

# Versuchsbericht Bothmer- Linden

## *Tilia europaea* 'Konings'



Abb. 1: Bothmer- Linden der Festonallee zum Schloss Bothmer führend, M. Zander, 2016)

### Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	In-vitro-Kultur.....	2
1.	Phase: Inkulturnahme in vitro .....	2
2.	Phase: Hochvermehrung in vitro .....	7
	Vermehrungsvorversuch .....	10
	Vermehrungshauptversuch .....	12
3.	Phase: Bewurzelung in vitro .....	15
4.	Phase: Akklimation des Pflanzenmaterials im Gewächshaus .....	17
3	Neuetablierung des Pflanzenmaterials .....	19
4	Fazit .....	20

## 1 Einleitung

Die Festonallee (franz.: feston = Girlande) zum Schloss Bothmer führend, ist in Deutschland einzigartig. Dabei säumen diese 270 m lange Allee Holländische Linden (*Tilia europaea* 'Koningslinde'), die in 2,50 m Höhe besonders beschnitten wurden und ursprünglich miteinander verwachsen waren.

Die Festonallee wurde nach barocken Gestaltungsprinzipien 1726-32 als damals einzige Zufahrt angelegt. Sie ist direkt auf die Mittelachse des Schlosses ausgerichtet. Bis heute begleiten den spannungsvollen Wegeverlauf noch 65 Bäume aus dem 18. Jahrhundert. Unterlassene Schnittmaßnahmen haben in der Vergangenheit zu großen Ausbrüchen geführt. In der Folge haben sich die Stämme aufgespalten. Heute werden die Triebe alle drei Jahre vollständig entfernt, um die Kronen zu entlasten. Für die Erhaltung dieser kulturhistorisch einmaligen Allee werden künftige Nachpflanzungen mit einem möglichst einheitlichen Erscheinungsbild angestrebt. Gleiche Blatt- und Triebfärbung, Austriebszeitpunkt und Wuchsform sind nur durch genetisch identische Linden zu erreichen.

Für die Erhaltung von Parkbäumen besitzt die In-vitro-Kulturführung auf Grund der genetisch-identischen Vermehrung einen hohen Stellenwert. Es können Klone herangezogen werden, die sich auf eigener Wurzel kultivieren lassen.

Bei der In-vitro-Kultur handelt es sich um die Kultivierung von isolierten Pflanzenteilen, so genannten Explantaten, außerhalb des intakten pflanzlichen Organismus auf oder in Nährmedien unter sterilen Bedingungen im Kulturgefäß. Dabei übernimmt das Nährmedium die Funktion benachbarter Pflanzenzellen im Gesamtorganismus.

Im Forschungslabor des Fachgebietes Urbane Ökophysiologie der Pflanzen, der Humboldt-Universität zu Berlin werden derzeit verschiedene Baumarten aus 12 Parks bzw. Gemeinden in Deutschland auf Etablierung mit anschließender Vermehrbarkeit in vitro untersucht. In die Untersuchungen sind bisher 10 verschiedene Baumarten einbezogen worden. Dabei fanden folgende Explantate als Ausgangsmaterial Verwendung: Sprosssteile (Kopf- und Teilsprosse), Knospen und Meristeme.

Abhängig von der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials mussten verschiedene Desinfektionsmethoden erarbeitet werden, hinsichtlich unterschiedlicher Konzentrationen und Einwirkzeiten der verwendeten Chemikalien. In Bezug auf die Pflanzengesundheit zeigten sich bereits in der Anfangsphase der Etablierung die Schwierigkeiten des Alters des zur Verfügung stehenden Pflanzenmaterials. Es traten zahlreiche Kontaminationen auf (Bakterien, Pilze und endogene Bakterien), so dass eine Reihe von labortechnischen Methoden Einsatz fanden, um steriles Material für die Weiterkultur gewinnen zu können.

In diesem Versuchsbericht werden die Methoden der In-vitro-Kultur erläutert, die zur genetisch-identischen Erhaltung der *Tilia europaea* 'Koningslinde' eingesetzt wurden.

## 2 In-vitro-Kultur

### 1. Phase: Inkulturnahme in vitro

Der Beginn der In-vitro-Kultur erfolgt die Desinfektion des Pflanzenmaterials, um eine Sterilkultur zu erhalten. Das Ausgangsmaterial dienen abgeschnittene Triebe der Bothmer-Linden. Hierzu wurde das Pflanzenmaterial auf 1,5 - 2,5 cm lange Kopf- und Teilstecklinge (Explantate) mit mindestens einer Blattachselknospe geschnitten. Die Desinfektion dieser Explantate erfolgte zunächst für 1 min in 70 %igem Ethanol und anschließend in mehreren Versuchsvarianten mit 3 oder 5 minütiger Einwirkzeit im Desinfektionsmittel Natriumhypochlorid (NaOCl). Anschließend wurde dieses Pflanzenmaterial dreimal in sterilem, destilliertem Wasser gespült (Abb. 2).



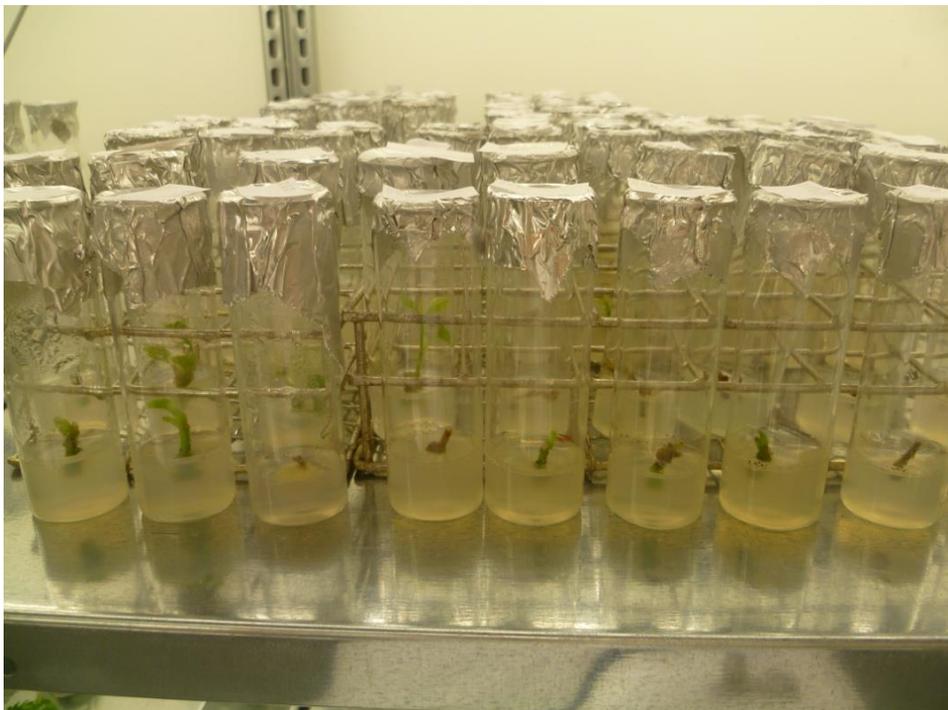
Abb. 2: Desinfektionsstrecke zur Überführung des Ausgangsmaterials in die Sterilkultur in vitro, (A. Schüttig, 2012)

Nachdem die Explantate gespült wurden, sind diese mit Hilfe von Skalpell und Pinzette am basalen Ende angeschnitten worden, um den Nährstoff- und Wasseraustausch mit dem Nährmedium zu garantieren (Abb. 3).

