen selektierter Eibenklone/Einflüsse auf Sprossvermehrung und –entwicklung

2.1 Einfluss der Konzentration des Basalmediums

Wie die nachfolgende Tabelle zeigt, waren im Jahr 2003 Vermehrungsraten von 1,19- 1,85 erreichbar. Dies betraf das bislang verwendete Vermehrungsmedium WZ , welches als Basalmedium ein einfach konzentriertes WPM (Woody Plant Medium) enthielt, wie auch die Modifikation dieses Nährmediums, bei welchem die Konzentration des Basalmediums verdoppelt wurde.

Tabelle:

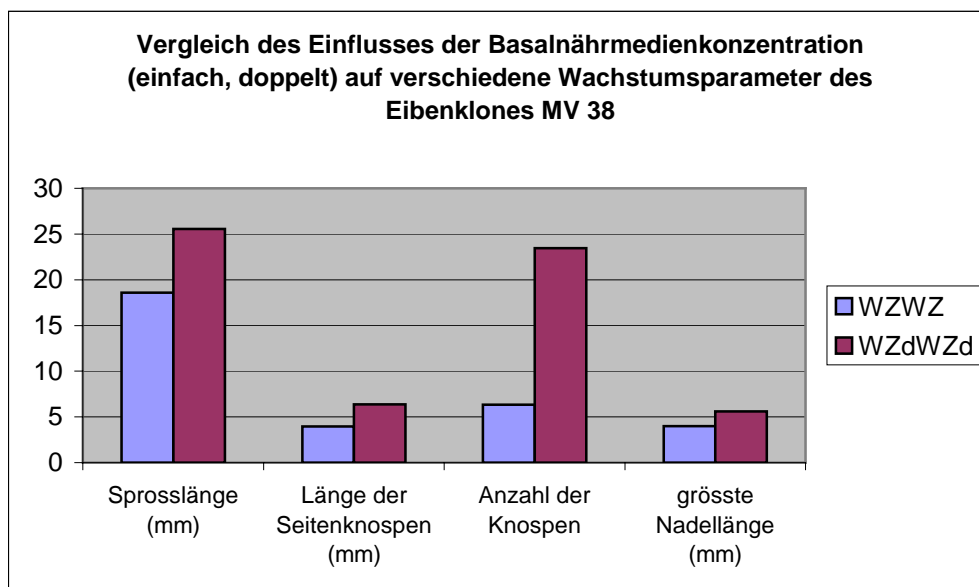
Vermehrungsfaktoren des Taxusklones MV 38 im Jahr 2003

Datum	NM	Anzahl Explantate	Vermehrungsfaktor
25.08.03	Wz doppelt	140	
15.09.03	Wz doppelt	167	1,19
14.10.03	„	309	1,85
10.11.03	„	344	1,11
9.12.03	„	504	1,46
10.12.03	„	+ 51 (bisher extra vermehrt) Summe: 555	

(Klon-Herkunft: Mecklenburg Vorpommern, Park Griebenow, Baum 7, FA Poggendorf, Standort K2 – Stoltenhäger Bändersande Braunerde schwach grundfrisch)

Wie an den Kulturen beobachtet werden konnte, war jedoch eine auffällige Verbesserung des Wachstumsverhaltens und des Aussehens der sich vermehrenden Knospen auf dem Medium WZ doppelt zu beobachten.

Aus diesem Grunde wurde ein Versuch durchgeführt, der einen Vergleich beider Medien über zwei Subkulturen darstellt (s. Abb.). Zu diesem Zweck wurden je 90 Sprosse gleicher Größe (10 mm Sprosslänge) für 2 Passagen von je 4 Wochen auf beiden Nährmedien angesetzt. Bereits die optische Ansprache ergab ein vitaleres Aussehen auf dem Nährmedium mit der doppelten Basalmedienkonzentration.



Auch die Sprosslänge, die Länge der Seitensprosse, die Anzahl der Knospen pro Spross und die durchschnittlich größte Nadellänge waren signifikant höher in der Variante mit der doppelten Mineralkonzentration. Im folgenden wurde diese Variante (WZ doppelt) als die Vergleichsvariante zugrunde gelegt und alle weiteren Nährmedien (WPM) wurden auf der Basis der doppelten Konzentration angesetzt.

2.2 Einfluss von Zeatin sowie Zeatin/Kinetin-Kombinationen in Verbindung mit Arginin und PVP

Inhalt des Versuches war es, zu prüfen inwieweit eine Teilung wachsender Sprosse möglich ist, die auf eine Förderung der Seitenknospenentwicklung abzielen und so zu einer Erhöhung der Vermehrungsrate beitragen könnte. Analoge Vermehrungstechniken wurden bei Lärche und Douglasie erfolgreich eingesetzt. Aus diesem Grund wurden längere Sprosse in Sprossspitzen und Sprossegmente geteilt und für zwei Passagen auf den nachfolgend aufgelisteten Nährmedien kultiviert. Es wurden 60 Explantate pro Variante verwendet.

Einfach konzentriertes Nährmedium WPM

WZ = + 7 μ M Zeatin

WZSperm = WZ + 200 mg/l Spermidine

Doppelt konzentriertes Nährmedium WPM

WZ0 = Zeatin (7 μ M)

WZ1 = Zeatin + Kinetin (jeweils 1 μ M)

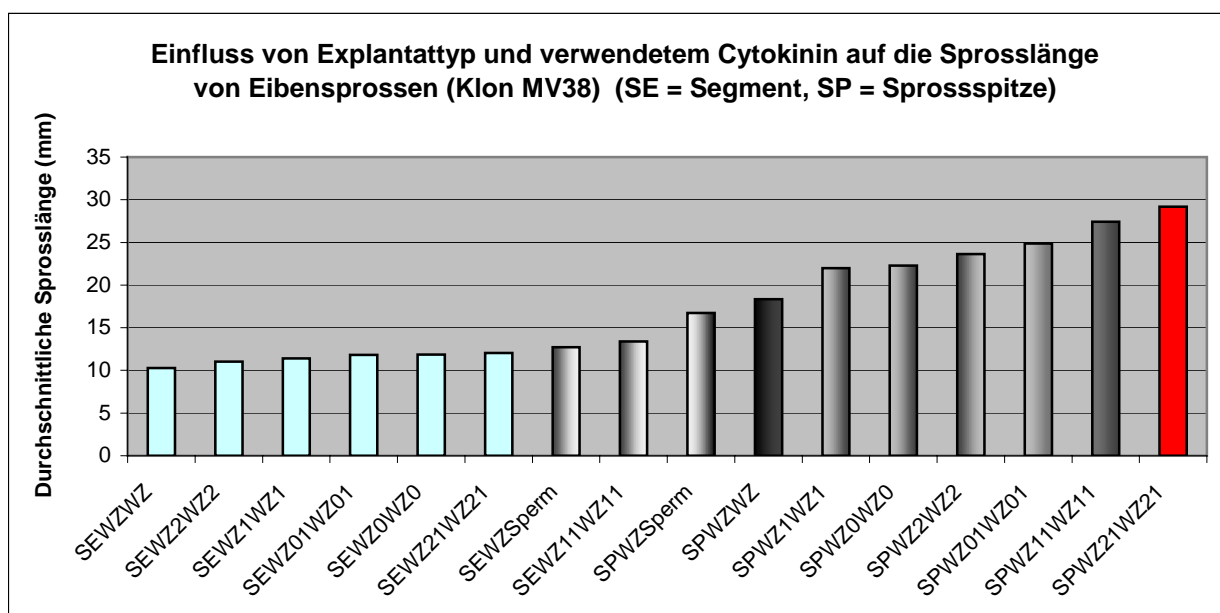
WZ2 = Zeatin + Kinetin (jeweils 3 μ M)

WZ01 = Zeatin (7 μ M) + Arginin (Arg) + Polyvinylpyrrolidon (PVP)

WZ11 = Zeatin + Kinetin (je 1 μ M) + Arg + PVP

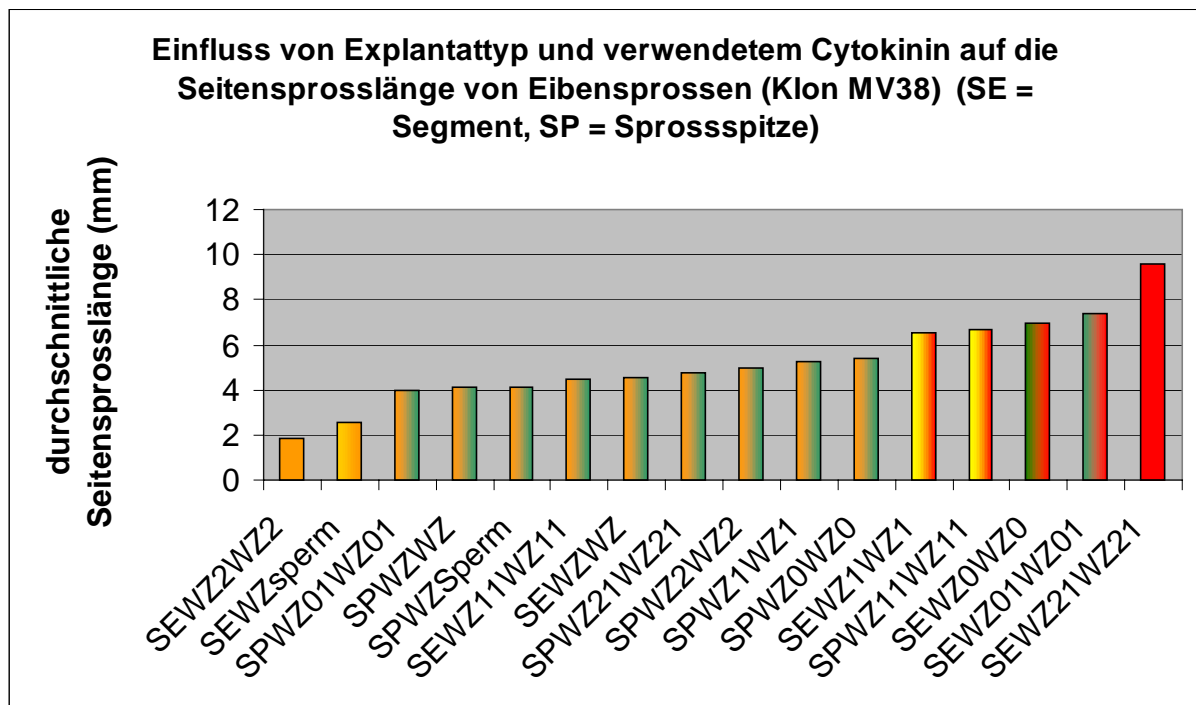
WZ21 = Zeatin + Kinetin (je 3 μ M) + Arg + PVP

(In den folgenden Abbildungen zeigen unterschiedliche Farben der Säulen einen signifikanten Unterschied der Varianten)



Wie aus der obigen Abbildung zum Einfluss des Explanttyps und der verwendeten Cytokininkombination/-konzentration auf die Sprosslänge hervorgeht, findet eine Sprosstreckung der Segmente praktisch nicht statt. Da eine sich streckende Sprossspitze dort fehlt, ist dies verständlich. Am besten wird die Sprosstreckung durch eine Kombination von Zeatin und Kinetin (1 bzw. 3 μM) in Verbindung mit der Applikation von Arginin und PVP gefördert.

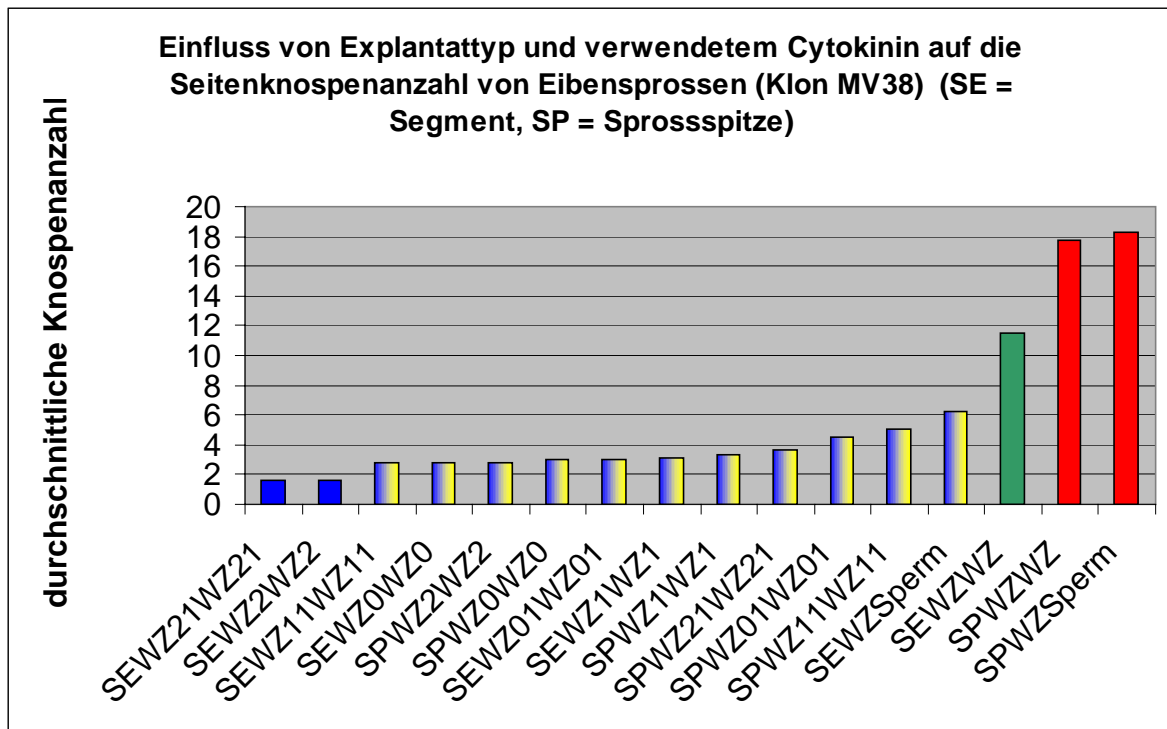
Die höhere Konzentration von Zeatin (7 μM), auch in Verbindung mit der Gabe von Spermidin, hemmt dagegen die Sprosstreckung.



Die Entwicklung bereits angelegter Seitenknospen (Streckung) wird in gleicher Weise durch ein Nährmedium mit 3 μM Zeatin und Kinetin, in Verbindung mit Arginin und PVP, am positivsten beeinflusst (s. obige Abbildung – *unterschiedliche Farben der Säulen bedeuten wieder einen signifikanten Unterschied*).

