



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„*Cannabis sativa L.: In vitro Micropropagation*“

verfasst von / submitted by

Christian Johannes Leeb (BSc)

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2018 / Vienna 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 878

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Verhaltens-, Neuro- und Kognitionsbiologie /
Behavior, Neurobiology and Cognition

Betreut von / Supervisor:

Prof. Dr. Sergey Zotchev, PhD

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Dr. Andrea Kodym

Inhaltsverzeichnis

1	English Abstract.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit.....	3
2.2	Was ist pflanzliche in vitro Kultur?.....	3
2.3	Warum in vitro?	4
2.4	Was sind die Möglichkeiten der in vitro Kultur?	4
2.4.1	Pathogenfreie Massenpropagation.....	4
2.4.2	Neuzüchtungen und genetische Variabilität.....	5
2.4.3	Konservierung von genetischen Ressourcen	5
2.4.4	Somatische Embryogenese	5
2.4.5	Protoplastenfusion.....	5
2.4.6	Produktion von haploiden bzw. homozygoten Pflanzen	6
2.4.7	Metabolitenproduktion.....	6
2.5	In vitro Kultur und pflanzliches Verhalten	6
2.5.1	Gibt es pflanzliches Verhalten?.....	6
2.5.2	Können Pflanzen lernen?	7
2.5.3	Nervenloses intelligentes Verhalten	7
2.5.4	Intelligenz im Pflanzenreich	8
2.5.5	Mechanismen von pflanzlichem Verhalten und Intelligenz.....	9
2.5.6	In vitro Kultur: Die Methode der Wahl.....	10
2.6	Was ist Cannabis sativa?	11
2.7	Warum Cannabis?	12
2.7.1	Quelle von Nahrung	12
2.7.2	Quelle von Fasern.....	12
2.7.3	Quelle von Arzneistoffen und Drogen.....	12
2.7.4	Potentieller Modellorganismus.....	13
2.7.5	Werkzeug für die Neurowissenschaften	13
2.8	In vitro Kultur von Cannabis sativa.....	13
2.8.1	Kulturmedien.....	14
2.8.2	Wuchsstoffe	15
2.8.3	Oberflächensterilisationsverfahren	15
2.8.4	Konservierung und Lagerung	16
2.8.5	Photoautotrophe in vitro Kultur als Alternative	16
3	Material und Methoden.....	18

3.1	Pflanzenmaterial	18
3.1.1	Verwendete Hanfsorten.....	18
3.1.2	Anbau der Mutterpflanzen.....	19
3.1.3	Vegetative Vermehrung der Mutterpflanzen über Stecklinge.....	19
3.2	Medien	19
3.2.1	Herstellung	21
3.2.2	Medienzusammensetzungen	21
3.3	Kulturbedingungen.....	22
3.3.1	Kulturraum	22
3.3.2	Kühlraum	22
3.4	Oberflächensterilisationsmethoden	22
3.4.1	Sterilisationsmittel	22
3.4.2	Sterilisationsmethoden	23
3.4.3	Keimung oberflächlich sterilisierter Samen	24
3.4.4	Etablierung oberflächlich sterilisierter Pflanzenteile	24
3.5	Micropropagation auf verschiedenen Kulturmedien.....	25
3.6	Micropropagation in Kulturgefäßen mit erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese	26
3.6.1	Vorversuch in Reagenzgläsern	26
3.6.2	Versuch in Hipp Gläsern	27
3.7	Etablierung einer aseptischen photoautotrophen Kultur durch Zwangsbelüftung	29
3.7.1	Vorversuch ohne Zwangsbelüftung	29
3.7.2	Zwangsbelüftete Weck Gläser.....	29
3.8	Erhaltung der sterilen Kulturen.....	31
3.8.1	Lagerung von Sämlingen im Kulturraum	31
3.8.2	Langzeitkonservierung bei 8 °C	31
4	Resultate	33
4.1	Anbau der Mutterpflanzen.....	33
4.2	Vegetative Vermehrung über konventionelle Stecklinge	33
4.3	Oberflächensterilisation.....	34
4.3.1	Samen	34
4.3.2	Frisches Pflanzenmaterial	34
4.4	Micropropagation auf verschiedenen Kulturmedien.....	34
4.5	Micropropagation in Kulturgefäßen mit erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese	35
4.5.1	Vorversuch in Reagenzgläsern	35
4.5.2	Versuch in Hipp Gläsern	36
4.6	Etablierung einer aseptischen photoautotrophen Kultur durch Zwangsbelüftung	38

4.6.1	Vorversuch ohne Zwangsbelüftung	38
4.6.2	Versuch in zwangsbelüfteten Weck Gläsern.....	38
4.7	Erhaltung der sterilen Kulturen.....	40
4.7.1	Lagerung von Sämlingen im Kulturraum.....	40
4.7.2	Langzeitkonservierung bei 8 °C.....	40
5	Diskussion.....	42
5.1	Pflanzenmaterial	42
5.2	Oberflächensterilisation.....	43
5.3	Zusammensetzung der Medien.....	44
5.4	Photoautotrophie: Jede grüne Pflanze kann das	45
5.5	Erhaltung der sterilen Kulturen.....	47
5.6	Conclusio	47
6	Zusammenfassung (english Abstract p. 1)	49
7	Literaturverzeichnis.....	52
8	Anhang	62
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	62
8.2	Definitionen.....	62
8.3	Tabellenverzeichnis.....	63
8.4	Abbildungsverzeichnis.....	64

1 English Abstract

Cannabis sativa L. (Cannabaceae) has served humanity for hundreds of years as a source of food, fibre and medicine and it has low requirements to soil and climate. The low demands on culture conditions, the economic importance and the intensive research of *C. sativa* make it a suitable model organism. *In vitro* propagation with its many techniques is suitable for basic research, breeding and preservation and multiplication of genetic resources. In addition, information processing within the plant could also be investigated.

The aim of the present work is to show the possibilities of *in vitro* micropropagation as a sterile culture method under controlled conditions on the one hand and the advantages of the plant *Cannabis sativa*, as crop plant and model organism on the other. Furthermore, *in vitro* micropropagation including under photoautotrophic conditions were applied to *C. sativa* and further developed with the aim to provide satisfying solutions for both, research and industry.

Although *C. sativa* is very easy to cultivate under conventional horticultural conditions, *in vitro* micropropagation is difficult because conventional *in vitro* conditions result in low micropropagation rates and retarded growth. In the literature mostly, Murashige & Skoog based media (MS-media) are used as culture media in nearly airtight vessels, without testing alternatives. When attempting to improve the culture conditions, the focus is mostly placed on the concentration and type of growth regulators. However, Casano and Grassi successfully developed media that performed better than MS-media according to the *in vitro* micropropagation of *C. sativa*. A further possibility to improve the micropropagation of *C. sativa* is the *in vitro* photoautotrophic culture described by Kozai. It differs from the conventional methods in the absence of organic substances such as sucrose and vitamins in the medium and the availability of sufficient carbon dioxide and light for photosynthesis.