Anschließend wurden diese Explantate einzeln in Kulturröhrchen, welche mit Nährmedium gefüllt waren, überführt (Abb. 4).



**Abb. 3: Ausgangsmaterial für die In-vitro-Kultur: Lindenexplantate nach Desinfektion mit je einer Blattachselknospe, (A. Schüttig, 2012)**



**Abb. 4: Jeweils 1 desinfizierter Spross (Explantat) je Kulturröhrchen in der ersten Phase der Kulturführung, (A. Schüttig, 2012)**

Hierzu wird an einer Laminar-Flow-Box gearbeitet (Abb. 5). Diese ermöglicht, auf Grund des Entgegenströmens von steriler Luft, das Arbeiten unter Reinstbedingungen, welche die Voraussetzungen der In-vitro-Kultur sind.



**Abb. 5: Steriler Arbeitsplatz: Laminar-Flow- Box, (A. Schüttig, 2012)**

Eine Kontamination des Pflanzenmaterials mit pilzlichen oder bakteriellen Erregern führt zu Überwucherungen des Pflanzenmaterials und somit zum Ausfall der Kultur (Abb. 6).



**Abb. 6: Pilzliche Kontamination während der ersten Phase der Etablierung, (A. Schüttig, 2012)**

Es fanden drei aufeinander folgende Desinfektionsversuche statt, da eine erfolgreiche Etablierung des Pflanzenmaterials erst in der kommenden Vermehrungsphase zu sehen ist. Insgesamt wurden in diesen Untersuchungen 400 Explantate desinfiziert.

Hierbei zeigten sich mittelmäßige Etablierungserfolge in dieser ersten Phase der In-vitro-Kultur. Auf Grund von pilzlichen Kontaminationen gab es in den Versuchsvarianten insgesamt 84 Explantate, die verworfen werden mussten. Ein Absterben der Linden, hervorgerufen durch die toxische Einwirkung der verwendeten Chemikalie Natriumhypochlorid (NaOCl) trat bei insgesamt 131 Explantaten auf. Es ist immer eine schwierige Phase der Kulturführung, in der die Konzentration der einwirkenden Chemikalie sowie deren Einwirkzeit Einfluss auf das Überleben der Sprosssteile hat. Entweder leben die Sprosse, sind jedoch kontaminiert mit pilzlichen oder bakteriellen Erregern, oder die einwirkende Chemikalie hat diese anhaftenden Erreger erfolgreich abgetötet. Jedoch ist auch das Pflanzenmaterial von dieser Toxizität betroffen und kann dabei absterben. Somit muss ein geeignetes Desinfektionsverfahren erarbeitet werden.



**Abb. 7: Erste Phase der Kulturführung in Röhrchen (links: vitaler Spross mit 2 noch nicht ausgetriebenen Knospen; rechts: ein neuer Spross ist aus der Knospe ausgetrieben und kann nun vereinzelt werden), (A. Schüttig, 2012)**

Im Kulturraum werden die Pflanzen in ihren Kulturgefäßen bei gesteuerten Bedingungen von 24 °C und 16/8 Tag-Nachtrhythmus aufgestellt (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10).



Abb. 8: Kulturraum mit gesteuerten Wachstumsbedingungen, (A. Schüttig, 2012)



Abb. 9: Lindensprosse nach Teilung (Hochvermehrung) auf Nährmedium gesetzt, (A. Schüttig, 2012)



Abb. 10: Lindensprosse 6 Wochen nach Teilung auf dem Nährmedium, (A. Schüttig, 2012)

## 2. Phase: Hochvermehrung in vitro

Die 185 äußerlich sterilen Explantate wurden in die Vermehrungsphase überführt. Hierzu werden dem Nährmedium, welches die Versorgung der Pflanzen mit Nährstoffen übernimmt, Phytohormone zugegeben. Erneut fanden mehrere Versuchsvarianten statt, die unterschiedliche Arten und Konzentrationen dieser Phytohormone (Cytokinine) beinhalteten. Diese sollen das Austreiben der Achselknospen anregen. Die neu entwickelten Sprosstteile können dann vom Ausgangsspross, erneut unter sterilen Bedingungen, mit Skalpell und Pinzette abgetrennt und auf neues Nährmedium aufgesetzt werden (Abb. 11 und Abb. 12).



Abb. 11: Vermehrungsphase: Bearbeiten des Vermehrungspulks mit Skalpell und Pinzette, (A. Schüttig, 2012)



Abb. 12: Einsetzen der vereinzelt Sprosstteile ins Kulturgefäß auf frisches Nährmedium, (A. Schüttig, 2012)

Um ein geeignetes Medium zur Vermehrung der Sprosse von *Tilia europaea* 'Konings' zu finden, wurden in einem Vorversuch (VV) vier verschiedene Medienvarianten mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen getestet. Parallel gab es zwei Kontrollmedien ohne zusätzliche Cytokinine oder Auxine. Vermehrungsmedium (VM) 1 war ein stickstoffreduziertes Medium mit 825 mg/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Ammoniumnitrat) modifiziert nach MURASHIGE und SKOOG (1962), VM 2 ein modifiziertes Medium nach MURASHIGE und SKOOG (MS) (1962) mit 1650 mg/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Im Hauptversuch (HV) sind aufgrund der Ergebnisse des Vorversuchs nur noch modifizierte MS-Medien mit regulären Ammoniumnitrat-Gehalt verwendet worden, zwei weitere modifizierte MS-Medien mit erhöhten BAP-Gehalten kamen hinzu (Tab.1).