Betrachten wir dagegen die Anzahl der gebildeten Seitenknospen in der folgenden Abbildung als eines der wesentlichen Kriterien für eine Vermehrung des Materials, so können wir erkennen, dass bei den Sprossspitzen die höchste Konzentration an Zeatin (7 μM), in Verbindung mit Spermidin, signifikant am effektivsten wirkt. Die durchschnittlich geringere Stimulation der Segmente hinsichtlich der Bildung zusätzlicher Knospen durch die anderen verwendeten Cytokininkombinationen legt den Schluss nahe, dass eine Vermehrung durch die Teilung in Sprossspitzen und Segmente keinen zusätzlichen Effekt bei der Vermehrung der Eibensprosse erbringt.

Eine kontinuierliche Stimulation der Knospenbildung an Knospenclustern durch den Einsatz von Nährmedien mit einer höheren Cytokininkonzentration (7 μM Zeatin) und damit deren Vermehrung stellt derzeit die günstigste der untersuchten Varianten dar. Ob alternierende Zwischenschritte mit phytohormonfreien Nährmedien diese Knospenentwicklung begünstigen können, muss noch geprüft werden. Für die Ausbildung induzierter Adventivknospen bei Fichte waren diese Schritte erforderlich. Die Beobachtungen bei Eibe lassen jedoch vermuten, dass es sich bei der Knospenbildung lediglich um eine Stimulation bereits vorhandener Axillarknospen handelt.



Die natürliche Potenz der Eibe ein hohes Regenerationspotenzial zur Bildung neuer Knospen zu besitzen, spricht ebenfalls für eine hormonell forcierte Axillarknospenentwicklung. Eine deutliche Kallusphase und die Neubildung von Knospen, wie dies bei Fichte und Lärche nach einer Adventivknospeninduktion feststellbar ist, war in den untersuchten Klonlinien bei Eibe nicht zu beobachten.

Die separate Entwicklung gebildeter und anschließend vereinzelter Knospen aus diesen Knospenclustern auf gesonderten Nährmedien durch die Forcierung ihrer Streckung führte zu bewurzelbaren Eibensprossen.

Dieser Weg über eine gesonderte Knospenbildung (vgl. Ewald et al. 1997) gefolgt von einer optimierten Sprossentwicklung und –bewurzelung ist bisher der unter unseren experimentellen Bedingungen geeignetste Weg der In-vitro-Vermehrung der Eibe.

Damit ähnelt die Eibe als langsam wachsende Baumart, bei der Wahl einer geeigneten Vermehrungsmethode, der gleichfalls langsam wachsenden Fichte, bei welcher auch die Vermehrung über Knospencluster (Adventivknospen, Ewald u. Süß 1993; Ewald 2000) die Methode der Wahl war.

Koniferen mit einer geringeren Streckungspotenz, wie juvenile Fichte, und einer damit verringerten Neuanlage von Lateralknospen an sich streckenden Trieben, im Vergleich mit juveniler Lärche und juveniler Douglasie, sind mit Hilfe dieser beschriebenen Methode am besten zu vermehren.

2.3 Einfluss von Thidiazuron

Die Wirkung von Thidiazuron im Bereich der In-vitro-Kultivierung ist in der Literatur umfangreich beschrieben (z.B. Meier-Dinkel u. Siebert 1993 , Mithila et al. 2003). Eine sehr unterschiedliche Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration konnte dabei beobachtet werden.

Basierend auf den Vorversuchen sollte in einem umfassenden Versuch untersucht werden, inwieweit TDZ die Entwicklung der Sprosse des Klones MV38 beeinflusst.

Ausgangsmedien, von welchen die Sprosse für das nachfolgende Experiment nach vier Wochen Kultur entnommen wurden, waren WZ bzw. WZ+Spermidin. Die Versuchsbedingungen des Experimentes waren: eine vierwöchige Kultur im Dauerrotlicht bei 23°C, nach welcher die Auswertung erfolgte.

Die folgenden Varianten mit Thidiazuron wurden eingesetzt:

- WTD1 = doppelt konzentriertes WPM + 0,01 mg/l TDZ (0,045µM)
- WTD4 = doppelt konz. WPM + 0,03 mg/l TDZ (0,135µM)
- WTD3 = doppelt konz. WPM + 0,1 mg/l TDZ (0,45µM)
- und WZ (+ 7µM Zeatin) als Vergleich

Um die erforderliche Sicherheit der Aussage zu erhalten, wurden 13 Erlenmeyerkolben pro Variante mit 10 Explantaten pro Kolben (= 130 Explantate pro Variante) eingesetzt.

Als Kriterien wurden

- die Länge des Hauptssosses bis zur Basis der terminalen Nadeln,
- die Anzahl der seitlichen Triebe und Knospen,
- die Länge der seitlichen Triebe und Knospen und
- die maximale Länge der Nadeln am Hauptspross

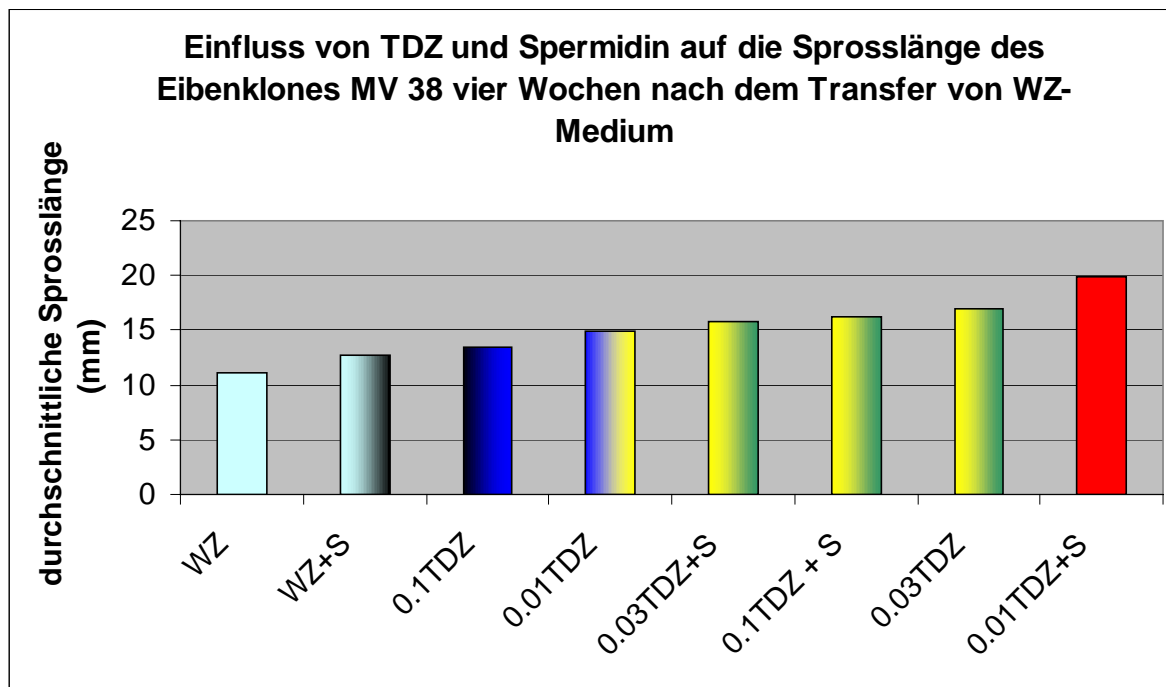
nach 4 Wochen vermessen.



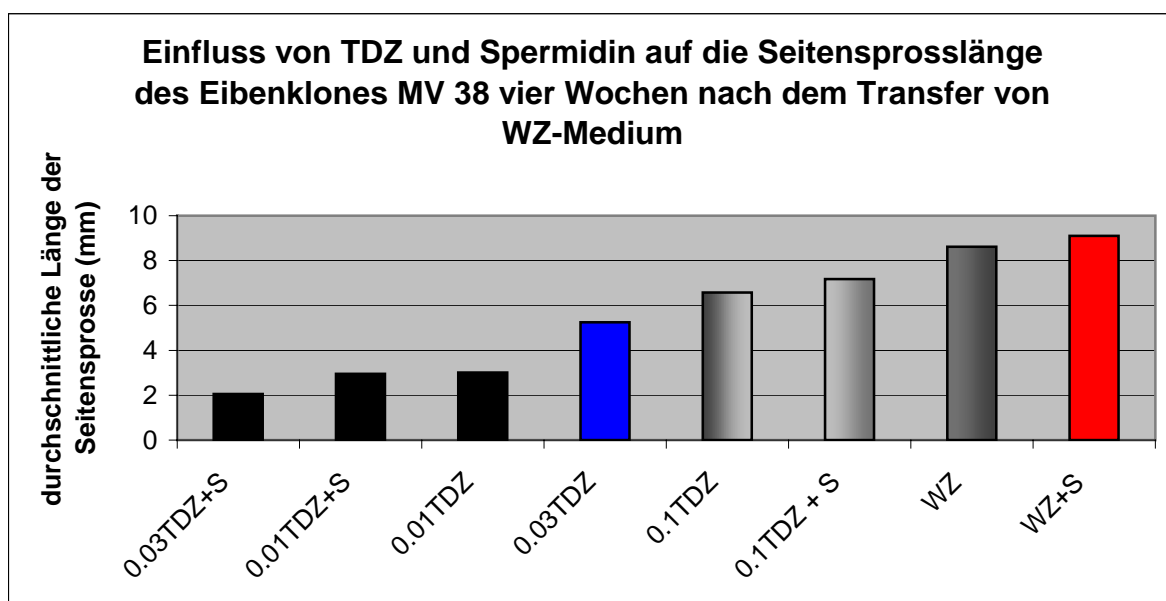
Abb. Eibensprosse des Klones MV38, links auf Nährmedium WTD4 (0,03mgTDZ/l), rechts auf WZ (7µM Zeatin)

Die statistische Verrechnung der Varianten untereinander wurde mit SASPROC GENMOD durchgeführt. Das verwendete Auswerteverfahren lehnt sich an die Arbeit von Piepho (2000) an. In diesen Abbildungen weisen unterschiedliche Farben der Säulen auf statistisch signifikante Unterschiede hin.

In der nachfolgenden Abbildung ist der Einfluss einer sehr geringen TDZ-Konzentration in Verbindung mit der gleichzeitigen Applikation von Spermidin auf die Streckung der eingesetzten Sprosse zu erkennen. Dieser Effekt war signifikant von den anderen Varianten verschieden. Alle weiteren Varianten mit TDZ zeigen keinen Einfluss von Spermidin und sind auch untereinander nicht signifikant verschieden. Eine Konzentration von 0,01mg/l TDZ in Verbindung mit Spermidin ist also die effektivste Variante um die größtmögliche Streckung der Sprosse dieses Klones zu erreichen.



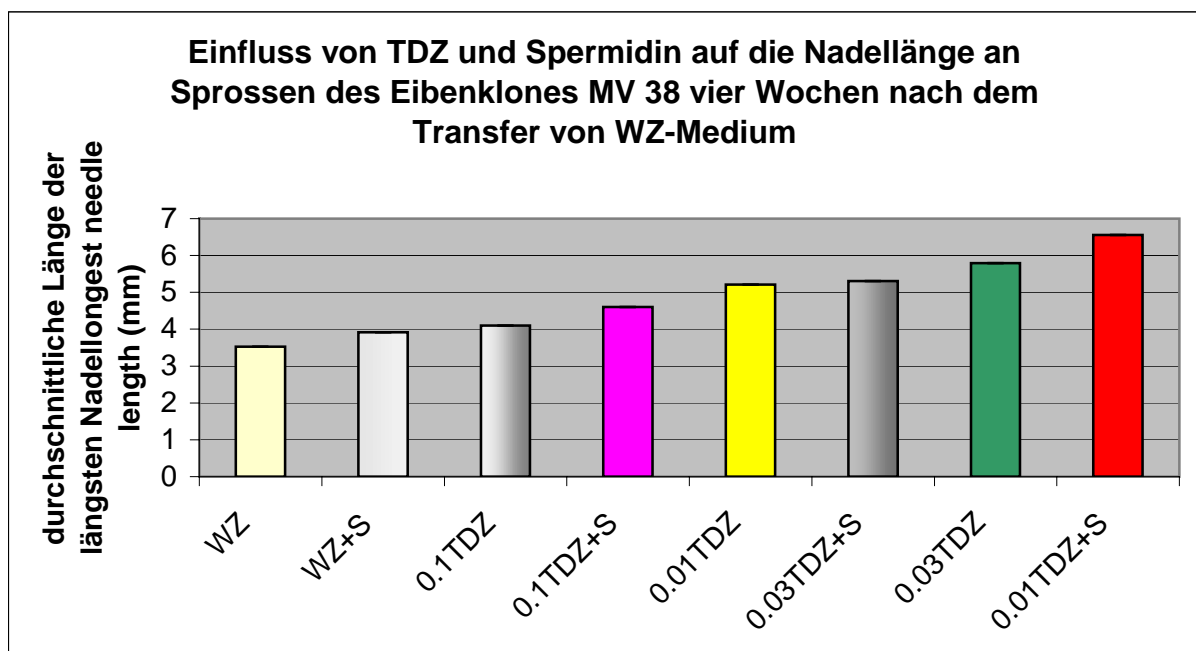
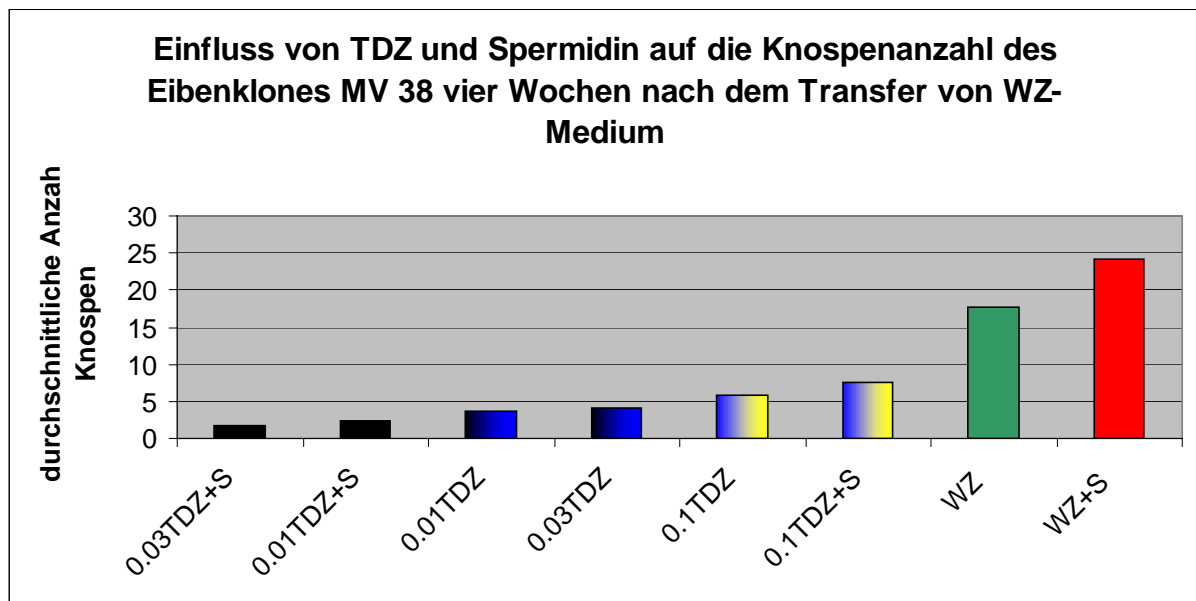
Wie in der nächsten Abbildung ersichtlich ist, wird die Seitensprossentwicklung durch Zeatin ($7\mu\text{M}$) am meisten gefördert.