In this work, EU-certified hemp varieties were cultivated *in vitro* for the first time. These varieties are suitable to produce food, fibres and cannabinoids such as cannabidiol, but are not subject to strict legal regulations because of their extremely low tetrahydrocannabinol content.

Comparing ten media under conventional micropropagation conditions, the MS-medium containing 3 % (w/v) sucrose (suc.), MS-vitamins, 0.5 g/L activated carbon and 2 μ mol/L meta-Topolin (m-T), published by Lata et al. 2016, resulted in the largest increase in height (19 mm/10 days) and number of nodes (1.4 /10d). A similar result was achieved on the medium published by Lata et al. 2009, which is only different from the previous by the used growth regulator and the absence of activated carbon. It contained 0.5 μ mol/L thidiazuron and showed good increases in height (15 mm/10d) and number of nodes (1.3 /10d). However, on both media the quality of plants was not good, because the habitus was abnormal. Also, no roots were formed and so roots must be initiated before acclimatisation.

Media with commercial fertilizer for hydroponic culture instead of MS-salts and without MS-vitamins showed that for *in vitro* micropropagation MS nutrient salts are not necessary, if alternatives are used, and vitamin supplements are not necessary at all. The medium with commercial plant fertilizer for hydroponic culture (AB-medium) with 1 % (w/v) suc. and 2 μ mol/L m-T showed a slightly greater increase in height (10 mm/10d) than the same medium with additional MS-vitamins (9 mm/ 10d). The AB-medium, which contained only fertilizer at half concentration, and therefore had to result in a photoautotrophic culture, was the only one on which roots were formed. The increase in height (5 mm/10d) was not excellent, but 39 % of the individuals formed roots and showed healthy growth, which stands for the quality of these cultures.

Furthermore, culture media in culture vessels without (regular) and with increased possibility for photosynthesis (photo+) by increased illuminance (regular: ~59 μ mol/m²s, photo+: ~161 μ mol/m²s) and gas exchange with the environment, by using permeable caps, were compared. The preliminary

experiment with AB-media, showed a clear superiority of the photo+ condition. In the main experiment larger baby food jars were used as culture vessels. Furthermore, four different MS-media with and without sucrose, m-T and MS-vit, and one AB-medium without m-T, sucrose and vitamins were used. The photo+ condition showed only in the absence of sucrose in the medium (photoautotrophic) a larger increase in height and number of nodes, compared to the regular condition. In the presence of sucrose (mixotroph), the plants under regular condition showed greater gains, compared to that under photo+ condition. The mortality of the mixotrophic cultures was 0 to 65 %. The mortality of the photoautotrophic cultures was higher on MS-medium (85 % dead) than on the AB-medium (45 % dead). This indicates that MS-media are not suitable for photoautotrophic *in vitro* Micropropagation of *C. sativa*.

In another experiment superficial sterilized shoot tips on porous media in aseptic culture vessels with enough light (85 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) and air exchange, through forced ventilation, showed good growth and rooting. Compared with gelled media, the use of porous sucrose-free media offers great advantages in the formation of roots. In this experiment the plants on vermiculite, rock wool and potting soil, all soaked in AB-nutrient solution, showed excellent growth and resulted in 100 % rooting. In contrast to the plants on the gelled medium on which no good growth and no rooting was observed. This indicates that gelled media inhibits root formation and healthy growth in *C. sativa*.

For sterilization of seeds the method with 0.5 % (w/v) sodium hypochlorite (NaOCl), 10 minutes exposure time and four times 10 minutes washing, proved to be a suitable method with 79 % of sterile and germinated seeds. For superficial sterilization of fresh parts of the plant, the method with 0.5 % (w/v) NaOCl, 20 minutes exposure time and three times 10 minutes washing, with 86 % of sterile explants was suitable.

Flower formation was a problem, because for clonal propagation, including micropropagation, it is essential that the plants are in vegetative state and do not pass into reproductive state. With the *C. sativa* wild type, a photoperiod of 18 hours per day prevented flower formation, as expected in short day plants. This was not the case with EU-certified hemp varieties Futura 75, Santhica 27, Fedora 17, Finola and those collected from medical garden and only partially with the F2 generation of Felina 32. To be able to multiply these varieties in which the photoperiod can only delay but not prevent flowering, through clonal propagation, methods must be developed to reliably prevent flower formation. For example, this could be achieved using growth regulators.

To maintain sterile cultures seedlings were continuously subcultured. Storage of aseptic seedlings [$25 \pm 1^\circ\text{C}$, $\sim 55 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$, 16h/d] over 100 days was not a problem and from each seedling multiple nodes could be obtained for further subculture. For long-term preservation of pathogen-free cultures, these were stored at 8°C [$\sim 35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$, 18h/d] for 200 days. 76 % of the individuals survived the long-term storage. By determining the light compensation point and storing the plants at this combination of temperature and illuminance, the long-term storage could be further optimized.

In conclusion, photoautotrophic culture conditions were best suited for the *in vitro* micropropagation of *C. sativa* and should be further investigated. Therefore, the plants must be provided with sufficient carbon dioxide and light for photosynthesis. On porous sucrose-free culture media roots were formed in all cases. This resulted in good nutrient uptake and healthy growth. The composition of MS-media is not adapted to the requirements of *C. sativa* but media prepared with a commercial fertilizer for hydroponic culture without MS-vitamins resulted in good growth and plant quality. For clonal multiplication of *C. sativa*, flower formation must be prevented. To maintain pathogen-free cultures, they can be continuously subcultured or stored at low temperatures and low light.

2 Einleitung

2.1 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

Die Einleitung gibt einerseits einen Überblick über die Vorteile und Möglichkeiten der *in vitro* Micropropagation, also der pflanzlichen *in vitro* Kultur im Allgemeinen. Unter anderem wird dabei ein Fokus auf die Möglichkeiten zur Betrachtung von pflanzlichem Verhalten und Intelligenz und darunterliegenden Mechanismen gerichtet. Andererseits werden Vorteile und Möglichkeiten der Pflanzenspezies *Cannabis sativa* L. aufgezeigt. Erstens in Bezug auf die Nahrungsmittel-, Faser- und Arzneimittelproduktion. Zweitens auch in Bezug auf die Grundlagenforschung in der Neurobiologie mittels Cannabinoiden und drittens in Bezug auf *Cannabis sativa* als Modellorganismus für die Pflanzenbiologie. Schlussendlich sollen bestehende *in vitro* Kultur Methoden zur Micropropagation von *Cannabis sativa* und Alternativen beschrieben werden.