Tab.1: Mediumvarianten des Vermehrungsversuchs und deren Hormonkonzentration an Cytokinin (BAP-Benzylaminopurin) und Auxinen (IES-Indolelessigsäure) in mg/l im Vorversuch (VV) und Hauptversuch (HV)

Vermehrungsmedium*	BAP in mg/l	IES in mg/l	Versuch
VM 1	-	-	VV, -
VM 1.1	1	0,01	VV, -
VM 1.2	1,5	0,01	VV, -
VM 2	-	-	VV, HV
VM 2.1	0,5	-	VV, -
VM 2.2	1	-	VV, HV
VM 2.3	1,5	-	- , HV
VM 2.4	2	-	- , HV

\*VM 1 mit 825 mg/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, VM 2 mit 1650 mg/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, jeweils modifiziert nach MURASHIGE und SKOOG (1962)

Die vierwöchigen Subkulturen im Vorversuch erfolgten mit je einem Spross pro Kulturröhrchen, um bei geringem Stichprobenumfang von nur 10 Sprossen pro Medienvariante die Kontamination mit Pathogenen weitestgehend auszuschließen. Für jede Medienvariante wurden fünf Teilsprosse und fünf Kopfsprosse aufgesetzt. Um statistisch auswertbare signifikante Unterschiede ermitteln zu können, wurde der Stichprobenumfang im Hauptversuch auf 30 Explantate je Medienvariante erhöht. Es wurden dabei je Erlenmeyerkolben drei Sprosse aufgesetzt.

### **Auswertung**

Die erste Auswertung des Vorversuchs hinsichtlich Sprosslänge und Sprossanzahl fand vier Wochen nach dem Aufsetzen auf das Nährmedium Mitte Juni 2012 statt. Die Auswertung des Hauptversuchs Ende Juli 2012. Mit dem Skalpell wurden die verzweigten Sprosse voneinander getrennt, der Kallus gegebenenfalls entfernt und danach auf eine sterile Glasplatte gelegt, unter der sich Millimeterpapier mit einer aufgezeichneten Millimeterskala befand (Abb. 13).

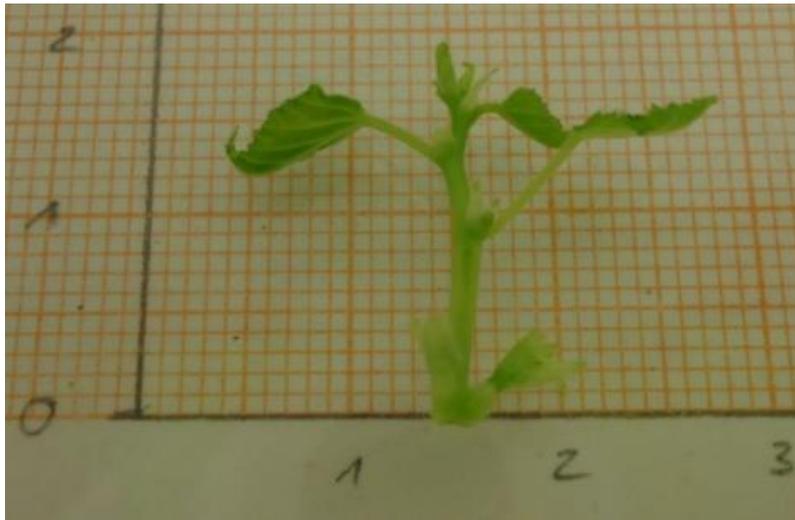


Abb. 13: Auf Millimeterpapier gezeichnete Skala zur Bonitur der Sprosslänge, (A. Schüttig, 2012)

Die ausgemessenen Sprosse wurden nach der Bonitur wieder in etwa 1 cm große Kopfsprosse und gegebenenfalls Teilsprosse geteilt und direkt auf neues Vermehrungsmedium der gleichen Varianten umgesetzt, um die zweite Subkultur zu beginnen. In der ersten Subkultur des Vorversuchs sind noch Wulstrandröhrchen verwendet worden, fortan wurden Erlenmeyerkolben genutzt, in die jeweils drei Sprosse pro Glas aufgesetzt wurden. Diese boten den Explantaten mehr Platz und minimierten dadurch Blattverfärbungen durch Kontakt mit dem Kulturgefäß.

Zur Berechnung wurden neben der Vermehrungsrate die durchschnittliche Sprosslänge und die Vitrifikationsrate herangezogen:

$$\text{Vermehrungsrate} = \frac{\text{Sprossanzahl nach der Vermehrung}}{\text{Sprossanzahl vor der Vermehrung}}$$

$$\text{Durchschnittliche Sprosslänge [cm]} = \frac{\text{Summe aller Sprosslängen}}{\text{Anzahl der Sprosse nach der Vermehrung}}$$

$$\text{Vitrifikationsrate [\%]} = \frac{\text{Anzahl der Sprosse nach der Vermehrung}}{\text{Anzahl der Sprosse mit Vitrifikation}} \times 100$$

## Vermehrungsvorversuch

Im folgenden Vorversuch wurde sowohl mit Teilsprossen als auch Kopfsprossen gearbeitet, um Unterschiede herausarbeiten zu können. Der errechnete Durchschnitt dieser verwendeten Sprossarten ist in „gesamt“ aufgeführt (Abb. 14).

### Vermehrungsraten

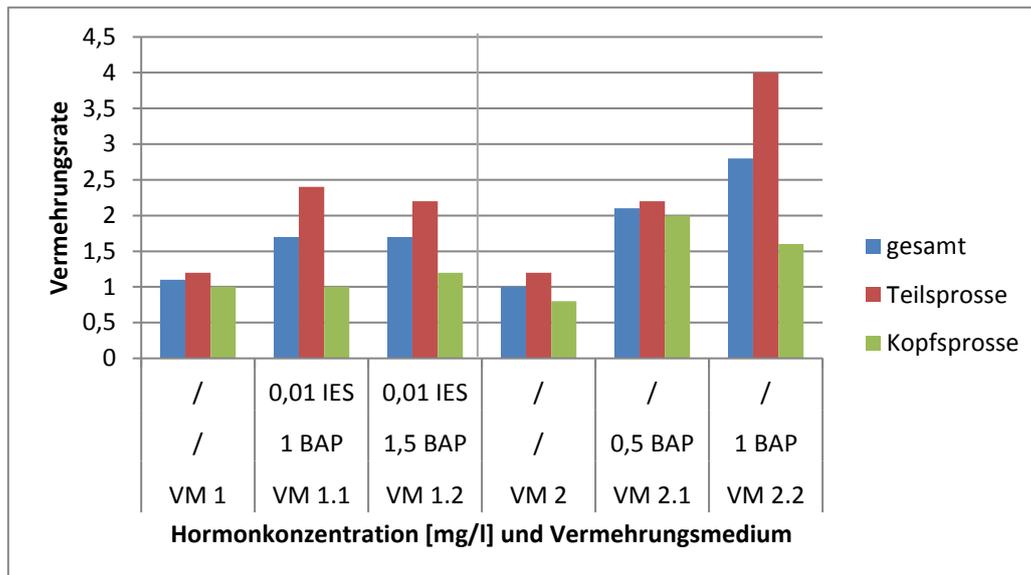


Abb. 14: Hormonabhängige Vermehrungsrate (BAP-Benzylaminopurin; IES-Indolessigsäure) der Teil- und Kopfsprosse auf verschiedenen Vermehrungsmedien (VM 1: mod. MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Gehalt; VM 2: mod. MS) im Vorversuch