Dies resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Aufhebung der Apikaldominanz infolge eines starken Cytokinineffektes.

Thidiazuron in der höchsten verwendeten Konzentration (0,1 mg/l), mit oder ohne Spermidin, kommt der Wirkung des Zeatins in der hier verwendeten Konzentration am nächsten. Geringere Thidiazuronkonzentrationen (0,03 mg/l und 0,01 mg/l) wirken deutlich weniger auf die Seitensprossentwicklung ein.

Den signifikant höchsten Effekt auf die Ausbildung, d.h. die Anlage oder Entwicklung vorhandener Axillarknospen hat unter den getesteten Varianten Zeatin in Verbindung mit Spermidin, wie die folgende Abbildung zeigt. Alle Varianten, die Thidiazuron enthalten, legen weitaus weniger Knospen an.



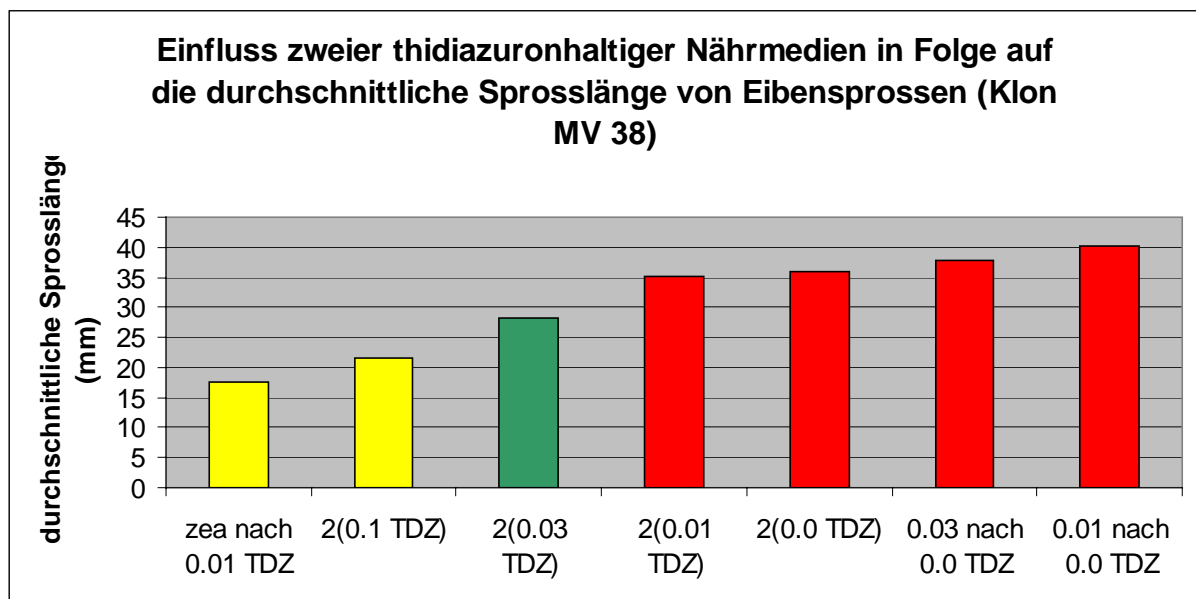
Die Nadellänge als Maß für eine normale Entwicklung des Eibensprosses, die durch Cytokinine stark beeinflusst (reduziert) wird, weist einen signifikant positiven Effekt durch die geringste TDZ-Konzentration in Verbindung mit Spermidin auf (s. obige Abb.). Ein zusätzlicher, fördernder Einfluss des Spermidins ist in einigen Varianten zu erkennen.

2.4 Einfluss einer wiederholten Thidiazuron-Applikation

Für den folgenden Versuch wurden 90 Sprosse pro Variante des Klones MV 38 verwendet. Die Sprosse wurden auf etwa gleiche Größe (15 mm) gebracht und dann in Erlenmeyerkolben im Dauerrotlicht kultiviert.

Nach 8 Wochen wurden dann die Kriterien: Sprosslänge, durchschnittliche maximale Nadellänge, durchschnittliche Seitensprosslänge und durchschnittliche Knospenanzahl pro Spross ermittelt.

Die statistische Verrechnung der Varianten untereinander wurde mit SASPROC GENMOD durchgeführt. Das verwendete Auswerteverfahren lehnt sich an die Arbeit von Piepho (2000) an. Auch in diesen Abbildungen zeigen unterschiedliche Farben der Säulen einen signifikanten Unterschied.

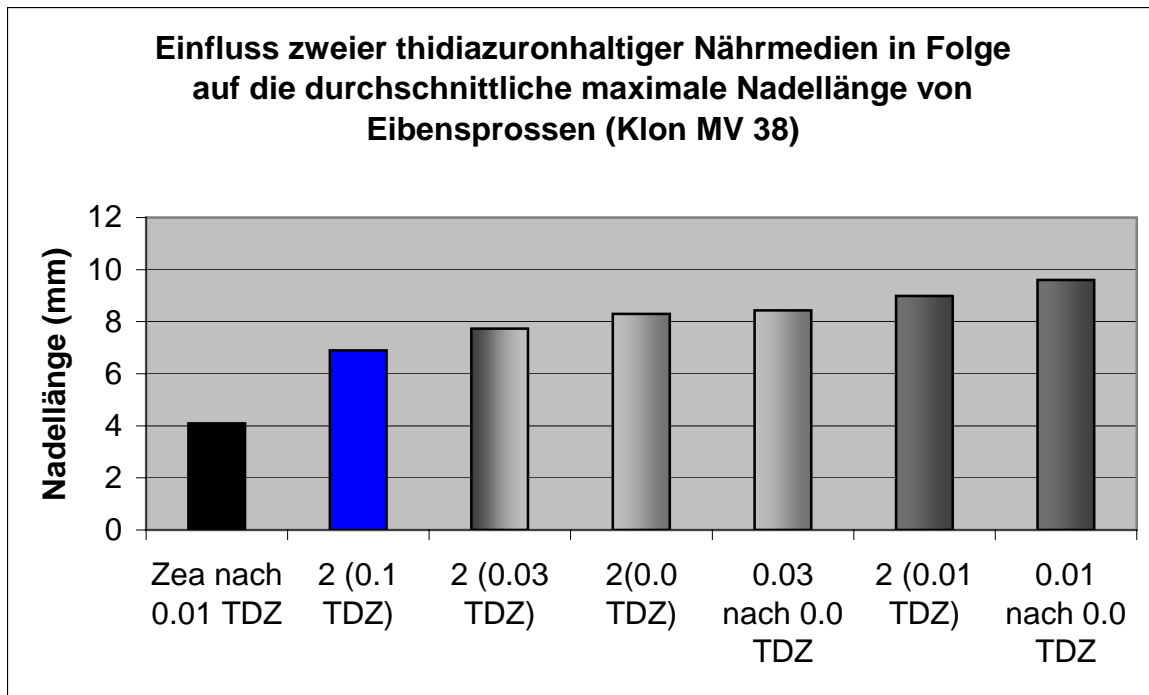


Die durchschnittliche Sprosslänge wird durch die Applikation geringer Thidiazuronkonzentrationen gefördert. Nährmedien, welche Konzentrationen höher als 0,03 mg/l Thidiazuron enthalten, hemmen die Sprosstreckung. Dies trifft auch für die Verwendung von 7 μ M Zeatin nach einer sehr geringen Thidiazuronkonzentration zu.

Die Frage, ob eine geringe Thidiazuronkonzentration besser als ein Nährmedium ohne Wachstumsregulatoren wirkt, kann anhand der Sprosslänge nicht beantwortet werden. Eine geringe Thidiazuronkonzentration (0,01 = WTD1) nach einem Medium ohne Wachstumsregulatoren (0.0 TDZ; s. rechte Säule) förderte die Sprosstreckung, wenn auch nicht signifikant.

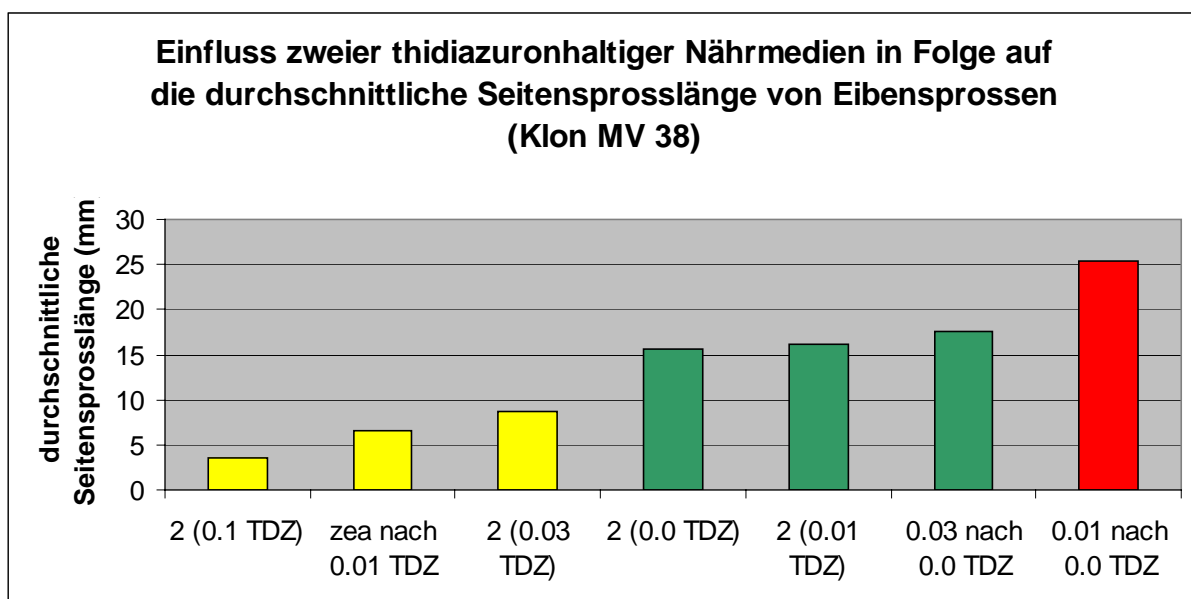
Bezüglich der durchschnittlichen maximalen Nadellänge, als einem Maß für die Entwicklung des Sprosses und der Nadeln, erwies sich eine sehr geringe Thidiazuronkonzentration (0,01 mg/l; 2. Säule v. rechts) in Folge, als auch eine geringe Konzentration ohne Wachstumsregulatoren im Vormedium (0,01 nach 0,0 TDZ; rechte Säule) als am effektivsten. Dies ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

Höhere Konzentrationen von Thidiazuron in Folge [2 (0,1 TDZ)] und Zeatin als Folgemedium (linke schwarze Säule) führen zu einer Reduktion der Nadellänge. Die Cytokininwirkung höherer Thidiazuronkonzentrationen wird hier als Hemmung der Nadelstreckung, vergleichbar der Zeatinwirkung, sichtbar.

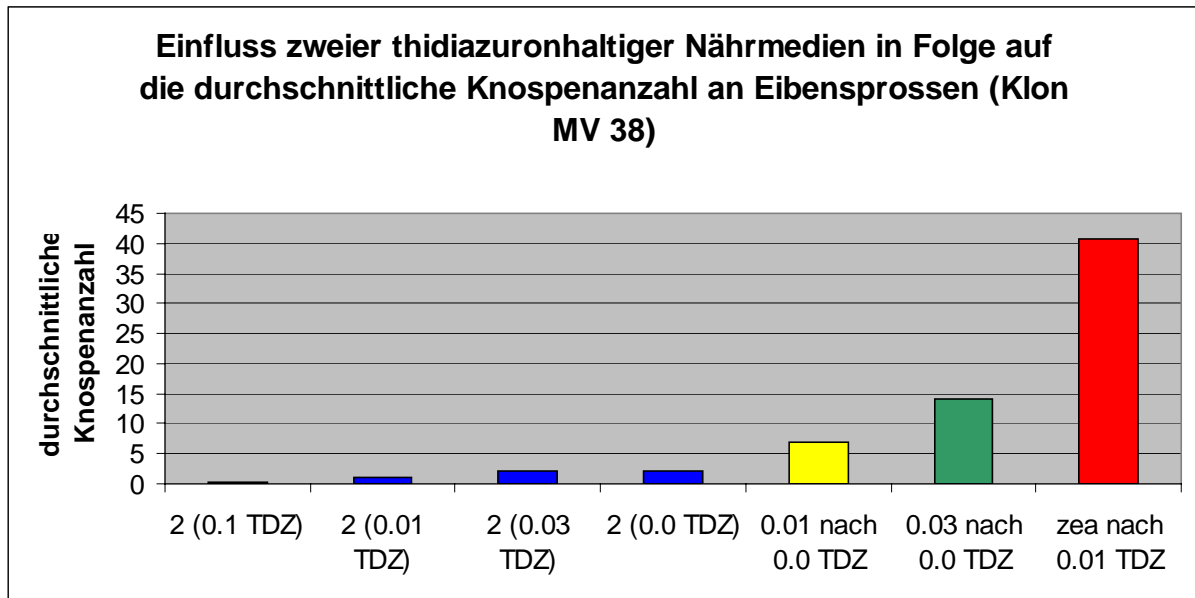


Die Länge der Seitensprosse, die in der unteren Abbildung dargestellt wurde, weist die Abfolge einer sehr geringen Thidiazuronkonzentration nach einer wachstumsregulatorfreien Phase (0,01 nach 0,0 TDZ) als die signifikant effektivste Variante bezüglich dieses Kriteriums aus (rote Säule).

Eine statistische Unterscheidung der Wirkung einer zweimaligen Verwendung des Nährmediums mit der geringsten getesteten Thidiazuronkonzentration (0,01 mg/l TDZ) gegenüber einer wachstumsregulatorfreien Kultivierung und der geringen Konzentration (0,03 mg/l TDZ) nach einer wachstumsregulatorfreien Kultivierung ist nicht möglich (grüne Säulen).



Wie bereits in den Vorversuchen getestet, ist die Wirkung der zeatinhaltigen Nährmedien auf die Anlage bzw. Förderung der Knospenbildung und -entwicklung auch der folgenden Abbildung zu entnehmen. Die Wirkung des Zeatins ist signifikant sicher und übertrifft die Wirkung der getesteten Thidiazuronkonzentrationen um mehr als das Doppelte hinsichtlich der durchschnittlichen Knospenzahl.