Im empirischen Teil der Arbeit wurden bestehende *in vitro* Kultur Protokolle für *C. sativa* zum ersten Mal anhand von EU-zertifiziertem Nutzhanf getestet. Weiters wurden bestehende Methoden evaluiert, verbessert und daraus neue Methoden entwickelt. Grundsätzlich gestaltet sich die *in vitro* Micropropagation von *C. sativa* als schwierig. So wurden in der vorliegenden Arbeit alternative Wuchsstoffe, Kulturmedien und -verfahren getestet, wie zum Beispiel die photoautotrophe *in vitro* Micropropagation auf porösen Kulturmedien. Ziel war es sowohl der Forschung als auch der Industrie eine befriedigende Methode zur Etablierung von *Cannabis sativa* mittels *in vitro* Micropropagation zur Verfügung zu stellen.

2.2 Was ist pflanzliche *in vitro* Kultur?

Die Begriffe *in vitro* Kultur, pflanzliche Gewebekultur und aseptische beziehungsweise axenische Micropropagation werden weitgehend synonym verwendet (Thorpe, 2007). Die Wissenschaft dieser Methode geht auf die Erkenntnis von Schleiden und Schwann im Jahr 1838 zurück, dass die Zelle die kleinste autonome Basisstruktur aller lebenden Organismen darstellt. Sie behaupteten, dass jede einzelne Pflanzenzelle unter geeigneten Umständen, sich wieder zu einer ganzen Pflanze regenerieren kann. Daraufhin war Gottlieb Haberlandt 1902 der Erste, der isolierte einzellige Palisadenzellen im Knop Medium mit Saccharose kultivierte (Hussain, Ahmed, Nazir, & Ullah, 2012).

Die pflanzliche *in vitro* Kultur ist die aseptische Propagation von einzelnen Zellen, Geweben, Organen oder ganzen Pflanzen unter definierten chemischen und physikalischen Bedingungen, oft um Klone zu produzieren (Thorpe, 2007). In den aller meisten Fällen bedeutet dies, dass die Pflanzen in durchsichtigen Kulturgefäßen auf künstlichen Nährmedien kultiviert werden. Unter diesen kontrollierten Bedingungen ist es durch optimale Wahl der Nährstoffversorgung, pH-Wert im Medium, Temperatur, Beleuchtung und Atmosphäre oft möglich, eine höhere Wachstumsrate zu erzielen als unter konventionellen gärtnerischen Bedingungen. Außerdem kann ein kleines Explantat, also ein geeigneter Teil einer Pflanze oft ein Nodium oder Triebspitze, in viele noch kleinere Explantate zerteilt werden und so kann eine sehr große Anzahl an Pflanzen in relativ kurzer Zeit unabhängig von der Jahreszeit produziert werden (Idowu, Ibitoye, & Ademoyegun, 2009).

Üblicherweise werden in der *in vitro* Kultur außer den essentiellen Nährstoffen noch Zucker, Vitamine und Aminosäuren dem Medium zugefügt. Die Pflanzen wachsen unter heterotrophen beziehungsweise photomixotrophen Bedingungen heran, das heißt sie nützen im Medium enthaltene Stoffe, wie zum Beispiel Saccharose als Energiequelle. Unter heterotrophen Bedingungen gewinnen die Pflanzen keinerlei Energie aus der Photosynthese. Unter photomixotrophen Bedingungen verbrauchen die Pflanzen zu Beginn der Photoperiode das in der

Dunkelphase entstandene Kohlendioxid mittels Photosynthese, bis der Kohlendioxidgehalt im Kulturgefäß zu niedrig ist und gehen dann zur heterotrophen Energiegewinnung über. Dadurch werden die Blätter in der *in vitro* Kultur oft als unnötig erachtet und entfernt. Die meisten Studien zur *in vitro* Kultur konzentrieren sich auf verschiedene Konzentrationen und Kombinationen von Wuchsstoffen und organischen Zusätzen im Medium. Bei dieser Vorgehensweise muss für jede Spezies und oft für jede Varietät ein eigenes Protokoll erarbeitet werden. Es gibt allerdings auch Versuche die Pflanzen unter photoautotrophen Bedingungen *in vitro* zu kultivieren (Kozai, Afreen, & Zobayed, 2005).

2.3 Warum *in vitro*?

Die *in vitro* Kultur gilt als die effizienteste Technologie zur vegetativen Vermehrung von Pflanzen, aber auch zur Ertragssteigerung bei Nutzpflanzen, zum Beispiel durch die Erzeugung von somaklonalen und gametoklonalen Varianten. Sie hat ein enormes Potential bei der Produktion von Pflanzen bester Qualität, der Isolation von hervorragenden Varianten mit größerem Ertrag und der Steigerung von Resistzenzen gegenüber Schädlingen, Krankheiten und Stress (Brown & Thorpe, 1995). Diese Methode wird im großen Maßstab vor allem für die klonale Propagation von Pflanzen, aber auch für die Grundlagenforschung, Elimination von Krankheitserregern im Besonderen von Viren, Neuzüchtung, Produktion sekundärer Metaboliten und beim Naturschutz eingesetzt. So hat die pflanzliche *in vitro* Kultur großen Einfluss auf die Biotechnologie und die Agrarwissenschaften, um die steigende globale Nachfrage nach Agrarprodukten decken zu können. Auch für die Produktion transgener Pflanzen ist die *in vitro* Kultur unerlässlich (García-González, Quiroz, Carrasco, & Caligari, 2010).

Die Vorteile der *in vitro* Kultur gegenüber konventionellen Methoden sind:

- Aus sehr wenig Ausgangsmaterial können Tausende vollentwickelte Pflanzen in kurzer Zeit produziert werden.
- Gefährdete Arten können erhalten und vermehrt werden.
- Eine große Anzahl an genetisch identischen Pflanzen kann auf kleinstem Raum erzeugt werden.
- Es werden keine Samen benötigt.
- Pflanzen können im großen Maßstab auf wünschenswerte Eigenschaften hin untersucht werden.
- Ganze Pflanzen können aus einzelnen genetisch modifizierten Zellen regeneriert werden.
- Es werden krankheits- und schädlingsfreie Pflanzen in sterilen Gefäßen produziert.
- Pflanzen bei denen die konventionelle Vermehrung über Samen erschwert ist können einfach produziert werden.
- Massenpropagation von Pflanzen ohne jeglicher Infektion (Yildiz, 2012).

2.4 Was sind die Möglichkeiten der *in vitro* Kultur?

2.4.1 Pathogenfreie Massenpropagation

Die kommerzielle Produktion von Pflanzen mittels *in vitro* Kultur hat einige Vorteile gegenüber traditionellen Methoden wie Propagation über Samen, Stecklinge oder Absenker. Sie ist ein schneller Vermehrungsprozess, welcher die Möglichkeit virusfreie Pflanzen zu produzieren bietet (García-González et al., 2010). Es können durch das Fehlen von Krankheitserregern und Schädlingen höhere Erträge erzielt werden (Hussain et al., 2012).