Bei der Verwendung von VM 1.1 (modifiziertes MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> -Gehalt + 1 mg/l BAP + 0,01 mg/l IES) und VM 1.2 (modifiziertes MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Gehalt + 1,5 mg/l BAP + 0,01 mg/l IES) konnte jeweils eine Vermehrungsrate von 1,7 erreicht werden. Hier sind vor allem die Teilsprosse mit einer Vermehrungsrate von 2,4 bei VM 1.1 (MS mit NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Gehalt + 1 mg/l BAP + 0,01 mg/l IES) bzw. 2,2 bei VM 1.2 (modifiziertes MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Gehalt + 1,5 mg/l BAP + 0,01 mg/l IES) zu erwähnen. Bei den Kopfsprossen sind geringere Vermehrungsraten zu verzeichnen.

Auf VM 2.1 (modifiziertes MS + 0,5 mg/l BAP) hat sich die Sprossanzahl mit einer Vermehrungsrate von 2,1 verdoppelt und auf VM 2.2 (modifiziertes MS + 1 mg/l BAP) fast verdreifacht mit einer Vermehrungsrate von 2,8. Die höchsten Werte traten bei VM 2.2 (modifiziertes MS + 1 mg/l BAP) mit einer Vervielfachung der Teilsprosse auf 4,0 auf. Wie zu erwarten ist die Vermehrung auf den hormonfreien Kontrollmedien VM 1 (modifiziertes MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Gehalt) und VM 2 (modifiziertes MS) mit 1,1 und 1,0 weitestgehend ausgeblieben (Abb. 14).

## Durchschnittliche Sprosslängen

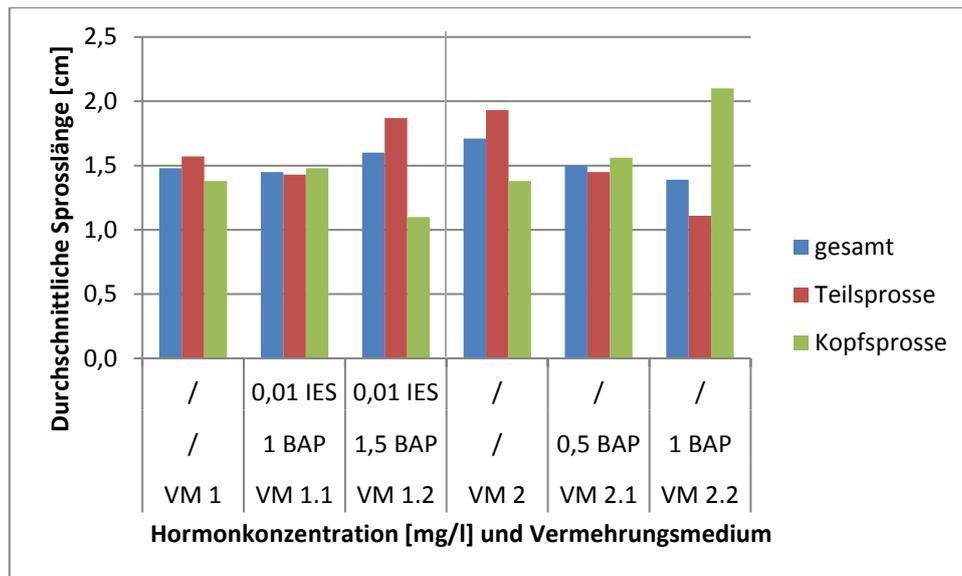


Abb. 15: Hormonabhängige (BAP-Benzylaminopurin; IES-Indolessigsäure) durchschnittliche Sprosslänge der Teil- und Kopfsprosse auf verschiedenen Vermehrungsmedien (VM 1: mod. MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Gehalt; VM 2: mod. MS) im Vorversuch

Die durchschnittliche Sprosslänge bei der Verwendung von Kontrollmedium VM 1 (modifiziertes MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Gehalt) lag bei 1,48 cm, bei VM 1.1 (modifiziertes MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Gehalt + 1 mg/l BAP + 0,01 mg/l IES) waren es 1,4 cm und bei VM 1.2 (modifiziertes MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Gehalt + 1,5 mg/l BAP + 0,01 mg/l IES) lag die Durchschnittslänge bei 1,6 cm. Die Sprosse auf dem Kontrollmedium VM 2 (modifiziertes MS) waren mit durchschnittlich 1,7 cm am längsten, auf VM 2.1 (modifiziertes MS + 0,5 mg/l BAP) lag der Durchschnittswert im Mittelfeld mit 1,5 cm und auf VM 2.2 (modifiziertes MS + 1 mg/l BAP) waren die Sprosse mit 1,4 cm am kürzesten. Beim Vergleich der durchschnittlichen Sprosslängen war bei den modifizierten, stickstoffreduzierten MS-Medien nach MURASHIGE und SKOOG (1962) kein eindeutiger qualitativer Trend ersichtlich. Bei den modifizierten MS-Medien mit regulärem Stickstoffgehalt wurde deutlich, dass mit steigendem Hormongehalt die Sprosslänge insgesamt abnahm. Die Vermehrungsraten des Vorversuchs lagen somit bei den Teilsprossen höher als bei den Kopfsprossen, da sich die Teilsprosse stärker verzweigt und vermehrt hatten (Abb. 15).