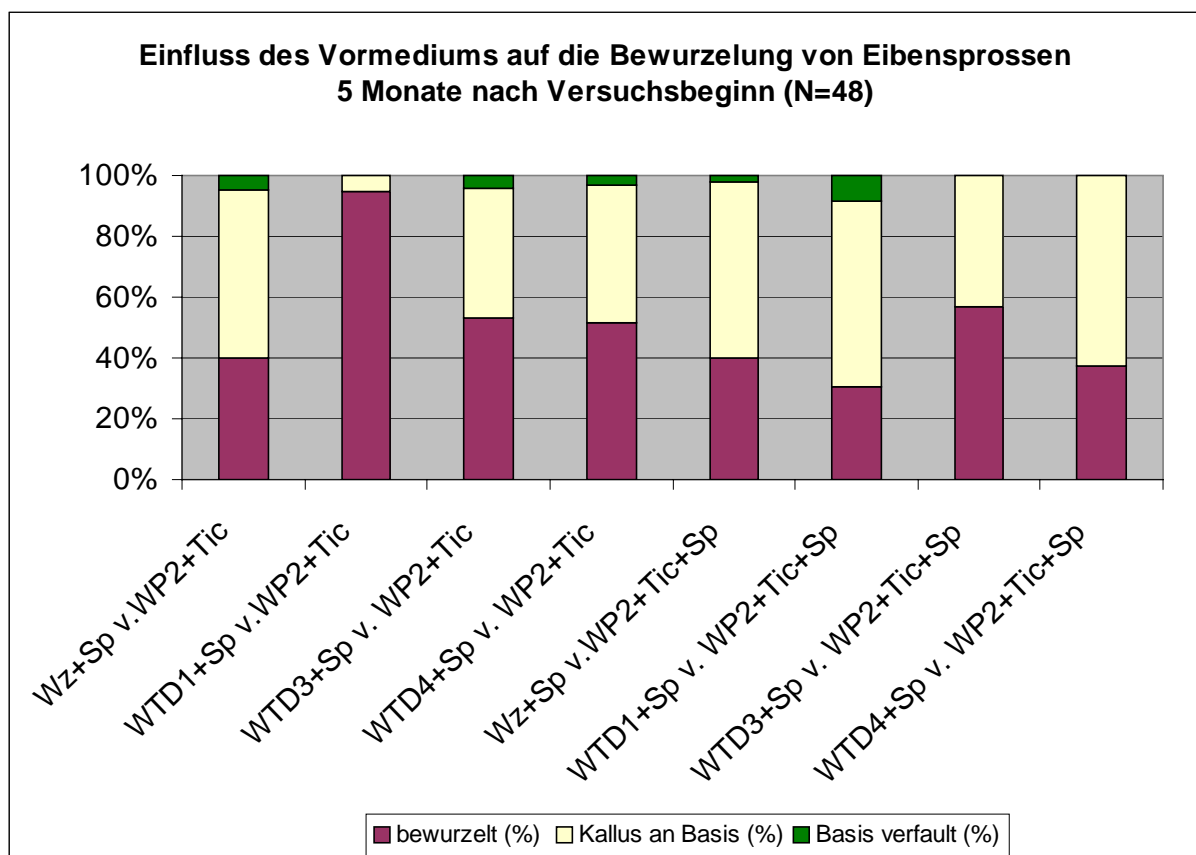
Dies bestätigt die Feststellung, dass Zeatin in der gewählten Konzentration ($7\mu\text{M}$) zwar für die Anlage von Knospen, nicht aber für die Streckung der Sprosse mit Blick auf deren spätere Bewurzelung eingesetzt werden kann.

3. Versuche zur Bewurzelung von Mikrosprossen aus der Sprosskultur

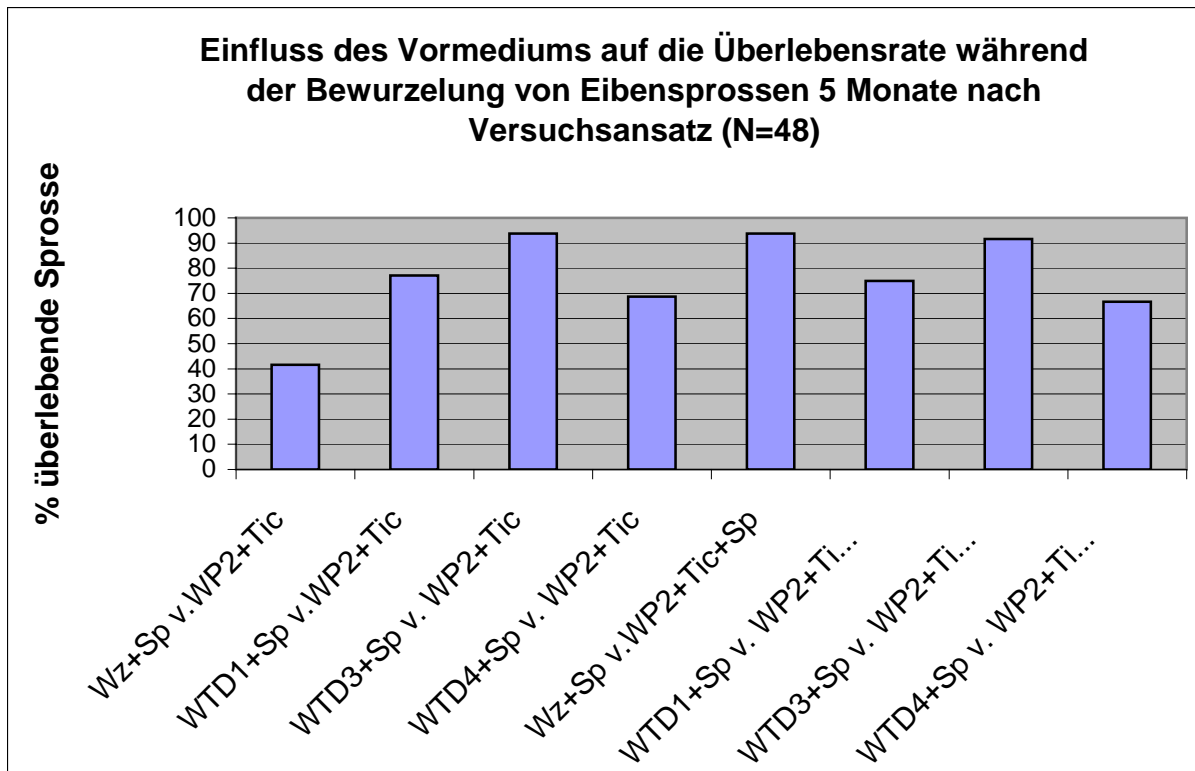
3.1 Testung des Einflusses der Vorkulturmedien auf die Bewurzelung

In zwei Experimenten wurde der Einfluss der Vorkulturmedien auf die Bewurzelung von Eibensprossen untersucht. Als Vormedien waren das Vermehrungsmedium mit Zeatin (7 μ M; Nährmedium WZ) mit und ohne Zusatz von Spermidin eingesetzt worden. Die Medien, die davor verwendet worden waren, enthielten 2iP (14 μ M; Nährmedium WP2) mit und ohne Spermidin sowie mit und ohne Ticarcillin. Die Sprossenden wurden dazu vor dem Transfer auf das agar-verfestigte Medium frisch angeschnitten. Nach einer 14-tägigen Induktion mit dem Auxin IBA (Nährmedium L9 +2mg/l IBA) und anschließendem Abstecken in JIFFY-Torfquelltöpfen wurden die Pflanzen in Minigewächshäuser überführt. Sphagnum-Moos zwischen den Pflanzen verhinderte einen Befall mit Schadpilzen. Die bepflanzten Torfquelltöpfe wurden bei einem Lichtregime von 16/8 (Licht/Dunkel) und ca. 15-17°C für 5 Monate belassen. Nach 2 Monaten wurden die JIFFYs nochmals mit Nährlösung SH1/2 (ohne Zucker) getränkt. Nach 3 und 5 Monaten wurden folgende Merkmale als Parameter für die Wurzelbildung ermittelt

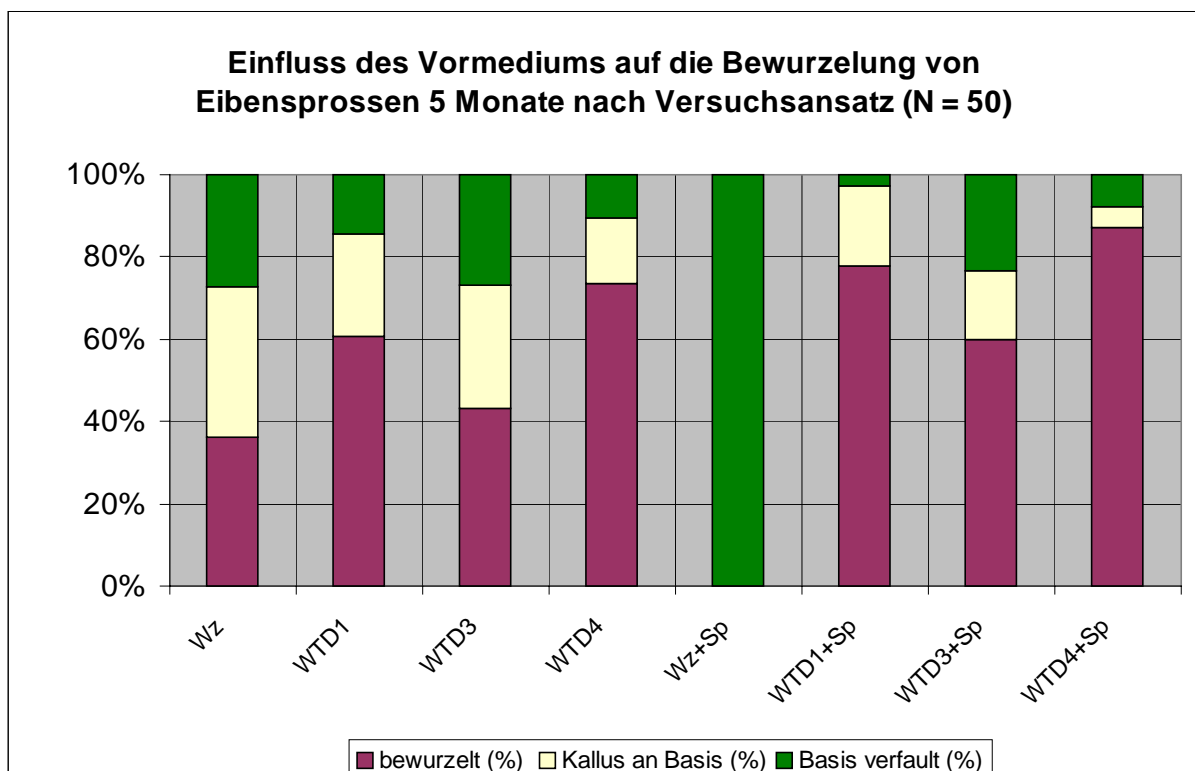
- die Bewurzelungsrate (relative Anzahl bewurzelter Sprosse)
- die Kallusbildung an der Sprossbasis
- die Tatsache, ob die Sprossbasis verfault war.



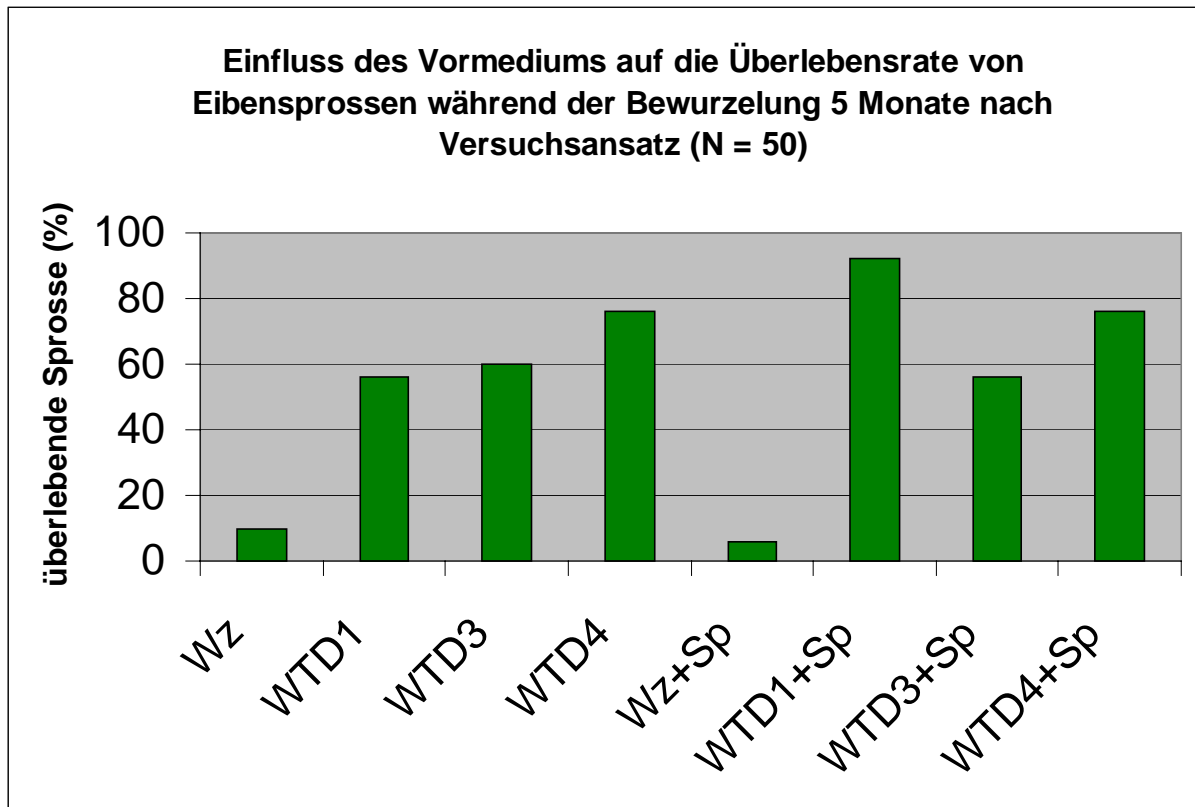
Es zeigte sich deutlich, dass das Nährmedium WTD1 mit Spermidin als Medium vor der Bewurzelung die höchste Bewurzelungsrate ergab. Dies war nicht der Fall, wenn bereits das vier Wochen vorher verwendete Medium ebenfalls Spermidin enthalten hatte. Ein leichter Trend in dieser Richtung war auch bei anderen Varianten feststellbar z.B. bei WTD4. Die Überlebensrate der Sprosse während der Bewurzelung war besonders bei Variante WTD3 mit Spermidin höher, gleichgültig ob das Vormedium bereits Spermidin enthalten hatte.