2.4.2 Neuzüchtungen und genetische Variabilität

Durch die Induktion von Mutationen, zum Beispiel durch Chemikalien oder radioaktive Strahlung, können in der *in vitro* Kultur neue Genvarianten erzeugt und daraus stabile Genotypen erhalten werden. Dies geschieht durch *in vitro* Regeneration und Massenpropagation. Es können auch Embryonen, welche das Ergebnis von Kreuzungen verschiedener Genera sind und keine fertilen Samen produzieren, in Kultur genommen und so gerettet werden (Ahmadi, Azadfar, & Jafari Mofidabadi, 2012). Außerdem können vor allem aus Kallus durch Mutation auch somaklonale Varietäten entstehen. Das heißt, dass sich ohne sexuelle Reproduktion Pflanzen mit neuen Eigenschaften züchten lassen. Diese Möglichkeiten führten schon zu kommerziell bedeutenden Neuzüchtungen. Weiters können gentechnische Verfahren verbesserte Variationen erzeugen. Diese genetischen Transformationstechniken sind auf technische Aspekte der *in vitro* Kultur angewiesen (Hussain et al., 2012).

2.4.3 Konservierung von genetischen Ressourcen

Die *in vitro* Kultur bietet die Möglichkeit gefährdete Pflanzenarten für die Nachwelt zu erhalten. Es können Arten bei denen es Schwierigkeiten bei der konventionellen Erhaltung gibt, durch langsame Vermehrungsraten und aufwendige Kulturbedingungen, vermehrt und erhalten werden. Durch die klonale Vermehrung werden Veränderungen des Erbgutes weitgehend ausgeschlossen, was in der Konservierung von bestimmten Genotypen einen großen Vorteil darstellen kann (Tyagi, Agrawal, Mahalakshmi, Hussain, & Tyagi, 2007). Durch spezielle Kryokonservierungsverfahren können genetische Ressourcen für unbestimmte Zeit bei sehr tiefen Temperaturen in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Eine erfolgreiche Kryokonservierung ist oft auf die Verfahren der *in vitro* Kultur angewiesen. So müssen zuerst pathogenfreie Gewebe oder Zellen erzeugt werden, welche so vorbehandelt werden, dass sie beim Einfrieren keine zu großen Schäden davontragen. Danach müssen diese wieder zu kompletten Pflanzen mit Hilfe der *in vitro* Kultur regeneriert werden (Harding, 2007).

2.4.4 Somatische Embryogenese

Die somatische Embryogenese ist ein Prozess bei dem sich somatische Zellen, also solche die im Gegensatz zu zygotischen Embryonen nicht das Ergebnis einer sexuellen Befruchtung sind, in Embryonen differenzieren. Die somatischen Embryonen können unter der Einwirkung von Pflanzenhormonen oder -wuchsstoffen direkt von Explantaten oder von Kalli gewonnen werden. Sie können sich unter geeigneten Umständen wieder in ganze Pflanzen entwickeln. Die somatische Embryogenese ist nicht nur ein geeignetes und kostengünstiges Verfahren für die Massenpropagation, sondern auch für genetische Manipulationen (Li, Krasnyanski, & Korban, 2002).

2.4.5 Protoplastenfusion

Die Protoplastenfusion ist ein bedeutendes Werkzeug bei der Neuzüchtung von Pflanzen. Es können mit ihrer Hilfe Hybriden zwischen verschiedenen Spezies, aber auch zwischen verschiedenen Gattungen erzeugt werden. Die Technik basiert auf der Fusion von zwei Protoplasten mit verschiedenen Genomen. Daraufhin werden erfolgreich verschmolzene Zellen ausgewählt und wieder zu ganzen Pflanzen regeneriert. Durch die Rekombination von Organellen, zytoplasmatischen Genen, Kerngenen und somaklonaler Variation entstehen so Pflanzen, die der Menschheit durch konventionelle Verfahren unzugänglich wären (Evans, 1983).

2.4.6 Produktion von haploiden bzw. homozygoten Pflanzen

Haploide Pflanzen sind sterile Pflanzen mit nur einem Chromosomensatz. Haplonten können aus Pollen (Androgenese) oder unbefruchteten Eizellen (Gynogenese) gewonnen werden. Dabei werden diese durch die Verwendung geeigneter *in vitro* Techniken, entweder indirekt über Kallus, oder direkt durch Embryogenese zu ganzen Pflanzen herangezogen (Heß, 1992). Diese Haplonten können dann mittels Induktion von einer Verdoppelung des Chromosomensatzes zu homozygoten und diploiden Pflanzen gemacht werden, welche nicht mehr steril im sexuellen Sinne sind. Diese fruchtbaren homozygoten Pflanzen sind für die Neuzüchtung äußerst wertvoll. Sie sparen den Züchtern viel Zeit und können deutlich höhere Erträge aufweisen (Basu, Datta, Sharma, & Kumar, 2011).

2.4.7 Metabolitenproduktion

Pflanzliche sekundäre Metaboliten sind von größter ökonomischer Bedeutung. Biotechnologische Werkzeuge sind wichtig, um Pflanzen mit erwünschten Eigenschaften zu selektieren, vermehren, verbessern und analysieren. Pflanzliche *in vitro* Verfahren, wie Zellkultursysteme sind eine nachhaltige Quelle von Arzneistoffen, Duftstoffen, Aromen, Pigmenten, Nahrungszusatzstoffen und Pestiziden, welche nicht oder nur schwer mit mikrobiellen Zellen oder durch chemische Synthese hergestellt werden können. Die Suspensionskultur von pflanzlichen Zellen bietet die Möglichkeit in Bioreaktoren pflanzliche Metaboliten verhältnismäßig kostengünstig zu produzieren. Durch den Einsatz von genetischer Transformation und genetischen Analysetechniken ist es möglich neuartige Metabolite zu produzieren beziehungsweise bestehende Verfahren zu verbessern (Siahsar, Rahimi, Tavassoli, & Raissi, 2011).

2.5 *In vitro* Kultur und pflanzliches Verhalten

2.5.1 Gibt es pflanzliches Verhalten?

Üblicherweise wird als Verhalten „die Gesamtheit der in unterschiedlicher Gewichtung von inneren Bedingungen und äußeren Reizen abhängigen Aktionen und Reaktionen eines Tieres oder Menschen, alle beobachtbaren Bewegungen, Stellungen oder Zustände und deren Veränderung, die im Zusammenhang mit den koordinierten und funktionalen Leistungen der zentralen Informationsverarbeitung eines Lebewesens, meist des Zentralnervensystems, entstehen“ verstanden. „Verhalten äußert sich zwar meist über Körpermovement oder -stellung, kann sich aber auch durch Drüsentätigkeit oder auf Pigmentwanderung beruhende Farbwechsel kundtun und erfolgt allgemein auf der Grundlage des Stoffwechsels und Energiestoffwechsels“ (Hemminger & Kirkilionis, 2004). Ohne die explizite Einschränkung auf Tiere und Menschen wäre dieses Konzept ohne weiteres auch auf nicht tierische Lebensformen wie etwa Pflanzen übertragbar, mit Ausnahme der zentralen Informationsverarbeitung. Auch wenn es also verschiedene Ansichten darüber gibt wie genau Verhalten definiert werden sollte, ist nicht geklärt, warum die Definition explizit alle nicht tierischen Lebensformen ausschließt (Levitis, Lidicker, & Freund, 2009).