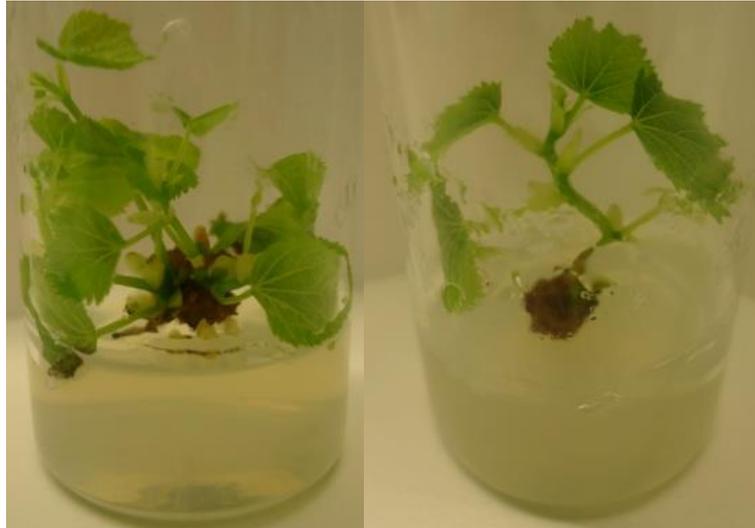


Abb. 16: Vergleich der Entwicklung und Sprossvermehrung eines Teilsprosses (links) und eines Kopfsprosses (rechts) auf VM 1.2 (mod. MS mit 0,5 NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> -Gehalt + 1,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l IES), (A. Schüttig, 2012)

Die Ursache für die bessere Verzweigung der Teilsprosse im Vergleich zu den Kopfsprossen und damit höheren Vermehrungsraten ist die Auxinverteilung im Spross. Durch das Entfernen der Triebspitze wurde die Seitensprossbildung angeregt. Die Teilsprosse sind kürzer geblieben, haben sich aber stärker vermehrt. Die Kopfsprosse hingegen wiesen aufgrund der Apikaldominanz eine stärkere Sprosstreckung der Explantate auf, verzweigten sich aber weniger häufig. Somit lässt sich sagen, dass in Hinblick auf die Vermehrung ein degressiv proportionales Verhältnis zwischen Vermehrungsrate und Sprosslänge besteht. Nimmt die Vermehrungsrate zu, nimmt die Sprosslänge ab und umgekehrt.

## Vermehrungshauptversuch

Im folgenden Hauptversuch wurde ausschließlich mit Kopfsprossen gearbeitet, da diese das einheitlichere und jüngere Ausgangsmaterial zur Vermehrung darstellen.

## Vermehrungsraten

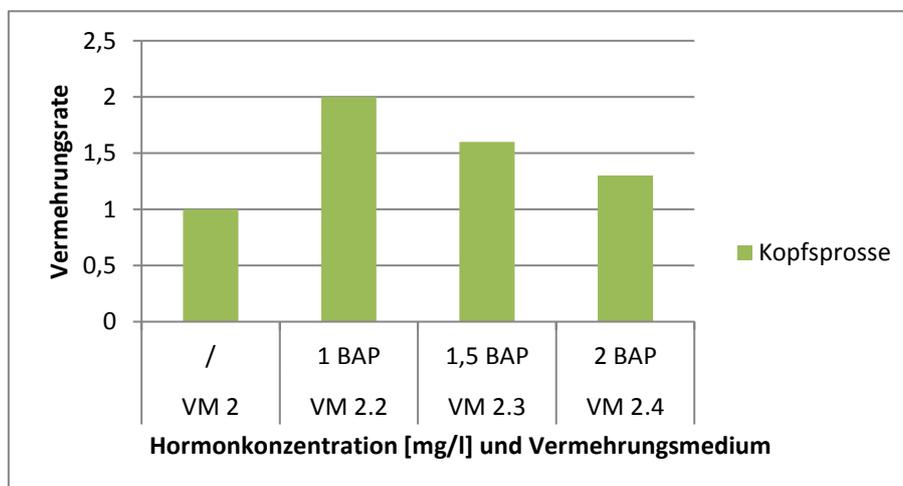


Abb. 17: Hormonabhängige Vermehrungsrate (BAP-Benzylaminopurin) der Kopfsprosse auf verschiedenen Vermehrungsmedien (VM 2: mod. MS) im Hauptversuch

Im Hauptversuch konnte die höchste Vermehrungsrate mit 2,0 auf VM 2.2 (modifiziertes MS + 1 mg/l BAP) erzielt werden. Die Sprossanzahl hat sich von 30 aufgesetzten auf 59 Sprosse fast verdoppelt. Auf VM 2.3 (modifiziertes MS + 1,5 mg/l BAP) erhöhte sich die Sprossanzahl auf 47 Sprosse mit einer Vermehrungsrate von 1,6 und auf VM 2.4 (modifiziertes MS + 2 mg/l BAP) ergab sich eine Sprossanzahl von 39 Sprossen mit einer Vermehrungsrate von 1,3. Auf dem hormonfreien Kontrollmedium VM 2 (modifiziertes MS) fand wiederum keine Vermehrung statt (Abb. 17).

## Durchschnittliche Sprosslängen

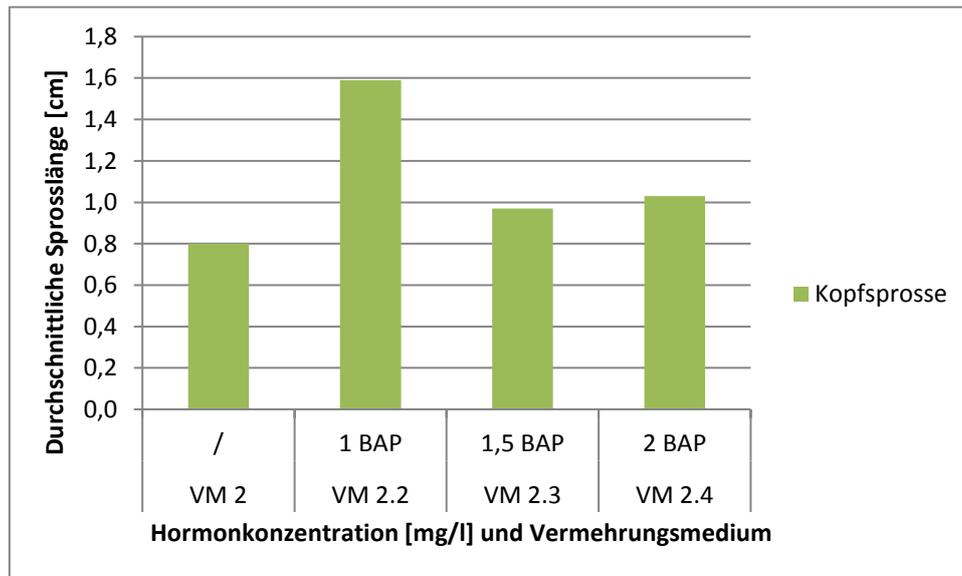


Abb. 18: Hormonabhängige (BAP-Benzylaminopurin) durchschnittliche Sprosslänge der Kopfsprosse auf verschiedenen Vermehrungsmedien (VM 2: mod. MS-Medium) im Hauptversuch

Die längsten durchschnittlichen Sprosslängen lagen im Hauptversuch bei 1,6 cm auf VM 2.2 (modifiziertes MS + 1 mg/l BAP). Niedrigere Werte ergaben sich bei VM 2.4 (modifiziertes MS + 2 mg/l BAP) mit 1,0 cm Durchschnitt, gefolgt von VM 2.3 (modifiziertes MS + 1,5 mg/l BAP) mit fast 1,0 cm. Die kürzesten Sprosse befanden sich auf dem hormonfreien Medium VM 2 (modifiziertes MS) mit einer Länge von 0,8 cm (Abb. 18).