In Versuchsserie 2 wirkte sich der Zusatz von Spermidin im letzten Vormedium vor der Wurzelinduktion positiv auf das Bewurzelungsprozent aus. Dies war für die Varianten zu beobachten, die TDZ enthielten und dort besonders für die geringen Konzentrationen (0,01 u. 0,03mg/l). Beim Vermehrungsmedium (WZ) führte der Zusatz von Spermidin zum Verfaulen der Basis aller induzierten und gesteckten Sprosse. Die Hemmung der Bewurzelung durch höhere Konzentrationen an TDZ ist für Variante WTD3 erkennbar.



Eine Steigerung der Überlebensrate der Sprosse ist bei geringen Konzentrationen von TDZ, vor allem aber in Verbindung mit Spermidin zu beobachten. Das cytokininhaltige Vermehrungsmedium WZ eignet sich dagegen nicht als direktes Vormedium für eine nachfolgende Bewurzelung.

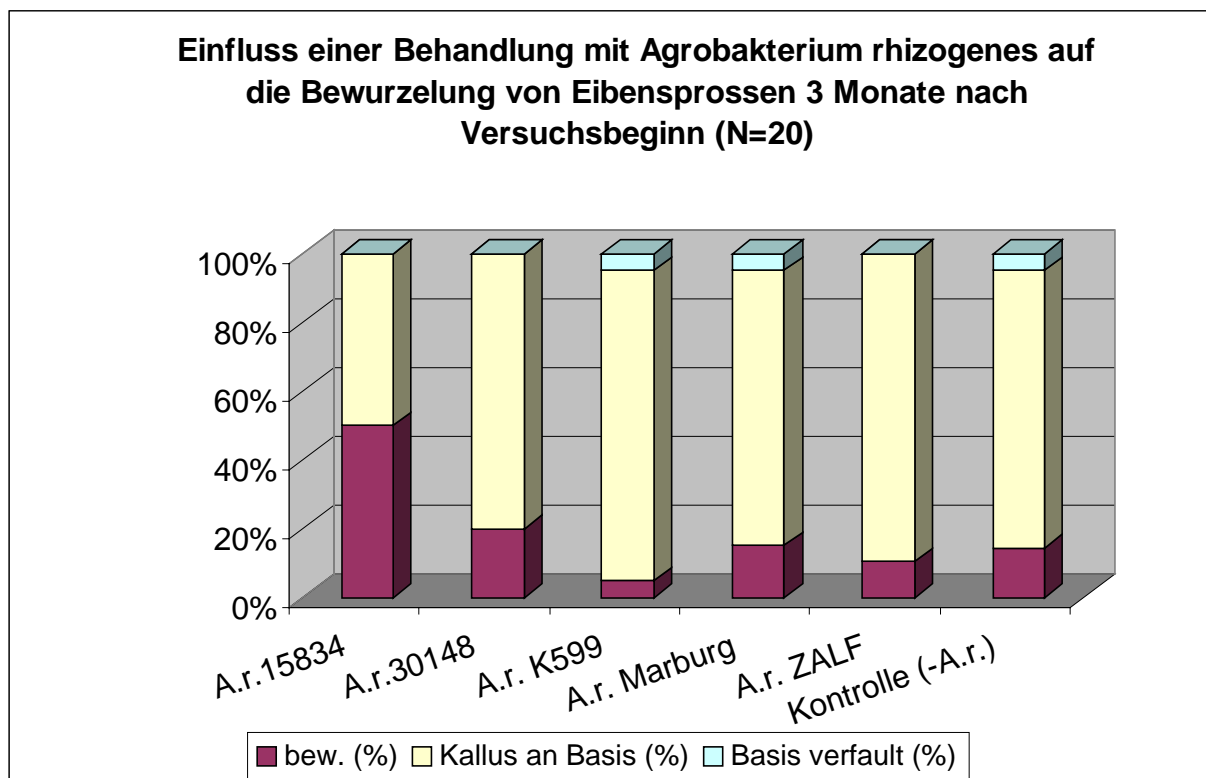


3.2 Testung des Einflusses von verschiedenen Behandlungen auf die nachfolgende Bewurzelung

Die von den Vormedien entnommenen Eibensprosse wurden hinsichtlich des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Bewurzelung untersucht. Neben einer Kontrolle, die keine weitere Behandlung zur Induktion der Bewurzelung erhielt, wobei die Sprossenden aber frisch angeschnitten wurden, testeten wir den Einfluss einer 14tägigen Induktion mit dem Auxin IBA (Nährmedium L9 +2mg/l IBA) und anschließendes Abstecken in JIFFY-Torfquelltöpfchen. Eine weitere Variante stellte eine 24-stündige Applikation von verschiedenen Agrobakterium rhizogenes-Stämmen dar. Im Laufe der Versuche erwies sich der Agrobakterienstamm MARBURG (*A. rhizogenes* MARBURG – von M.Döring unter dieser Bezeichnung aus Marburg erhalten) als am effektivsten hinsichtlich der Überlebensrate der Sprosse und ihrer Bewurzelung.

Die über Nacht bei 28°C angezogene Bakteriensuspension (Nährmedium YEB, 50ml) wurde unmittelbar vor dem Einstellen der frisch angeschnittenen Sprossbasis mit 100µM Acetosyringon versetzt. Die Sprosse verblieben dort für 24 Stunden, bevor sie, wie die Sprosse der anderen Versuchsvarianten, in JIFFY-Torfquelltöpfchen, die mit SH1/2 – Basismedium getränkt worden waren, abgesteckt wurden. Die bepflanzt JIFFY-Torfquelltöpfchen wurden in Minigewächshäusern bei einem Lichtregime von 16/8 (Licht/Dunkel) und ca. 15-17°C für 7 Monate belassen. Nach 3, 5 und 7 Monaten wurden das Verfaulen der Sprossbasis, die Bildung eines basalen Kallus und die Ausbildung von Wurzeln als Parameter für die Wurzelbildung ermittelt.

In einem ersten Versuch zeigte sich nach 3 Monaten noch der Stamm *A. rhizogenes*. 15834 den anderen Stämmen überlegen.



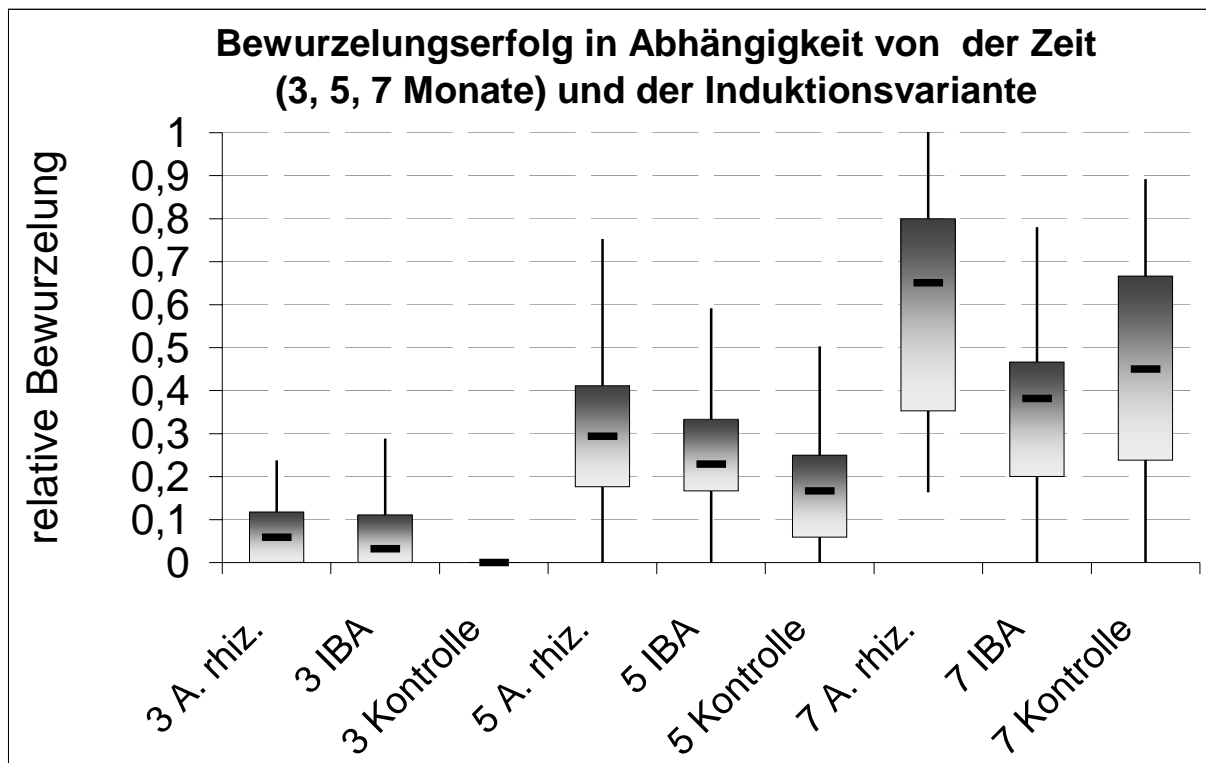
Spätere Experimente, die auch die Überlebensraten der Sprosse als Kriterium mit einbezogen, sprachen für den Stamm *A. rhizogenes* MARBURG. Eine höhere Überlebensrate der Sprosse ermöglicht eine spätere Bewurzelung der Sprosse, die bei Taxus manchmal erst nach 7 Monaten erfolgt.

Daher sind die Kriterien, die bei anderen Gehölzen angewendet werden können, aufgrund der sehr langen Zeiträume bis zur Wurzelbildung in dieser Weise für Taxus nicht ohne weiteres anwendbar.

In der folgenden Abbildung ist die relative Bewurzelung (von 0=0%; 1=100%) in Abhängigkeit von der Zeit und der gewählten Induktionsvariante (Kontrolle; Induktion mit A. rhizogenes Stamm MARBURG und Induktion mit dem Auxin IBA) dargestellt.

Wie sich über diesen langen Zeitraum von 7 Monaten zeigte, ist die Variante, die auf der Induktion mit dem gewählten Agrobakterien-Stamm basiert, im Median den anderen Varianten überlegen.

Eine statistische Sicherung ist aufgrund der breiten Streuung nicht möglich, dennoch beschreibt diese Darstellungsform sehr deutlich den Trend der in den Versuchen zu beobachten war. Obwohl Indolylbuttersäure nach drei und fünf Monaten ein durchschnittlich höheres Bewurzelungsprozent aufweist, ist die Absterberate der Sprosse höher. Die Agrobakterienbehandlung führt, wie bereits gesagt zu einer höheren Überlebensrate der Sprosse. Auch bei der Kontrolle ist die Überlebensrate der Sprosse im Vergleich zur Auxinbehandlung höher. Damit besteht die Möglichkeit, dass sich überlebende Sprosse beider Varianten auch später noch spontan bewurzeln.



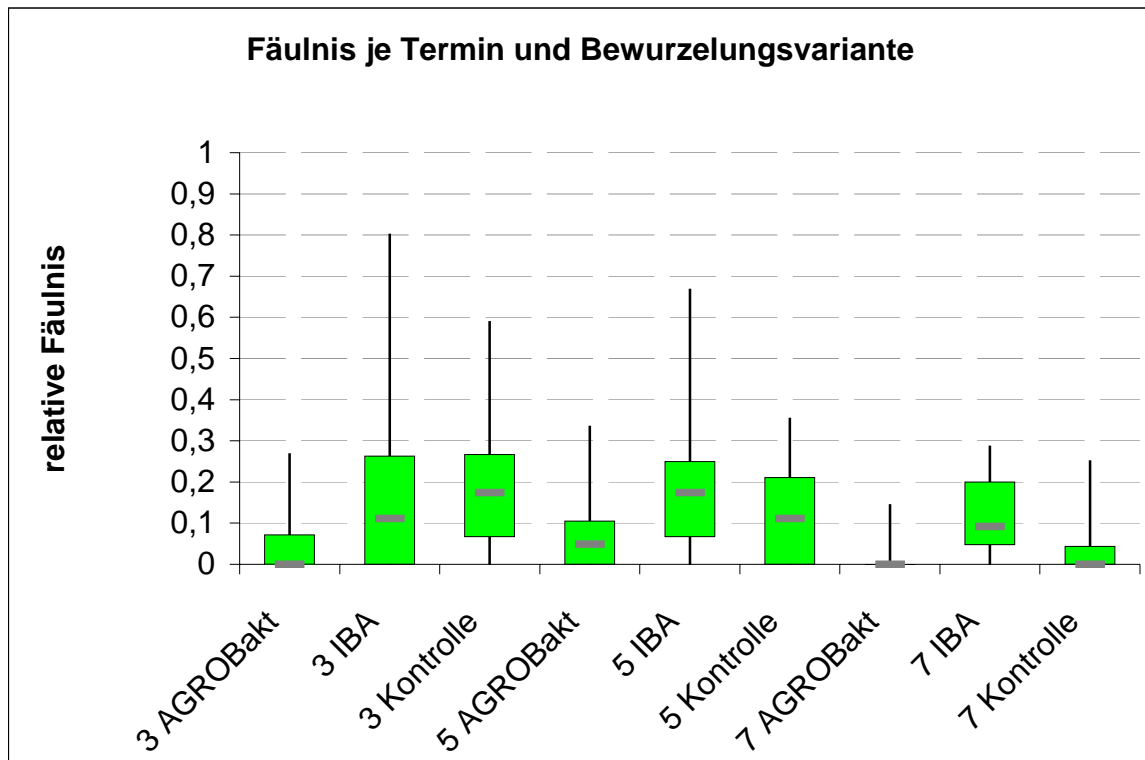
Bezieht man die anderen bonitierten Kriterien (verfaulte Sprossbasis, Kallusbildung an der Sprossbasis) mit ein, dann wird der Unterschied in den Varianten erklärbar.

Wie in den beiden folgenden Abbildungen deutlich wird, sind Trends in den Unterschieden der Varianten auch bei diesen Kriterien zu erkennen.