Die Idee, dass Pflanzen Verhalten an den Tag legen ist nicht neu. Schon Charles Darwins Großvater, Erasmus Darwin, spekulierte, dass pflanzliche Lebensformen verschiedene Sinnesorgane besitzen, welche sich verändernde Grade an Feuchtigkeit, Licht, Berührung und diverse Gerüche unterscheiden können. Charles Darwin führte diese Ideen weiter und beschrieb detailliert viele verschiedene Pflanzenarten, welche sich in Antwort auf Licht, Schwerkraft und Berührung bewegten (Karban, 2015).

Eine weitere Definition von Verhalten besagt, dass eine Reaktion auf ein Ereignis oder eine Änderung der Umwelt während der Lebenszeit eines Individuums als Verhalten gesehen werden sollte. Diese Reaktionen sind das Ergebnis von physiologischen und biochemischen Vorgängen, die im Verhältnis zur Lebenszeit des Organismus rapide auftreten und nicht permanent sind. Falls sich der Stimulus erneut ändert, muss sich auch die Reaktion des Organismus ändern um als Verhalten zu gelten. Diese Definition gleicht jener der phänotypischen Plastizität (Silvertown & Gordon, 1989).

Aus dieser Sicht weisen Pflanzen eine Vielzahl von Verhaltensweisen auf. Höhere Pflanzen können zwischen verschiedenen Umgebungen unterscheiden und die für sie bessere wählen. Nachdem Entscheidungen getroffen wurden können diese beurteilt und korrigiert werden. Viele Studien weisen darauf hin, dass Pflanzen andere Individuen wahrnehmen und ihr Verhalten danach ausrichten, zum Beispiel werden Verwicklungen von Ranken oder Beschattung vermieden. Eine Vielzahl von Chemikalien kann wahrgenommen werden und der Wuchs kann anhand von Gradienten dieser Chemikalien gesteuert werden. Auch Licht- oder Mineralgradienten werden von Pflanzen für Richtungsentscheidungen beim Wachsen benutzt. Das Verhalten von Pflanzen gegenüber Herbivoren, Krankheitserregern und weiteren Stressoren kann durch Priming modifiziert werden. Auch Habituation und Konditionierung konnten im Pflanzenreich nachgewiesen werden. Außerdem wurde die Fähigkeit zu erkunden, suchen, prüfen und entdecken nachgewiesen. Viele dieser aktiven Verhaltensweisen benötigen eine Einschätzung von wahrscheinlichen Zukunftsszenarien, Kosten und Vorteilen (Trewavas, 2014).

2.5.2 Können Pflanzen lernen?

Schon in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden Informationsverarbeitung, Gedächtnis und Lernen in simplen dynamischen Systemen untersucht. Das Ziel war diese Konzepte auch auf nicht neuronale Systeme zu übertragen und geeignete Definitionen hierfür zu finden. Andererseits sollten Mechanismen in allen erdenklichen Prozessen, wie zum Beispiel Intelligenz auf molekularer Ebene, also das Speichern, Auslesen, Übertragen und Verarbeiten von Information in Systemen molekularer Interaktion untersucht werden. Dieser Auffassung nach ist Anpassung durch Lernen charakterisiert und Lernen ist die Fähigkeit eines Systems auf neue, verbesserte oder andere Art, als Resultat von Erfahrung, zu reagieren (Eigen & Maeyer, 1966). Das Lernen, Speichern und Nutzen vergangener Zustände oder Verhaltensweisen ist die Basis von intelligentem Verhalten. Diese Konzepte lassen sich zweifelsohne auch auf Pflanzen anwenden (Trewavas, 2014). Pflanzen sind also im Stande Informationen zu speichern und von ihren Erfahrungen zu lernen (Gagliano, Renton, Depczynski, & Mancuso, 2014; Karban, 2015).

2.5.3 Nervenloses intelligentes Verhalten

Das Wort Intelligenz kommt vom lateinischen *intelligere*, was so viel heißt wie „wählen zwischen“. Eine Wahl setzt immer das Erkennen von mindestens zwei sich manchmal widersprechender Umstände voraus. Die Auffassung, dass Gehirne für Intelligenz zwingend notwendig sind wird als Gehirnchauvinismus bezeichnet. Organismen können sich in komplexen Umwelten nicht alleine auf einfache Reflexe verlassen. Das Genom alleine reicht wahrscheinlich nicht aus um Lösungen für alle möglichen Probleme zu kodieren. Organismen lernen von ihrer Erfahrung und wenden diese bei zukünftigen Herausforderungen an. Lernen ist fundamental für intelligentes Verhalten (Trewavas, 2014).

So beeindruckt zum Beispiel *Physarum polycephalum*, ein Vertreter der echten Schleimpilze, durch seine Leistungen. Es konnte gezeigt werden, dass *Physarum* sein Netzwerk zwischen Futterquellen in einem Labyrinth so gestaltet, wie es zuvor in einem optimalen mathematischen Modell

vorhergesagt wurde. Es wurde daraus geschlossen, dass sein Netzwerk ein sehr gut gestaltetes System mit intelligentem Verhalten darstellt (Nakagaki, Kobayashi, Nishiura, & Ueda, 2004). Weiters wurde beobachtet, dass *Physarum* wenn er einer Serie von elektrischen Reizen ausgesetzt wird das zeitliche Muster dieser Ereignisse lernt und in Antizipation von nachfolgenden Reizen sein Verhalten ändert. Die Erinnerung dauert mehrere Stunden an und wird durch einen einzigen weiteren Reiz weiter verlängert (Saigusa, Tero, Nakagaki, & Kuramoto, 2008). Dies zeigt, dass der Ursprung von Intelligenz nicht nur in neuronalen Netzwerken zu suchen ist (Ball, 2008). Stellt man *Physarum* vor die Wahl mehrerer verschiedener Nahrungsquellen, wählt und vernetzt er diese im genauen Verhältnis seiner ernährungsphysiologischen Bedürfnisse. So konnte gezeigt werden, dass dieser gehirnlose Organismus selektive Nahrungssuche betreibt und in der Lage ist, ohne eine zentrale Informationsverarbeitung, komplexe Probleme zu lösen (Dussutour, Latty, Beekman, & Simpson, 2010).