Auffällig waren die Vitrifikationserscheinungen mit Zunahme des Cytokiningehalts im Medium, besonders bei der Verwendung von VM 2.4 (modifiziertes MS + 2 mg/l BAP) mit der höchsten verwendeten Cytokininkonzentration (2 mg/l BAP) im Versuch (Tab. 2).

Tab. 2: Anzahl Sprosse mit Vitrifikationserscheinung je Medienvariante (mod. MS-Medien: VM 2, hormonfrei; VM 2.2: 1 mg/l BAP; VM 2.3 mg/l BAP: 1,5; VM 2.4: 2 mg/l BAP) im Hauptversuch

Medium	Anzahl Sprosse nach Vermehrung	Anzahl Sprosse mit Vitrifikation	Vitrifikationsrate [%]
VM 2	29	0	0
VM 2.2	59	6	10,2
VM 2.3	47	6	12,8
VM 2.4	39	9	23,1

Nahezu jeder vierte Spross (23,1 %) auf VM 2.4 (modifiziertes MS + 2 mg/l BAP) ist durch Vitrifikation unbrauchbar geworden. Auf VM 2.2 (modifiziertes MS + 1 mg/l BAP) und VM 2.3 (modifiziertes MS + 1,5 mg/l BAP) lag der Ausfall an Sprossen bei 10,2 % und 12,8 % und somit mit jedem zehnten Spross deutlich niedriger (Tab. 2). Durch den erhöhten Wassergehalt (Vitrifikation) im Gewebe fielen einige der verdickten Sprosse bei Berührung sofort auseinander. Die Blätter wirkten glasig und waren teilweise stark vergrößert (Abb. 19).



**Abb. 19: Vergleich zweier Sprosse mit Vitrifikation (links) und ohne Vitrifikation (rechts) auf VM 2.3 (mod. MS + 1,5 mg/l BAP (Benzylaminopurin)), (A. Schüttig, 2012)**

Ein Sprosswachstum war bei den vitrifizierten Explantaten nicht gegeben und so mussten diese mit einer Länge von nur 0,1 cm erfasst werden, was den Wert der durchschnittlichen Sprosslänge stark senkte.

Im weiteren Vermehrungsprozess traten jedoch endogene Bakterien bei den Explantaten auf. Dies sind keine Bakterien, die dem Pflanzenmaterial äußerlich anhaften, sondern in der Pflanze vorkommen und nach einigen Wochen Kulturzeit sichtbar werden können. Es handelt sich somit nicht mehr um eine Sterilkultur und das Pflanzenwachstum kann hierdurch eingeschränkt werden. Meist tritt diese Erscheinung bei Ausgangsmaterial auf, welches ein hohes Alter besitzt. Um diese endogenen Bakterien zu eliminieren, war ein Antibiotikaeinsatz mit Ampicillin notwendig. Dieses Antibiotikum wird dem Nährmedium zugesetzt und die Pflanzen können dies über die Leitbahnen aufnehmen und werden so therapiert. Jedoch ist hierbei ein Therapieprozess über mehrere Subkulturen (Umsetzzyklus auf frisches Nährmedium) notwendig gewesen. Die anschließende Hochvermehrung des Pflanzenmaterials für die weiteren Phasen der In-vitro-Kultur, (Bewurzelung und Akklimatisation der Sprosse), erfolgte ausschließlich mit dem Pflanzenmaterial, welches nach der Antibiotikatherapie steril war.

### 3. Phase: Bewurzelung in vitro

Für eine erfolgreiche Akklimatisation des Pflanzenmaterials benötigen Linden ein gut ausgeprägtes Spross-/Wurzelverhältnis. In den Untersuchungen wurden zahlreiche Testungen bezüglich Art und Konzentration der Phytohormone (Auxine) vorgenommen (Tab. 3). Diese bewirken, dass die Sprosse im Nährmedium Wurzeln ausbilden. Jedoch konnten dabei nur vereinzelt bewurzelte Pflanzen erzielt werden (Tab. 4).

Somit standen weitere Untersuchungen an. Es ist eine Kultivierung mittels der Flüssigmedienkultur (TIS: Temporary Immersion System) vorgenommen worden (Abb. 20). Dabei werden die Pflanzen nicht in Kulturgefäße auf festes Nährmedium aufgesteckt, sondern in Bioreaktoren gelegt und dabei in mehreren Zyklen am Tag mit flüssigem Nährmedium umspült.

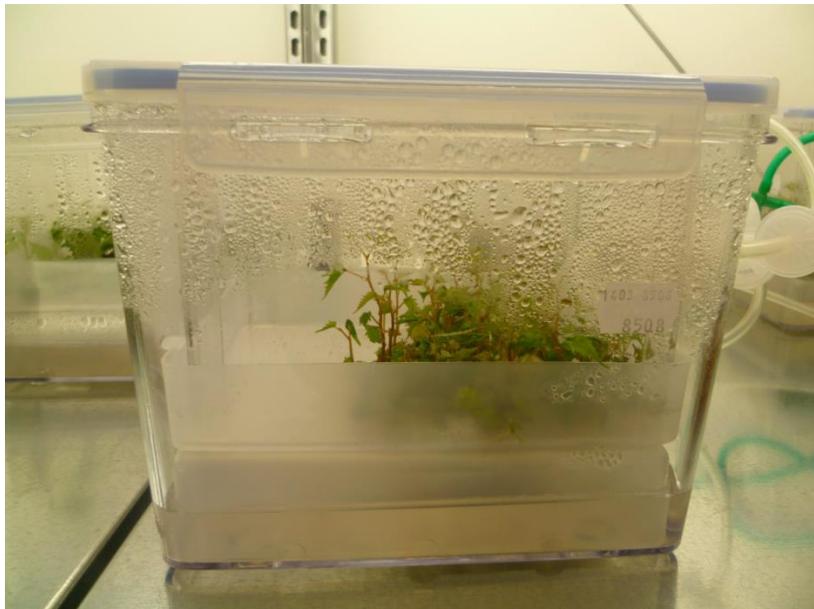


Abb. 20: TIS-Kultur (Temporary Immersion System): Kulturführung mit flüssigem Nährmedium, (A. Schüttig, 2013)

Hierbei wurde versucht, stärkere Sprosse mit mindestens 4 cm Länge in die Akklimatisationsphase zu überführen. Auch Bewurzelungsversuche mit mehreren Versuchsvarianten mit unterschiedliche Konzentration an Phytohormonen (Auxinvarianten: NES: Naphtylessigsäure, IES: Indolessigsäure, IBS: Indolbuttersäure)) fanden in den TIS-Boxen statt (Tab. 3).