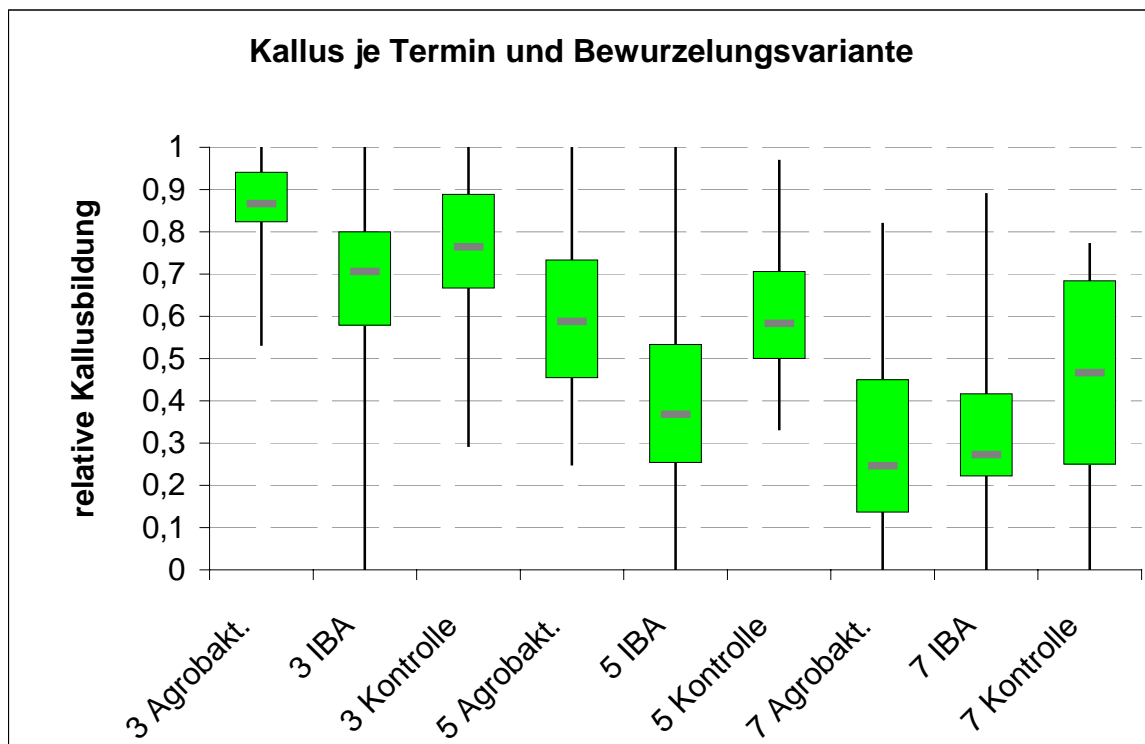
Die Neigung der mit Auxin (IBA) behandelten Sprosse, an der Sprossbasis zu verfaulen, ist nach drei und fünf Monaten sehr klar zu sehen.

Nach 7 Monaten sind die meisten der Sprosse mit verfaulter Basis bereits abgestorben und fallen daher im Anteil zurück.

Die Agrobakterienbehandlung lässt eine wesentlich geringere Neigung zum Verfaulen der Sprossbasis erkennen.



Die beobachtete Kallusbildung als Vorstufe der späteren Wurzelbildung ist nach der Agrobakterienbehandlung zu den ersten beiden Boniturdaten (3 und 5 Monate) höher als nach 7 Monaten.



Auch die Kontrolle weist bezüglich dieses Kriteriums höhere durchschnittliche Werte als die IBA-Variante auf.

Nach 7 Monaten steigt die Kallusbildung bei der Kontrolle noch an und erlaubt so immer noch eine weitere Spontanbewurzelung von Sprossen.

Die Behandlung mit Agrobakterien ist somit bezüglich ihrer Effizienz, d.h. Überlebensrate der Sprosse und Bewurzelungsprozent in einer vergleichsweise kürzeren Zeit als die Kontrolle als die Methode der Wahl für die Bewurzelung von Eibensprossen dieses Klones anzusehen.

Es muss aber künftig die Verifizierung dieser Methode auch für andere Klone erfolgen. Diese Experimente befinden sich bereits in der Vorbereitung.

4. Einfluss der In-vitro-Vermehrung auf den Habitus der Sprosse in vitro sowie nach der Überführung in die Erdkultur

Plagiotroper Wuchs und bestimmte Arten der Benadelung werden bei Koniferen häufig in Zusammenhang mit dem Alter diskutiert. Wie wir bereits mehrfach und für verschiedene Arten (Lärche; Douglasie) zeigen konnten (Ewald 2000), ist häufig auch für extrem junges Material ein plagiotroper Wuchs in der Erdkultur zu beobachten.

Dies konnten wir auf ein unzureichendes Spross-Wurzel-Verhältnis zurückführen, welches sich nach einigen Jahren verändert und zu orthotropem Wachstum der Bäume führt. Der Eintritt der Blüte in diesen Pflanzen erfolgte nicht früher als bei Sämlingen. Damit kann das auftretende plagiotrope Wachstum in diesen Fällen nicht als Zeichen einer beschleunigten Alterung durch die In-vitro-Vermehrung gedeutet werden.

Auch für Taxus waren in der In-vitro-Kultur unterschiedliche Benadelungsformen erkennbar, wie in den folgenden Abbildungen und drei Grafiken (für 3 verschiedene Klone) gezeigt wird.

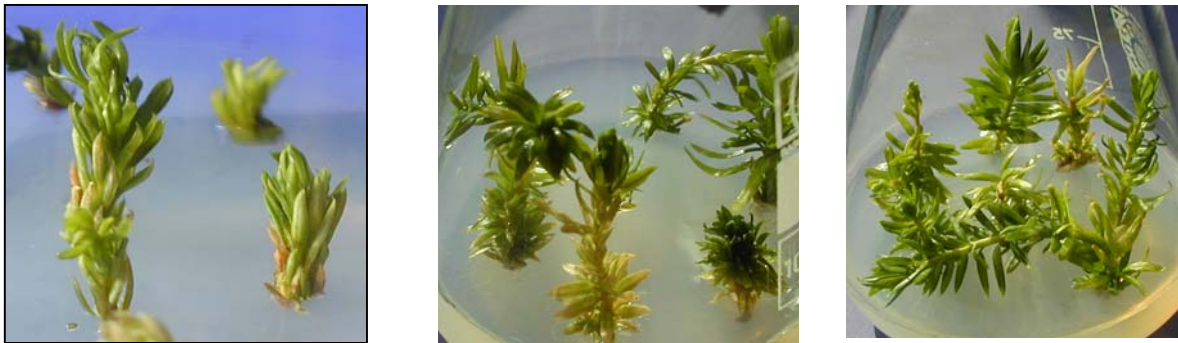
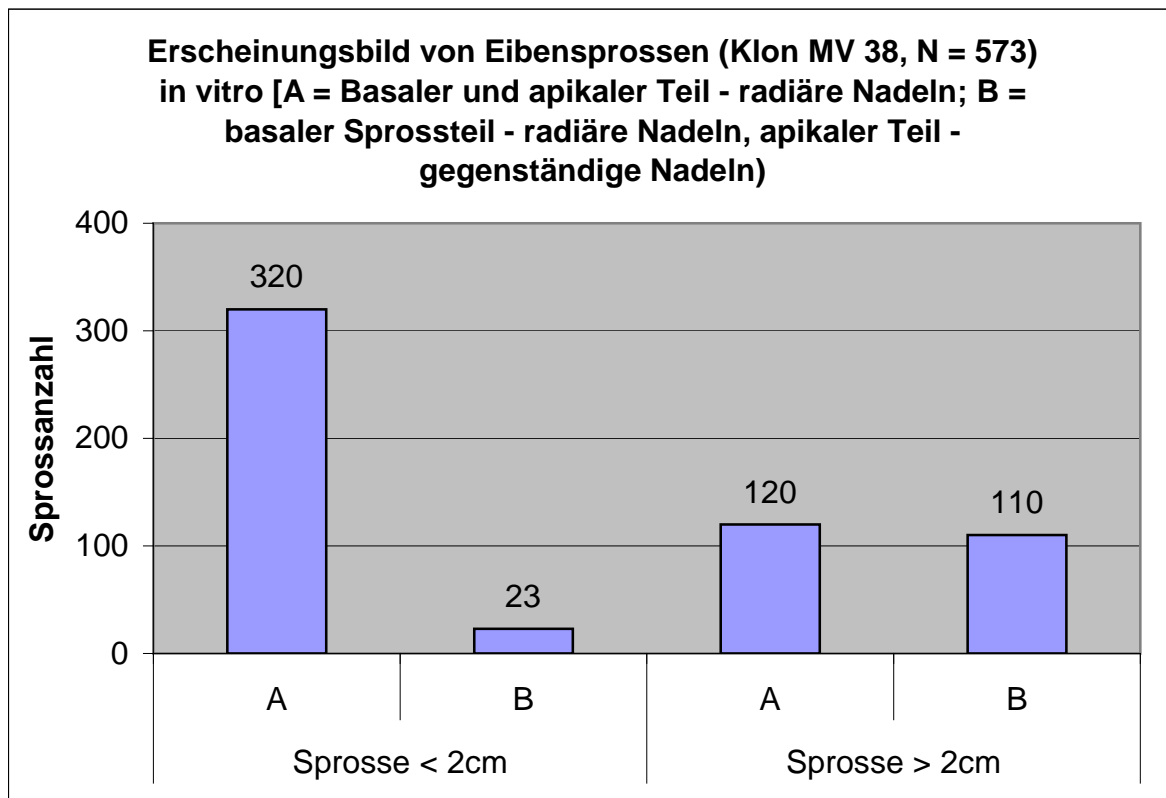
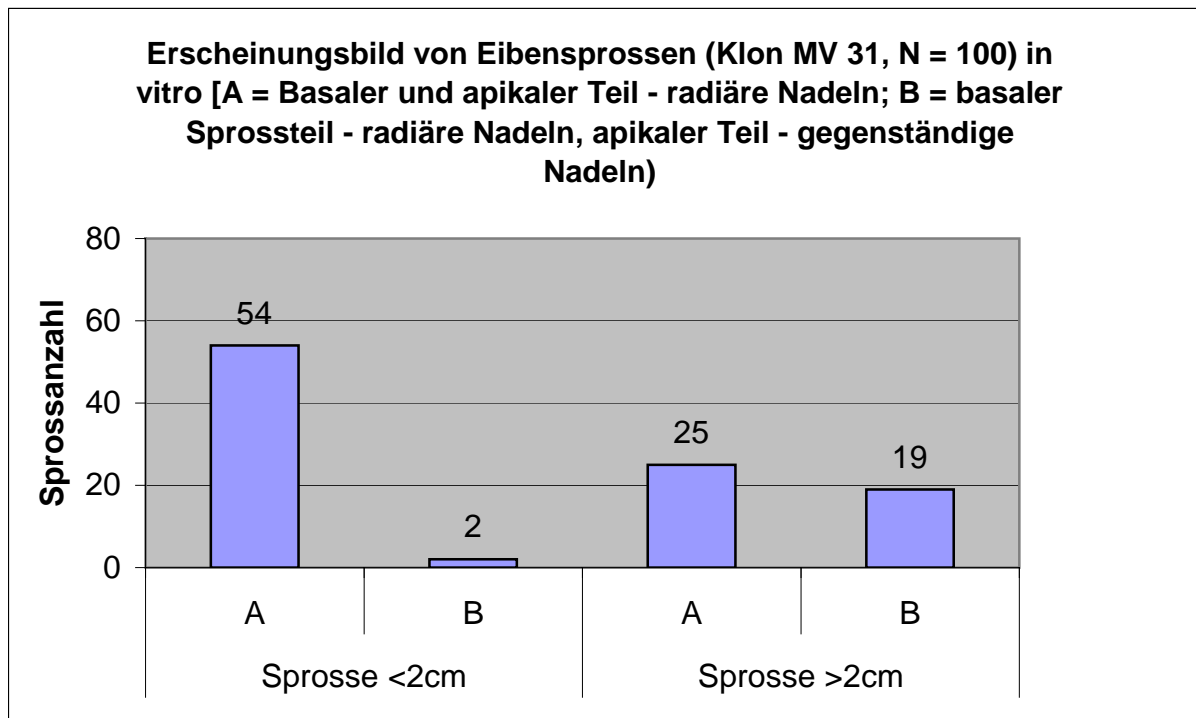


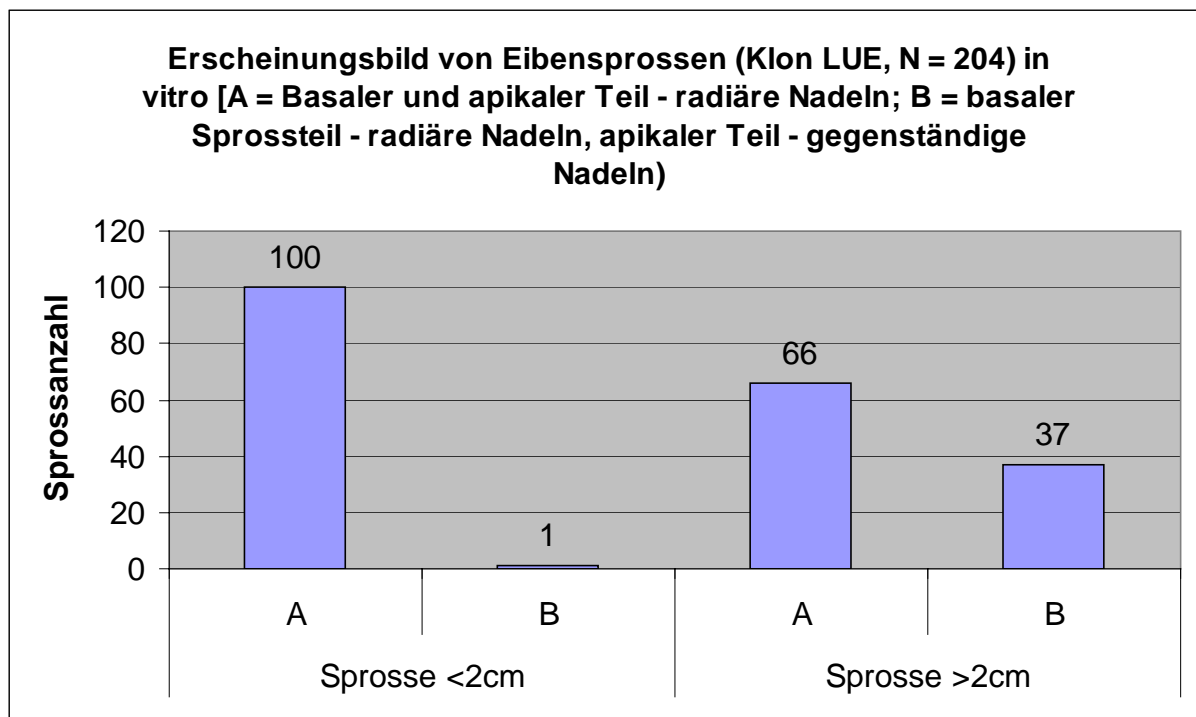
Abb. Benadelungsformen von Taxus-Sprossen in vitro (links = radiär angeordnete Nadeln; Mitte u. rechts – basal = radiär angeordnete Nadeln , apikal = gegenständige Nadeln)



Auch im Vermehrungsmedium WZ fand nach mehrfacher Subkultivierung bereits eine Sprosstreckung statt. Die meisten der kleineren Sprosse (< 2 cm) aller drei Klone wiesen noch eine radiäre Benadelung auf. Die längeren Sprosse hingegen zeigten im apikalen Bereich oft eine zweizeilige gegenständige Benadelung, wie sie bei Altbäumen auftritt.