Ähnliche Entdeckungen wurden auch bei einzelligen Amöben gemacht. So konnte ein Vertreter der Gattung *Paramecium* durch positive Verstärkung instrumentell und operant konditioniert werden. *Paramecium* kann also lernen und profitiert von seinen Erfahrungen (Armus, Montgomery, & Jellison, 2006). Sogar in Prokaryoten wurde Kommunikation beobachtet. Weiters können sie ihre eigene Kolonie gegenüber anderen diskriminieren, ihre Koloniestruktur zielgerichtet verändern und Entscheidungen treffen. Dies lässt auf eine Art sozialer Intelligenz schließen (Trewavas, 2014).

2.5.4 Intelligenz im Pflanzenreich

Es gibt die populäre Auffassung, dass Intelligenz alleine menschlichen Geschöpfen vorbehalten ist, weil man dafür im Stande sein muss zu sprechen und menschengemachte Tests zu lösen. Man könnte Intelligenz im weiteren Sinne, als die Kapazität Probleme zu lösen sehen, oder als Fähigkeit biologische Ziele in sich verändernden Umwelten zu verwirklichen. So gesehen müssten Pflanzen zweifelsohne als intelligente Organismen gelten. Die großen Unterschiede der Pflanzen zu den Tieren, wie zum Beispiel die dezentrale Verarbeitung von Informationen, der sessile Lebensstil und die viel langsamere Zeitskala in denen sich Pflanzen bewegen, machen es schwer die intelligenten Verhaltensweisen von Pflanzen zu erkennen. Auch Pflanzen gehen aktiv auf Nahrungssuche und zwar in mit Tieren vergleichbarer Weise. Zuerst sind sensorische Systeme nötig um Ressourcen aktiv zu suchen. Im Zeitraffer wird gut erkennbar, dass Sämlinge sich zum Beispiel in alle Richtungen hin orientieren, bis sie sich schließlich in Richtung des meisten Lichtes hin orientieren. Dem ersten Schritt des Suchens folgt also das Erkennen der Ressource. Um zum Beispiel mithilfe der Pulvini, eine verdickte Stelle an der Basis von Blattstielen, die Blätter genau in Richtung einer Lichtquelle ausrichten zu können, muss die Pflanze diese Richtung entdecken beziehungsweise erkennen. Oder zum Beispiel eine Nährstoffe suchende Wurzel muss diese Nährstoffe erkennen, sonst wäre es ihr nicht möglich bevorzugt in Bereiche erhöhter Nährstoffkonzentrationen zu wachsen. Im letzten Schritt muss eine Entscheidung getroffen werden. Nach der Bewertung von Kosten und Nutzen muss sich der Organismus für die optimale Lösung entscheiden. So entdeckte Charles Darwin schon im 19. Jahrhundert, dass rankende Pflanzen sich nicht wahllos an Gegenständen festwinden (Darwin, 1865). Stellt man einer Ranke einen Glasstab zur Verfügung windet sie sich zwar anfänglich um den Stab, da sie jedoch zu erkennen scheint, dass er eine zu glatte Oberfläche hat um sich effizient daran festzuhalten sucht sie weiter nach besserem Halt, dieses Verhalten wird mehrere Male wiederholt. Stellt man einen rauen Stab zur Verfügung windet sich die Ranke nach dem ersten Kontakt fest. Die Ranke muss also mindestens einen Unterschied zwischen Glasstab und Ast erkennen um sich gegen den Glasstab entscheiden zu können (Trewavas, 2014, 2016, 2017).

2.5.5 Mechanismen von pflanzlichem Verhalten und Intelligenz

Abiotischer Stress führt bei Pflanzen zu einer Serie von morphologischen, physiologischen, biochemischen und molekularen Veränderungen die das Pflanzenwachstum beeinflussen (Wang, Vinocur, Shoseyov, & Altman, 2001). Trockenheit, Salzgehalt, extreme Temperaturen und oxidativer Stress sind oft miteinander verknüpft (Jewell, Campbell, & Godwin, 2010). Während ihrer Evolution haben Pflanzen Mechanismen entwickelt um sowohl mit biotischem als auch abiotischem Stress umgehen zu können. Oft sind sie mit widrigen Umweltbedingungen konfrontiert. Diese bewältigen sie zum Beispiel durch die Regulation von verschiedenen Genen und Gensets. Die Antwort auf den Stress variiert abhängig von Faktoren wie die Art und Stärke der Stressoren, anderen Umweltbedingungen und so weiter (Wang, Vinocur, & Altman, 2003). Die Wahrnehmung der Stressoren induziert eine Signaltransduktion, welche Ionenkanäle, Kinase Kaskaden, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Akkumulation von Hormonen aktiviert (Cheong, Hur-Song, Gupta, Wang, & al, 2002). Diese Signale sind dann weiters für die gesamte Reaktion der Pflanze verantwortlich. Im Gegensatz zu Reaktionen auf biotischen Stress, welche meist monogenetische Merkmale darstellen, sind Reaktionen auf abiotischen Stress meist multigenisch und dadurch schwerer zu erforschen (Pérez-Clemente & Gomez-Cadenas, 2012; Vinocur & Altman, 2005).

Um auf die Umwelt reagieren und antworten zu können muss die Umwelt zuerst wahrgenommen werden. Dafür sind Rezeptorproteine auf der Plasmamembran verantwortlich. Diese von den Rezeptorproteinen aufgenommenen Stimuli werden daraufhin zu darunterliegenden intra- und interzellulären Downstream Signalprozessen transduziert. Rezeptorähnliche Kinasen spielen eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung von extrazellulären Liganden. Sie aktivieren die Downstream Prozesse durch Phosphorylierung von intrazellulären Serin/Threonin Kinase Domänen. Die Histidin Kinasen sind ebenfalls auf der Membran lokalisiert und nehmen osmotischen Stress und Pflanzenhormone wahr. Viele Gene spielen eine Rolle bei der Wahrnehmung von Umweltreizen während des Lebenszyklus von sessilen Pflanzen. Es konnte gezeigt werden, dass rezeptorähnliche Kinasen und Histidin Kinasen eine wichtige Rolle beim Verhalten von Pflanzen auf abiotischen Stress, im speziellen auf osmotischen Stress, durch die Regulation von Abscisinsäure, spielen (Osakabe, Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, & Tran, 2013).

Das Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) reguliert die adaptive Antwort von Pflanzen auf Stress wie Trockenheit, hohen Salzgehalt, und extreme Temperaturen mittels vielfältiger physiologischer und ontogenetischer Prozesse (Arbona & Gómez-Cadenas, 2008). Der ABA Syntheseweg ist gut untersucht und viele Enzyme die eine Schlüsselrolle spielen sind mittels transgener Pflanzen benutzt worden um die Stressantwort zu verändern beziehungsweise zu verbessern. Transgene Pflanzen, welche Gene die im ABA Syntheseweg eine Rolle spielen überexprimieren, zeigen eine erhöhte Toleranz gegenüber Trockenheit und hohen Salzgehalt (Park et al., 2008; Pérez-Clemente & Gomez-Cadenas, 2012; Trujillo et al., 2008).