In den jeweiligen Versuchsvarianten wurden je 30 Sprosse zur Bewurzelung in festes Nährmedium gesteckt oder in das Flüssignährmedium gelegt.

Tab. 3: Mediumvarianten (modifiziertes MS- Medium) des Bewurzelungsversuches für Festkultur und Flüssigkultur (TIS-Temporary Immersion System); Auxinvarianten: NES-Naphtylelessigsäure, IES-Indolessigsäure, IBS-Indolbuttersäure)

Bewurzelungsmedium	Versuchsart	NES in mg/l	IES in mg/l	IBS in mg/l
BM 1	Festkultur	0	0	0
BM 2	Festkultur	0,5	0	0
BM 3	Festkultur	1	0	0
BM 4	Festkultur	1,5	0	0
BM 5	Festkultur	0	0,5	0
BM 6	Festkultur	0	1	0
BM 7	Festkultur	0	1,5	0
BM 8	Festkultur	0	0	0,5
BM 9	Festkultur	0	0	1
BM 10	Festkultur	0	0	1,5
BM 11	Flüssigkultur	0	0	1,5
BM 12	Flüssigkultur	0	0	0
BM 13 (modifiziertes MS mit 0,5 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -Gehalt)	Flüssigkultur	0	0	0

Tab. 4: Anzahl der bewurzelten Sprosse in den jeweiligen Bewurzelungsvarianten (jeweils 30 Sprosse, je Variante angesetzt) auf modifiziertem MS- Medium

Medium	Versuchsart	Anzahl bewurzelter Sprosse
BM 1	Festkultur	4
BM 2	Festkultur	0
BM 3	Festkultur	2
BM 4	Festkultur	1
BM 5	Festkultur	3
BM 6	Festkultur	4
BM 7	Festkultur	6
BM 8	Festkultur	0
BM 9	Festkultur	1
BM 10	Festkultur	0
BM 11	Flüssigkultur	0
BM 12	Flüssigkultur	10
<b>BM 13 (modifiziertes MS mit 0,5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - Gehalt)</b>	<b>Flüssigkultur</b>	<b>22</b>

#### 4. Phase: Akklimatisation des Pflanzenmaterials im Gewächshaus

Die Akklimatisationsphase beinhaltet das Überführen des Pflanzenmaterials aus den sterilen Bedingungen im Labor in die unsterilen Bedingungen im Gewächshaus. Hierbei werden die Pflanzen aus ihren Kulturgefäßen entnommen und in die Erdkultur zunächst in Multitopfpaletten pikiert und zunächst unter 100 % Luftfeuchte (FOG-Nebelanlagen) kultiviert (Abb. 21 und Abb. 22).



Abb. 21: Bewurzelter Spross aus in vitro zur Akklimatisation in Erdkultur (A. Schüttig, 2013)

Aus den vielen vorgenommenen Versuchsvarianten sind ca. 600 Pflanzen in die Akklimatisationsphase überführt worden (Abb. 22, Abb. 23). Dabei fand eine Selektion anhand qualitativer Merkmale statt. Nicht alle Pflanzen hatten Wurzeln gebildet. Auch die Größe des Pflanzenmaterials unterschied sich je nach Versuchsvariante. Nach der schrittweisen Abhärtung des Materials konnten somit 54 Pflanzen erfolgreich in die Topfkultur überführt werden (Abb. 24, Abb. 25). Diese Linden stehen für erforderliche Nachpflanzungen in der historischen Feston-Allee im Schlosspark Bothmer zur Verfügung.



Abb. 22: In-vitro-Linden, 3 Wochen in Erdkultur, (A. Schüttig, 2013)



Abb. 23: Akklimatisation der In-vitro-Linden in Jiffy-Torfquelltöpfe mit Sphagnum-Torfmoos, (A. Schüttig, 2013)



Abb. 24: Linden getopft, 2 Monate nach Akklimatisation aus in vitro, (A. Schüttig, 2014)



Abb. 25: 4 Monate alte Bothmer-Linden aus der In-vitro-Kultur, (M. Zander, 2016)

Der Zuwachs der im Frühjahr aus der in vitro-Kultur überführten Sprosse ist über die Vegetationsperiode enorm. Hierbei können Längen bis zu 50 cm in der ersten Vegetationsperiode erreicht werden. Dies lässt sich auf den hormonellen Einsatz in der Kulturführung zurückschließen, der sich jedoch schrittweise abbaut.

Außerdem ist das Vorhalten der Pflanzen in vitro von entscheidender Bedeutung. Unabhängig der Vegetationsperiode können die Pflanzen kultiviert und gezielt hinsichtlich Vermehrung oder Bewurzelung gesteuert werden. Eine jährliche Bereitstellung von gesunden Jungpflanzen kann somit gesichert werden.

### 3 Neuetablierung des Pflanzenmaterials

Nach einiger Zeit der Kulturführung in vitro müssen die Pflanzen erneut etabliert werden, damit weiterhin qualitativ hochwertige Pflanzen produziert werden können. Auf Grund des regelmäßigen und hohen Umsetzzyklus von 4-6 Wochen und der daraus resultierenden Hochvermehrung der Pflanzen sind diese, trotz der zugesetzten Nährstoffe im Nährmedium, über die Zeit geschwächt und erreichen nicht mehr zufrieden stellende Vermehrungsraten. Somit wird auf Mutterpflanzenmaterial ex vitro zurückgegriffen und die Kulturführung beginnt erneut mit der ersten Phase der Etablierung, um steriles Ausgangsmaterial zu erhalten. Jedoch wurde hierbei nicht auf die ursprünglichen Ausgangsbäume zurückgegriffen, sondern auf die ersten durch die In-vitro-Kultur produzierten *Tilia europaea* 'Königslinde'.

## 4 Fazit

Mit den verschiedenen durchgeführten Versuchsreihen innerhalb der einzelnen Phasen der In-vitro-Kultur konnte ein Methodenprotokoll für einen Genotyp der Bothmer Linde *Tilia europaea* 'Konings' entwickelt werden. Die ersten 100 Pflanzen sind im Mai 2015 zur Schlosseröffnung nach Sanierung an Sponsoren und Liebhaber abgegeben worden.