Da es sich bei den betrachteten Klonen (MV38, MV31 und LUE) um Material adulter Ausgangsbäume handelte, war das Auftreten dieser Benadelungsform (zweizeilig, gegenständig) nicht erstaunlich.



Obwohl zu Beginn der geförderten Axillarknospensbildung die radiäre Nadelstellung deutlich erkennbar war, nahm die zweizeilige, gegenständige Nadelstellung mit zunehmender Sprosstreckung prozentual zu, trotz des Fortbestehens des Cytokinineinflusses (Zeatin). Verstärkt trat diese Benadelungsform jedoch nach Einsatz der für die Sprosstreckung als optimal beurteilten Nährmedien mit geringen TDZ-Konzentrationen (0,01 mg/l) auf.

Dies steht im Widerspruch zu der Aussage der Autoren um Chang et al. (2001), die eine mögliche Verjüngung durch die In-vitro-Kultur postulieren und dies an der radiären Benadelung entstehender Knospen demonstrieren wollen. Eine Verjüngung ist, trotz des Erscheinungsbildes der zweizeiligen Benadelung, nicht ausgeschlossen, bedarf aber in diesem Fall sicher anderer Nachweiskriterien.

Mit zunehmender Sprosslänge, auch auf Streckungsmedien mit geringen TDZ-Konzentrationen sowie ohne Wachstumsregulatoren, nahm die zweizeilige Nadelstellung zu (s. obige Abbildungen).

Nach der Phase der Bewurzelung (7 Monate) und einer sich anschließenden 5-monatigen Erdkultur im Gewächshaus bestätigte sich dieses Erscheinungsbild der Benadelung. Es war eine Zunahme des Anteils der größeren Sprosse feststellbar, die eine zweizeilige Benadelung aufwiesen.

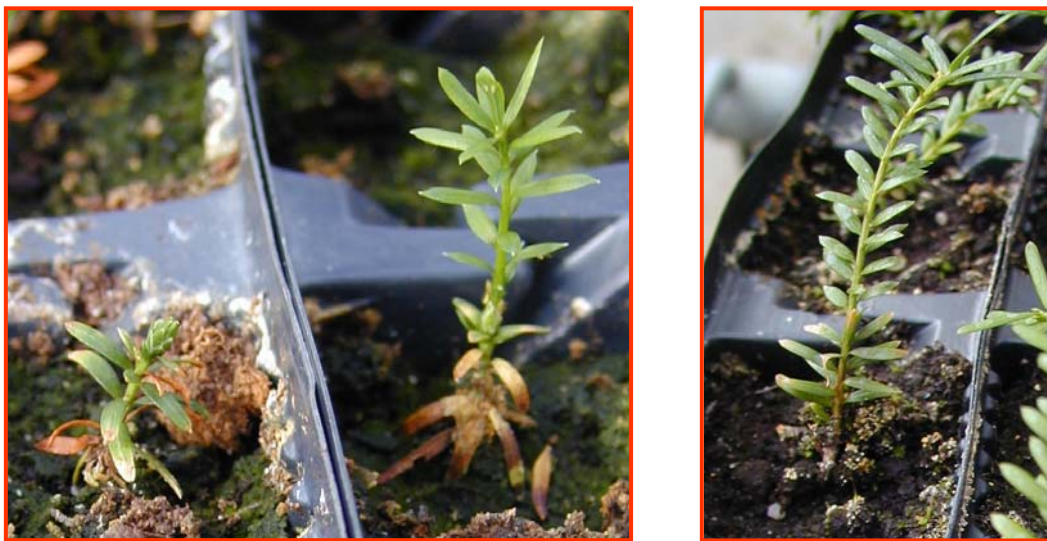
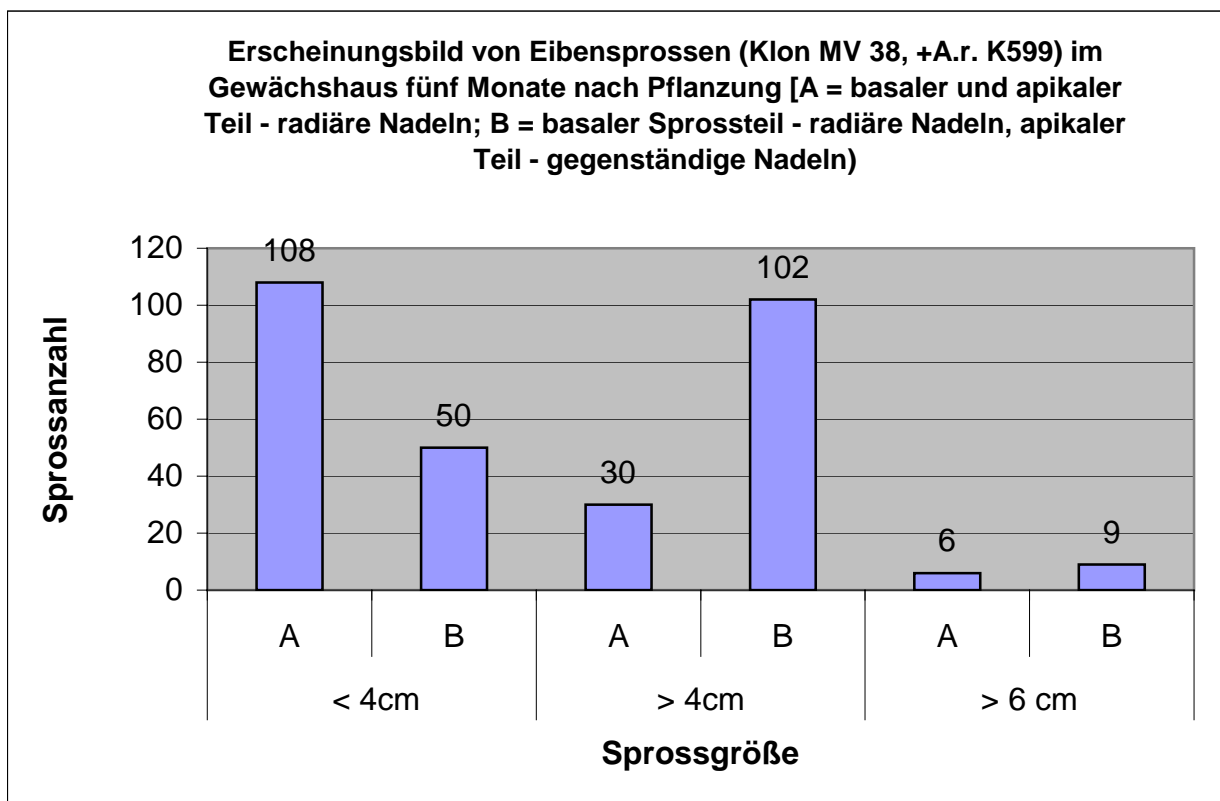
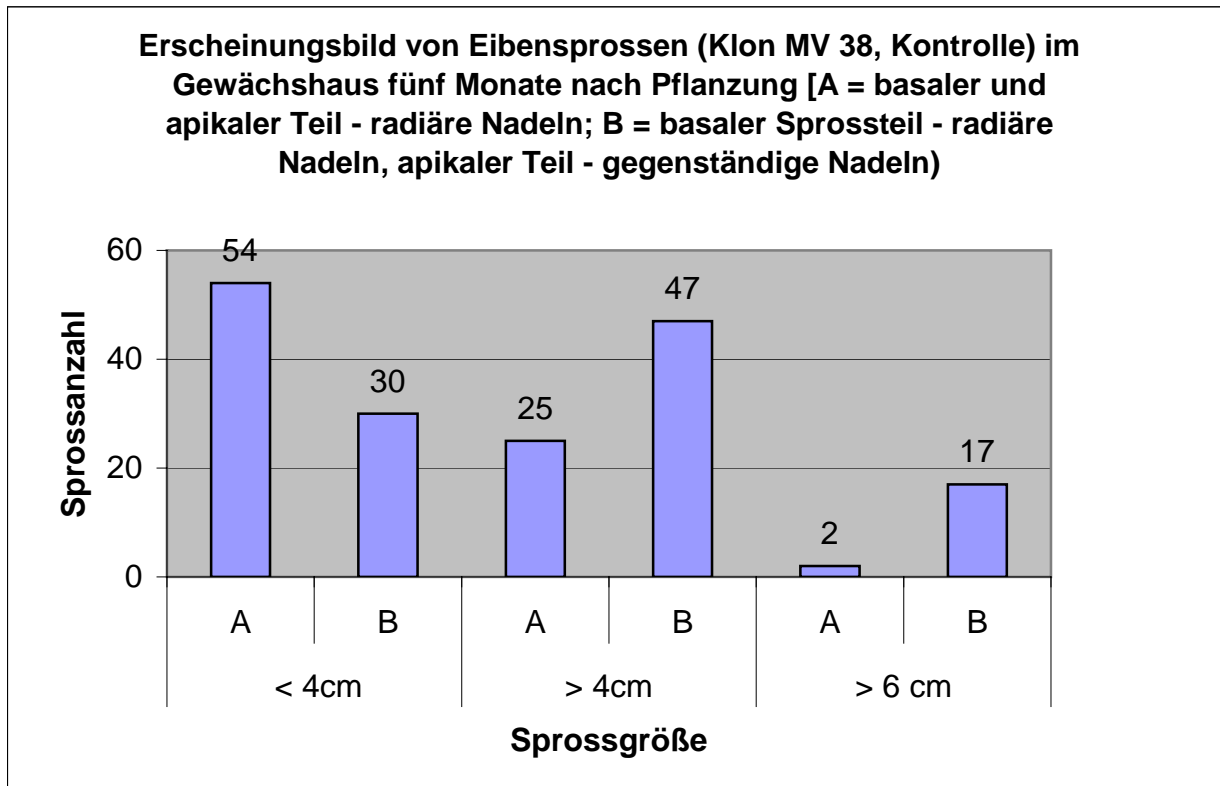
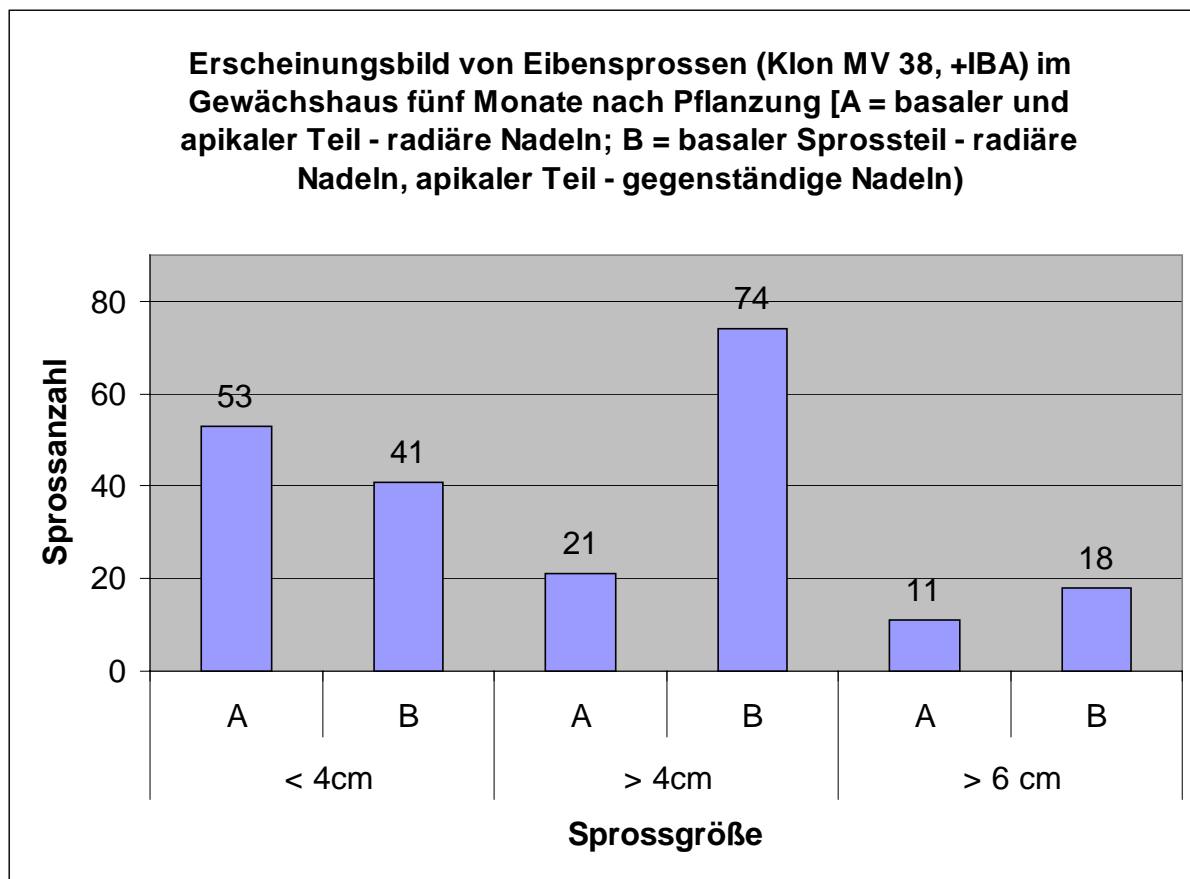


Abb. Benadelungsformen von mikrovermehrten Taxuspflanzen in der Erdkultur (links = radiär angeordnete Nadeln; rechts – basal = radiär angeordnete Nadeln , apikal = gegenständige Nadeln)

Radiäre Benadelung des Gesamtsprosses (hier als Bonitur A bezeichnet) trat bevorzugt bei kleineren Sprossen, analog der In-vitro-Kultivierung auf. Die basale radiäre Benadelung, die sich im apikalen Teil des Sprosses jedoch in eine zweizeilige Benadelung wandelte (hier als Bonitur B bezeichnet) trat zunehmend bei längeren Sprossen > 4 cm auf.

Eine direkte Beziehung des Nadelhabitus der mikrovermehrten Sprosse in der Erdkultur zur gewählten Induktion der Bewurzelung (Kontrolle, *Agrobacterium-rhizogenes*-Behandlung oder Auxinapplikation [IBA]) ist nicht erkennbar, wie die folgenden drei Grafiken zeigen.





Die Beobachtung der Sprosse nach der Überführung ins Freiland wird zeigen, ob im Verlauf der Jahre eine ähnliche Erscheinung auftritt oder ob die von Chang et al (2001) getroffene Feststellung zutrifft, dass sich plagiotrope Stecklinge adulter Eiben über einen Zeitraum von 6 Jahren nicht zum orthotropen Wuchs bewegen lassen.