Ein anderer Mechanismus um das Verhalten gegenüber osmotischen Stress, der durch Trockenheit oder hohe Salzgehalte ausgelöst wird, zu modulieren ist die vermehrte Produktion von geeigneten gelösten Stoffen um in erster Linie den Zellturgor im geeignete Rahmen zu halten, aber auch um oxidativen Stress und Proteindenaturierungen durch die Stabilisierung von Membranen und Proteinen zu vermeiden (Munns & Tester, 2008). Beispiele für Osmoregulatorische Stoffe sind Glycinbetain und Prolin. Diese Stoffe werden bei einer Vielzahl von Stressantworten in erhöhtem Maße produziert und angereichert, wie zum Beispiel als Antwort auf osmotischen Stress, extreme Temperaturen, ultraviolette Strahlung oder Anreicherungen von Schwermetallen. Es ist jedoch

nicht abschließend geklärt, ob es sich bei der Bildung dieser Stoffe um eine adaptive Antwort oder um ein Produkt der Bedingungen handelt (Ashraf & Foolad, 2007).

Eine Vielzahl von hormonellen, physikalischen und chemischen Stresssignalen löst eine vorübergehende Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Pflanzenzellen aus. Die Art und Weise der Ca^{2+} Erhöhung ist abhängig vom Stimulus. Im Gegensatz zu tierischen Zellen sind in Pflanzen viele Isoformen von Calmodulin bekannt. Calmodulin ist ein Ca^{2+} bindendes regulatorisches Protein das als Second Messenger andere Proteine aktiviert. Die verschiedenen Isoformen haben Zell- und Gewebespezifität in ihrer Expression und Verteilung und sind potentiell für die Calcineurin Phosphatase Aktivität verantwortlich. Calmodulin befindet sich unter anderem auf der pflanzlichen Plasmamembran. In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass Calcineurin abhängig von einer signalinduzierten Änderung der Ca^{2+} -Konzentration ist. Interessanterweise ist Calcineurin dem Frequinin, einem neuronalen Ca^{2+} -Sensor im Cytosol, der bei der Vesikel Fusion und Neurotransmitter Freisetzung in Tieren eine Rolle spielt, sehr ähnlich. Calcineurin reguliert in der Pflanzenzelle den Einstrom von K^+ , Na^+ und Ca^{2+} durch Plasmamembrankanäle. Pflanzliche Bewegungen wie Heliotropismus, Schlafbewegungen, rapide Berührungsantworten oder Regulation von Stomata bedingen massive Veränderungen von K^+ und Cl^- Strömen in und aus den Motorzellen, was eine Änderung des Turgors zur Folge hat. Hier spielt wiederum Calcineurin eine entscheidende Rolle bei der Koordinierung von pflanzlichen Bewegungen. Calmodulin, Phospholipase C, Ca^{2+} -ATPase, Ca^{2+} abhängige Protein Kinasen und andere Protein Kinasen spielen alle eine entscheidende Rolle bei der Transduktion von Signalen durch den cytosolischen Ca^{2+} -Signalweg. Signalepisoden heben den Ruhezustand der Ca^{2+} -Konzentration für längere Zeit an, was einen möglichen zellulären Mechanismus für Lernen im Pflanzenreich darstellt. So wäre es auch möglich das gelernte für die Antizipation von zukünftigen Ereignissen zu verwenden. Es gibt also Eigenschaften die sich sowohl tierische als auch pflanzliche Signaltransduktionsnetzwerke teilen. Lernen führt auf zellulärer Ebene zu einer Beschleunigung einer Antwort auf den Stimulus. In neuronalen Netzwerken geschieht das durch die Erhöhung der Anzahl und Stärke zwischen den Verbindungen der einzelnen Neuronen. Bei Pflanzen geschieht das wahrscheinlich über vermehrte Bildung von wesentlichen Bestandteilen des Ca^{2+} -Signalweges. Diese zellulären Mechanismen bilden die Grundlage von pflanzlichem Lernen und Gedächtnis und im weiteren Sinne für zelluläre und pflanzliche Intelligenz (Trewavas, 1999).

2.5.6 *In vitro* Kultur: Die Methode der Wahl

Die pflanzliche *in vitro* Kultur ist eine wissenschaftliche Methode von unschätzbarem Wert, sowohl für die Grundlagen- als auch für die angewandte Forschung. Mit ihr ist es möglich die grundlegenden Aspekte die der Entwicklung von Pflanzen zugrunde liegen zu untersuchen, ohne Störung von unkontrollierbaren biotischen und abiotischen Faktoren. Sie erlaubt eine sehr große Zahl an Individuen auf kleinstem Raum unter kontrollierten Bedingungen das ganze Jahr über zu erforschen. Dies ist wichtig um Mechanismen pflanzlichen Verhaltens zu identifizieren und aufzuklären (Pérez-Clemente & Gomez-Cadenas, 2012).

In den letzten Jahrzehnten wurde die *in vitro* Kultur ein integraler Bestandteil der Fortschritte in den Pflanzenwissenschaften. Sie erlaubt eine strenge Kontrolle und präzise Manipulation der physikalischen, chemischen und biotischen Umwelt der Pflanzen, was mit konventionellen Methoden kaum oder gar nicht realisierbar wäre. Weiters können komplexe Interaktionen zum Beispiel zwischen Organen oder Organen und der Umwelt dargestellt werden und der Stresslevel kann genau dokumentiert und kontrolliert werden. Ohne die pflanzliche *in vitro* Kultur wäre ein Verständnis des Metabolismus und der Interaktionen von Pflanzenhormonen nur unzureichend möglich (Bairu & Kane, 2011).

Es ist meist sehr schwer die Antworten von Pflanzen auf Umweltreize zu untersuchen. In Feldversuchen sind die Pflanzen einer Vielfalt von komplexen Reizkombinationen ausgesetzt, was es nahezu unmöglich macht Effekte von einzelnen Stimuli zu untersuchen. Die Methode der *in vitro* Kultur bietet Möglichkeiten die Effekte von einzelnen Stimuli auf physiologischer und biochemischer Ebene zu untersuchen. Sie stellt also eine gute und in vielen Fällen bessere Alternative zu Feldversuchen dar (Pérez-Clemente & Gomez-Cadenas, 2012).

2.6 Was ist *Cannabis sativa*?

Es ist umstritten, ob das Genus *Cannabis* mono- oder polytypisch ist. Es gibt die Auffassung, dass es drei *Cannabis* Spezies gibt, nämlich *C. sativa*, *C. indica* und *C. ruderalis* (Schultes, Klein, Plowman, & Lockwood, 1974). Diese Einteilung wird zwar von neueren genetischen Untersuchungen bestätigt (Hillig, 2005), jedoch ist eine solche Einteilung der meisten modernen Züchtungen in dieses Artkonzept durch die Jahrzehnte andauernde Kreuzung nicht möglich (McPartland, 2017). Andere Autoren gehen davon aus, dass *C. sativa* die einzige Spezies im Genus *Cannabis* ist, welche weiter in die Subspezies *C. sativa* ssp. *sativa* und *C. sativa* ssp. *indica* unterteilt werden (Small & Cronquist, 1976). Die meisten Autoren gehen heute im Sinne von Linnaeus von einem monotypischen Genus *Cannabis* mit der hochgradig polymorphen Spezies *C. sativa* aus (Farag & Kayser, 2017; Raman, Lata, Chandra, Khan, & ElSohly, 2017).