Nach dieser optimierten Methode wurde weiteres Pflanzenmaterial der Bothmer-Linde mit Hilfe der In-vitro-Kultur angezogen, so dass weitere 200 Pflanzen zur Verfügung gestellt werden konnten. Diese werden in den Ostsee-Baumschulen Volker Hinrichs & Co. KG in Kröpelin weiter kultiviert. Ein Teil davon wird im Museums-Shop im Schloss Bothmer für Liebhaber zum Verkauf als limitierte Edition angeboten.

Für diesen Verkauf sollen weiterhin jährlich Pflanzen durch die Mitarbeiter des In-vitro-Labors der Humboldt-Universität zu Berlin kultiviert werden. Zur Vermarktung wurde ein Pflanzenetikett sowie einem Faltblatt mit Hintergrundinformation erstellt.



Abb. 26: 1,5 Jahre alte Bothmer-Linden aus der In-vitro-Kultur, (M. Zander, 2016)



Abb. 27: Bothmer-Linden der Festonallee vom Schloss Bothmer wegführend, (M. Zander, 2016)

---

**M. Sc. Antje Schüttig**

**Dr. Matthias Zander**

**Prof. Dr. Dr. Christian Ulrichs**

Humboldt-Universität zu Berlin

Lebenswissenschaftliche Fakultät

Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften

Fachgebiet Urbane Ökophysiologie der Pflanzen

Lentzeallee 55/57

14195 Berlin

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bothmer- Linden der Festonallee zum Schloss Bothmer führend .....	1
Abb. 2: Desinfektionsstrecke zur Überführung des Ausgangsmaterials in die Sterilkultur in vitro .....	2
Abb. 3: Ausgangsmaterial für die In-vitro-Kultur: Lindenexplantate nach Desinfektion mit je einer Blattachselknospe .....	3
Abb. 4: Jeweils 1 desinfizierter Spross (Explantat) je Kulturröhrchen in der ersten Phase der Kulturführung .....	3
Abb. 5: Steriler Arbeitsplatz: Laminar-Flow- Box.....	4
Abb. 6: Pilzliche Kontamination während der ersten Phase der Etablierung .....	4
Abb. 7: Erste Phase der Kulturführung in Röhrchen (links: vitaler Spross mit 2 noch nicht ausgetriebenen Knospen; rechts: ein neuer Spross ist aus der Knospe ausgetrieben und kann nun vereinzelt werden) .....	5
Abb. 8: Kulturraum mit gesteuerten Wachstumsbedingungen .....	6
Abb. 9: Lindensprosse nach Teilung (Hochvermehrung) auf Nährmedium gesetzt.....	6
Abb. 10: Lindensprosse 6 Wochen nach Teilung auf dem Nährmedium.....	6
Abb. 11: Vermehrungsphase: Bearbeiten des Vermehrungspulks mit Skalpell und Pinzette .	7
Abb. 12: Einsetzen der vereinzelt Sprossteile ins Kulturgefäß auf frisches Nährmedium...	7
Abb. 13: Auf Millimeterpapier gezeichnete Skala zur Bonitur der Sprosslänge .....	9
Abb. 14: Hormonabhängige Vermehrungsrate (BAP-Benzylaminopurin; IES-Indolessigsäure) der Teil- und Kopfsprosse auf verschiedenen Vermehrungsmedien (VM 1: mod. MS mit 0,5 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -Gehalt; VM 2: mod. MS) im Vorversuch.....	10
Abb. 15: Hormonabhängige (BAP-Benzylaminopurin; IES-Indolessigsäure) durchschnittliche Sprosslänge der Teil- und Kopfsprosse auf verschiedenen Vermehrungsmedien (VM 1: mod. MS mit 0,5 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -Gehalt; VM 2: mod. MS) im Vorversuch.....	11
Abb. 16: Vergleich der Entwicklung und Sprossvermehrung eines Teilsprosses (links) und eines Kopfsprosses (rechts) auf VM 1.2 (mod. MS mit 0,5 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -Gehalt + 1,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l IES) .....	12
Abb. 17: Hormonabhängige Vermehrungsrate (BAP-Benzylaminopurin) der Kopfsprosse auf verschiedenen Vermehrungsmedien (VM 2: mod. MS) im Hauptversuch.....	12
Abb. 18: Hormonabhängige (BAP-Benzylaminopurin) durchschnittliche Sprosslänge der Kopfsprosse auf verschiedenen Vermehrungsmedien (VM 2: mod. MS-Medium) im Hauptversuch.....	13
Abb. 19: Vergleich zweier Sprosse mit Vitrifikation (links) und ohne Vitrifikation (rechts) auf VM 2.3 (mod. MS + 1,5 mg/l BAP (Benzylaminopurin)) .....	14
Abb. 20: TIS-Kultur (Temporary Immersion System): Kulturführung mit flüssigem Nährmedium .....	15
Abb. 21: Bewurzelter Spross aus in vitro zur Akklimation in Erdkultur .....	17
Abb. 22: In-vitro-Linden, 3 Wochen in Erdkultur .....	18
Abb. 23: Akklimation der In-vitro-Linden in Jiffy-Torfquelltopfe mit Sphagnum-Torfmoos	18
Abb. 24: Linden getopft, 2 Monate nach Akklimation aus in vitro.....	18
Abb. 25: 4 Monate alte Bothmer-Linden aus der In-vitro-Kultur .....	19
Abb. 26: 1,5 Jahre alte Bothmer-Linden aus der In-vitro-Kultur .....	20
Abb. 27: Bothmer-Linden der Festonallee vom Schloss Bothmer wegführend.....	21

## Tabellenverzeichnis

Tab.1: Mediumvarianten des Vermehrungsversuchs und deren Hormonkonzentration an Cytokinin (BAP- Benzylaminopurin) und Auxinen (IES-Indolessigsäure) in mg/l im Vorversuch (VV) und Hauptversuch (HV).....	8
Tab. 2: Anzahl Sprosse mit Vitrifikationserscheinung je Medienvariante (mod. MS-Medien: VM 2, hormonfrei; VM 2.2: 1 mg/l BAP; VM 2.3 mg/l BAP: 1,5; VM 2.4: 2 mg/l BAP) im Hauptversuch.....	13
Tab. 3: Mediumvarianten (modifiziertes MS- Medium) des Bewurzelungsversuches für Festkultur und Flüssigkultur (TIS-Temporary Immersion System); Auxinvarianten: NES-Naphtylelessigsäure, IES-Indolessigsäure, IBS-Indolbuttersäure) .....	16
Tab. 4: Anzahl der bewurzelten Sprosse in den jeweiligen Bewurzelungsvarianten (jeweils 30 Sprosse, je Variante angesetzt) auf modifiziertem MS- Medium.....	16