Sollte eine Verjüngung durch die In-vitro-Kultur eingetreten sein, so sollte ein orthotroper Wuchs erreicht werden können, vor allem wenn sich das Wurzelsystem ausgebildet hat. Da es sich bei dem gewählten Klon (MV 38) um einen Klon handelt, der aufgrund seines raschen Wurzelwachstums ausgewählt wurde, ist die Chance auf eine spätere Veränderung des Wuchsverhaltens möglich.

5. Bereitstellung von Pflanzenmaterial für weiterführende Untersuchungen

5.1 Bereitstellung von Material für analytische Untersuchungen

Im Rahmen des Projektes wurde nachfolgend aufgelistetes Material für die Untersuchungen durch die Projektpartner bereitgestellt. Wurzeln aus Hydrokulturen dienten dabei der Isolation von Enzymen, Proteinen und DNS. Die Nadelproben waren vorrangig für die Bestimmung der Taxol- bzw. DAB-Gehalte vorgesehen.

6.11.03 /MaterialPham2

Material von Taxus für Untersuchungen von Frau Pham

Nadeln der Säuleneibe 1

Dieses Material war vorgesehen für Untersuchungen des DAB- und Taxol-Gehaltes in Abhängigkeit von Verwundung und Lagerung, d.h. zur Klärung der Frage, ob abgeschnittene und zerkleinerte Nadeln im Laufe der Zeit mehr Taxane infolge des Schnitt- oder Lagerungsstress bilden.

Wurzeln verschiedener Eibenklone aus Sachsen (Herkunft: SN = Sachsen), die beim Umtopfen anfielen.

Anzahl der Klone = 4

Anzahl der Pflanzen pro Klon = 5

Abgesteckt wurden sehr kleine Stecklinge (ca. 10 cm) im September 1999, die Pflanzen wurden getopft im Januar 2000 in 9er Töpfe und im September 2000 umgetopft in 13er Töpfe der Standort der getopften Pflanzen war die Freifläche der Baumschule. Die Pflanzen standen auf Holzhackschnitzeln, in welche die Wurzeln außerhalb des Topfes einwuchsen.

Die Wurzeln außerhalb des Topfes wurden abgetrennt und eingefroren.

SN 125 = 77g FM/5 Pfl.

SN 120 = 57 g FM/ 5 Pfl.

SN 127 = 25 g FM/ 5 Pfl.

SN 40 = 48 g FM/ 5 Pfl.

3.03.04/MaterialPham4

Material von Taxus für Untersuchungen von Frau Pham

Zweige der Säuleneiben 1 und 2 (ca. je 1 kg für Nadeluntersuchungen)

je 1 Steckling LÜRSEN aus der Hydrokultur und aus der Sandkultur

12.03.04/MaterialPham4

Zweige von 3 Alteibenklonen mit männlichen Blüten (Herkunft Kloster Chorin)

Untersuchungen in Zusammenhang mit dem hohen Taxol-Gehalt der männlichen Blüten bei der untersuchten Säuleneibe

Nummern :

Nr. 8 (Kloster Chorin)

Baum rechts der Treppe

Baum links der Treppe

13.09.04/Material Pham5

Material von Taxus für Untersuchungen von Frau Pham

Zweige der Säuleneiben 1 und 2

Sowie von Baum 3 am Rollgewächshaus auf dem Institutsgelände in Waldsieversdorf

ca. 300 g/ Probe

15.12.03/Material für Dr. R. Zocher

(Proteomanalyse)

2 Experimente zur Stimulierung der Biosynthese durch MeJA

(50 μ M und 223 μ M MeJA)

12, 24, 36 und 48 Stunden,

Klon LÜRSEN, weiße Wurzelspitzen)

22.09.03/Material für Dr. R. Zocher

Restmaterial geerntet.

Weißer Wurzelspitzen

Taxus LÜRSEN 1 Beutel

Taxus B1 “

Taxus B2 “

Taxus B4 “

Wurzelspitzen braun (ältere Teile der Wurzel)

Taxus LÜRSEN 1 Beutel

Taxus B2 “

5.2 Bereitstellung von Material für die Anlage zweier Feldversuche in Thüringen

Auf Anregung durch das IBA Heiligenstadt wurden ca. 1800 Eibenpflanzen, welche für Untersuchungen zur Stecklingsvermehrung angezogen worden waren, am 29.09.04 durch Herrn Kohlstedt (Leinefelde) abgeholt und werden nach Anfertigung eines Versuchsplanes in Thüringen auf zwei Flächen unterschiedlicher Bodenbeschaffenheit gepflanzt. Zusätzlich werden generativ vermehrte Eiben aus Thüringen in die Pflanzung einbezogen. Diese Klone sollen später auf den Taxol- bzw. DAB-Gehalt untersucht werden.

Abb. Pflanzenbereitstellung für die Übergabe an den Projektpartner IBA



Pflanzenherkunft u. Bezeichnung:

Sachsen-Anhalt - ST
Mecklenburg- Vorpommern - MV
Chorin - Co
Chorin Altbaum - Co Ab
Berlin Weckwerth (Kladow)– BE

Informationen zu diesem Material wurden auch Herrn Ackermann, der im Auftrag des IBA arbeitet, als Dateien per Email bzw. als Ausdrucke zur Verfügung gestellt.

Liste übergebener Eibenpflanzen

<u>Klon Nr.</u>	<u>Anz.d.Pfl.</u>	<u>Behälter</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Forstamt</u>
ST 1c	7	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 4b	2	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 7a	3	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 7b	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 7c	2	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 9a	5	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 9c	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 11a	11	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 11b	13	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 11c	7	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 16a	5	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 16b	4	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 16c	3	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 16d	14	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 19a	8	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 19b	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 20a	6	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 22B	7	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 22C	5	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 24A	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 24B	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 25C	3	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 25F	5	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 25K	5	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 25L	9	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 25o	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 25P	18	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 27	11	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 28f	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 28o	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 29a	3	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 30a	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 31a	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 34	5	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 35a	3	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 35b	2	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 35c	13	3 Liter Container		Thale,Rev.Hexentanzplatz
ST 35d	5	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 37a	2	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 37b	2	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 38a	12	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 38c	14	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 38d	9	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 39a	5	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 40a	8	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 40b	2	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 41d	5	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 41e	1	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 42a	9	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 42b	12	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
ST 43a	8	3 Liter Container		Thale,Rev. Hexentanzplatz
MV 14	1	5 Liter Töpfe	Westernbrügge	Bad Doberan
MV 15	1	5 Liter Töpfe	Jasnitz 1	Jasnitz
MV 17	2	5 Liter Töpfe	Jasnitz 3	Jasnitz
MV 31	86	3 Liter Container	Falkenhagen 4	Poggendorf

MV 31	188	13er Töpfe	Falkenhagen 4	Poggendorf
MV 31	71	3 Liter Töpfe	Falkenhagen 4	Poggendorf
MV 38	81	3 Liter Töpfe	Griebenow 7	Poggendorf
MV 38	190	13er Töpfe	Griebenow 7	Poggendorf
MV 38	18	3 Liter Container	Griebenow 7	Poggendorf
MV 58	32	3 Liter Töpfe	Klevenow	
MV 58	41	13er Töpfe	Klevenow	
MV 58	8	3 Liter Container	Klevenow	
CoI 12	1	3 Liter Container	Kloster Chorin	Chorin
CoI 18	2	3 Liter Container	Kloster Chorin	Chorin
CoI 19	4	3 Liter Container	Kloster Chorin	Chorin
CoI 29	4	3 Liter Container	Kloster Chorin	Chorin
CoI 8	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoI 18	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoI 22	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoI 27	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoI 28	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoI 29	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoI 30	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 5	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 7	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 9	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 14	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 16	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 18	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 40	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 41	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 42	2	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 46	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 47	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 48	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 55	1	5 Liter Töpfe	Kloster Chorin	Chorin
CoII 19	18	3 Liter Container	Kloster Chorin	Chorin
CoII 23	2	3 Liter Container	Kloster Chorin	Chorin
CoII 45	10	3 Liter Container	Kloster Chorin	Chorin
CoII 83	12	3 Liter Container	Kloster Corin	Chorin
BEW 1	28	3 Liter Container	Wekwerth	Berlin
BEW 2	20	3 Liter Container	Wekwerth	Berlin
BEW"Kladow"	11	3 Liter Container	Kladow	Berlin
Wsd. B2	156	5 Buchcontainer	Pförtnerhaus 2	Müllrose,Rev.Waldsieversdorf
Wsd. B3	94	2 Buchcontainer	Rollgewächshaus	Müllrose,Rev.Waldsieversdorf
Wsd. B3	13	Zusammen in	Rollgewächshaus	Müllrose,Rev.Waldsieversdorf
Wsd. B4	9	1 Buchcontainer	Fellner	Müllrose,Rev.Waldsieversdorf
Wsd. B4	51	2 Buchcontainer	Fellner	Müllrose,Rev.Waldsieversdorf
LÜRSSEN	447	14 Buchcontainer		Forstbaumschule LÜRSSEN, Halle
Pflanzen insgesamt:	1905			
	507	3 Liter Container		
	184	3 Liter Töpfe		
	419	13er Töpfe		
	25	5 Liter Töpfe		
	24	Buchcontainer		

6. Veranstaltungen und Veröffentlichungen im Berichtszeitraum

„Workshop - Nachhaltigkeit biotechnologischer Prozesse und Produkte“, Frankfurt/Main, 03. u. 04. 11. 2003

Poster:

Lauckner, G.; Frense, D.; Lisicki, D.; Pflieger, C.; Becker, M.; Häupke, K.; Hensel, J.; Hornbogen, T.; Pham, L.H.; Zocher R. und Ewald, D: Enzymatische Semisynthese von Baccatin III als Beitrag zur nachhaltigen Gewinnung von Pharmaka der Taxan-Reihe, Frankfurt/Main, 03. u. 04. 11. 2003.

Ewald, D. Micropropagation of Taxus – experiences and problems. Heraklion/Kreta 19.11.2004. Teilnahme am vierten Meeting der Arbeitsgruppe 1 "Developmental biology of regeneration" der COST-Aktion 843 " Quality enhancement of plant production through tissue culture" vom 18.11.- 20.11.2004, Heraklion/Kreta

7. Literatur:

CHANG, S.-H., HO, C.-K., CHEN, Z.-Z. and TSAY, Y.-J.: Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. Plant Cell Reports, Volume 20, Issue 6, pp 496-502 (2001).

EWALD, D, SÜSS, R.: A system for repeatable formation of elongating adventitious buds in Norway spruce tissue cultures. Silvae Genetica 42 (4-5); 169 – 175 (1993).

EWALD, D., KRETZSCHMAR, U. AND Y. CHEN. Continuous micropropagation of juvenile larch from different species via adventitious bud formation. Biologia plantarum 39 (3) : 321 - 329 (1997).

EWALD, D. Is plagiotropic growth in micropropagated larch a marker for ageing? Proceedings of the international congress "Application of biotechnology to forest genetics". Sept 22 -25, 1999 Vitoria-Gasteiz, Spanien, 479 - 486, , ISBN 84-7821-421-6 (2000).

EWALD, D.: Common principles in adventitious bud formation and development in conifers. COST 843, WG1: Developmental Biology of Regeneration, 1st Meeting, 12-15 Oct 2000, Geisenheim Germany 21-22;
http://www.mnd.fh-wiesbaden.de/fag/bio/bo/cost_843/html/WG1-Germany-00.pdf

MEIER-DINKEL, A; SIEBERT, R.: Influence of the plant growth regulators Benzylaminopurine, Thidiazuron and Indolebutyric acid on shoot multiplication, adventitious rooting and apical necrosis of *Quercus robur* clone NL100A and NL100R, COST 822 - Report of activities 1996, Development of integrated systems for large-scale propagation of elite plants using in vitro techniques, ed.: European Commission, F. Ó Ríordáin, 117-125 (1996)

MITHILA, J., HALL, J.C., VICTOR, J.M.R. und SAXENA, P.K.: Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha*. Wendl.). Plant Cell Rep. 408 – 414, 2003.

PIEPHO, H.P. Multiple treatment comparisons in linear models when the standard error of a difference is not constant. Biometrical Journal 42 (7): 823-835, 2000.

8. Anhang:

Liste verwendeter, modifizierter Basalnährmedien; (Angaben in mg/l)

WPM-Medium war das Basismedium für die In-vitro-Vermehrung, L9 für die Wurzelinduktion, SH1/2 wurde zum Befeuchten der Torfquellöpfchen verwendet

	WPM	LS	SH
Makroelemente:			
KNO ₃		1900	2500
Ca(NO ₃) ₂ * 4H ₂ O	556		
NH ₄ NO ₃	400	1650	
(NH ₄) ₂ SO ₄			
KH ₂ PO ₄	170	170	
NH ₄ H ₂ PO ₄			300
NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O			
Na ₂ HPO ₄			
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	96		200
CaCl ₂ * 6 H ₂ O		655	
KCl			
K ₂ SO ₄	990		
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	370		400
MgSO ₄ * 6 H ₂ O		345	
Eisenkomplex:			
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	27,8	27,8	15
Na ₂ EDTA* 2 H ₂ O	37,3	37,3	20
Mikroelemente:			
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	5,0
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	8,6	8,6	1,0
MnSO ₄ *H ₂ O	22,3	16,9	10
MnSO ₄ *4H ₂ O			
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25	0,25	0,1
KI		0,83	1,0
CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,25	0,025	0,2
CoCl ₂ *6 H ₂ O		0,025	0,1
NiCl ₂			
Vitamine:			
Myoinosit	100	100	1000
Thiamin*HCL	1,0	10	5,0
Nikotinsäure	0,5		5,0
Ca-Pantothentat			
Pyridoxin-HCl	0,5		0,5
Folsäure			
Biotin			
Glycin	2,0		
L-Glutamin			

Zusammensetzung verwendeter Nährmedien:

Bezeichnung	Makro-el.	Mikro-el.	Fe-Chel.	Inosit	Thiamin	Saccharose	NH ₄ NO ₃	PVP	Gln	Arg	AC	pH
WPM	1	1	1	1	1	20000						5,7
L9	1/3	1	1	1	1	5000						5,7
SH 1/2	1/2	1/2	1/2									5,7

PVP - Polyvinylpyrrolidon

Arg - Arginin

L modifiziert nach:

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F.: Organic growth factors requirement of tobacco tissue cultures.

Physiol. Plant. 18 N 1 p. 100-127, 1965.

SH nach:

SCHENK, R.U. und HILDEBRANDT, A.C.: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. **50**, 199, 1972.

WPM nach:

LLOYD, G. und MCCOWN, B. : Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Int. Plant Prop. Soc. Proc. **30**, 421, 1980. (1981)

Danksagung

Den Kollegen der Gärtnerei des Institutes wird für die Betreuung des Pflanzenmaterials im Gewächshaus und im Baumschulbereich gedankt.

Fr. Gisela Naujoks danke ich für die kritische Durchsicht dieses Berichtes.