Cannabis sativa ist eine einjährige und natürlicherweise zweihäusige Pflanze mit starker Pfahlwurzel und aufrechtem Stamm. Der Stamm ist meist gefurcht, verzweigt, manchmal hohl, verholzt und ein bis sechs Meter lang. Die Verzweigungen können wechsel- oder gegenständig sein. Das Wurzelsystem besteht aus einer verzweigten Pfahlwurzel mit Adventivwurzeln und dringt 30 bis 250 cm ins Erdreich ein. Die Blätter sind grün und handförmig, oft mit sieben Fingern, variiert jedoch stark mit der genetischen Abstammung. Die Blätter können wechselständig, gegenständig oder spiraling angeordnet sein. Die Finger der Blätter sind sechs bis elf Zentimeter lang und zwei bis fünfzehn Millimeter breit. Der Rand ist gesägt. Die Blattoberfläche kann mit harzigen Trichomen übersäht sein. Die Blütenstände bestehen aus zahlreichen Blütenköpfen, welche sich auf langen, belaubten Stielen der Blattachseln befinden. Die männlichen Blüten bestehen aus fünf blassgrünen, haarigen Kelchblättern, welche 2,5 bis 4 mm lang sind und fünf hängenden Staubblättern mit Staubfäden. Die weiblichen, beinahe stiellosen Blüten treten in Paaren auf. Die Verbreitungseinheit ist eigentlich nicht der Samen selbst, sondern eine Achäne, eine nussähnliche Schließfrucht. Sie ist hartschalig und dicht von einer dünnen Wand der Ovarien umhüllt, ellipsoid, zwei bis fünf Millimeter lang, glatt, meist bräunlich und marmoriert (Farag & Kayser, 2017).

Die Pflanze dient dem Menschen seit jeher als Lieferant für Fasern, Ölsaft und Arzneistoffe beziehungsweise Rauschmittel. So wurden die Genpools schon früh getrennt und später teilweise wieder hybridisiert, was die Klassifizierung nur schwer möglich macht. Folgende genetische Gruppen haben eine Erwähnung verdient: (Small, 2017)

1. Pflanzen zur Gewinnung von Fasern, im geringen Maß für Ölsaft
niedriger THC- und hoher CBD-Gehalt
Westasien und Europa
2. Pflanzen zur Gewinnung von Fasern, im geringen Maß für Ölsaft
niedriger bis mittlerer THC- und hoher CBD-Gehalt
Ostasien, speziell China
3. Pflanzen zur Gewinnung von Cannabinoiden, Sativa-Typ
hoher THC- und niedriger CBD-Gehalt
Süd- und Zentralasien

4. Pflanzen zur Gewinnung von Cannabinoiden, Indica-Typ
hohe THC- und CBD-Gehalte
Südasien, speziell Afghanistan
5. Hybriden zwischen 1 und 2 zur Gewinnung von Fasern
6. Hybriden zwischen 3 und 4 zur Gewinnung von Cannabinoiden (Small, 2017)

2.7 Warum Cannabis?

2.7.1 Quelle von Nahrung

Die Samen und deren Öl sind ein hochwertiges Nahrungsmittel. Das kaltgepresste Öl enthält bis zu 80 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einem omega-6/omega-3 Verhältnis von 3:1. Es enthält unter anderem Linolsäure, α -Linolensäure, γ -Linolensäure und Stearidonsäure, welche nur in sehr wenigen Pflanzen beziehungsweise Nahrungsmitteln vorkommen. Außerdem enthält es Tocopherole und hochqualitative Proteine. Alle diese Stoffe sind bekannt dafür, dass sie der menschlichen Gesundheit zuträglich sind (Chen et al., 2010; Petrović, Debeljak, Kezić, & Džidara, 2015).

2.7.2 Quelle von Fasern

Der Hanf liefert sowohl Bast- als auch Holzfasern von sehr guter Qualität. Die Fasern haben durch ihren Gehalt an Cannabinoiden, Sterinen, Triterpenen, Phenolen und Alkaloiden eine antibakterielle Wirkung und sind für technische Anwendungen sehr interessant, sowohl für die Textil- und Verpackungs- als auch für die Bauindustrie (Gutiérrez & Jose, 2005; Khan, Warner, & Wang, 2014). Der Gehalt an hochwertigen Fasern macht Hanf zu einem geeigneten Modellorganismus für die Untersuchung der sekundären Zellwandbiosynthese und den darunterliegenden molekularen Prozessen, wie zum Beispiel die Ablagerung von gelatinösen kortikalnen Bastfasern oder zentralen Holzfasern (Andre, Hausman, & Guerriero, 2016).

2.7.3 Quelle von Arzneistoffen und Drogen

Hanf ist mit seinen Inhaltstoffen eine herausragende Arzneipflanze und bietet neben einigen wenigen Gefahren eine Unzahl an medizinischen Anwendungen, wie zum Beispiel die Linderung von Schmerzen (Preedy, 2016). Cannabinoide sind die am besten untersuchten sekundären Pflanzenstoffe im Hanf. Zu ihnen gehören zum Beispiel Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabigerol (CBG), Cannabichromen (CBC) und mehr als 90 weitere. Bis heute stand vor allem THC im Fokus der Wissenschaft. Dies hatte auch in der Zucht einen starken Einfluss. Es wurde Wert auf THC-reiche Sorten gelegt, wobei der CBD Gehalt keine Rolle zu spielen schien und dadurch sehr niedrig wurde. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass CBD alleine und in Verbindung mit anderen Stoffen medizinisch interessante Wirkungen besitzt (Burstein, 2015). Es sind aber außer den Cannabinoiden weitere interessante Stoffgruppen, wie Terpene und Phenole im Hanf enthalten (Flores-Sanchez & Verpoorte, 2008). Diese haben auch gesundheitsfördernde Wirkung und zeigen Entourage-Effekte mit Cannabinoiden. So kann zum Beispiel CBD bei zu hohen Dosen von eingenommenem THC, als Antidot wirken. Es kann durch Synergieeffekte die vielseitige pharmazeutische Verwendung der Inhaltstoffe der Hanfpflanzen noch weiter ausgebaut und verbessert werden (Russo, 2011). Das Wissen über die in Hanf enthaltenen Stoffe und deren therapeutische Anwendung ist bedauerlicherweise, auch heute noch, durch die weitgehende Illegalität und Kriminalisierung der Pflanze und ihrer Konsumenten, stark eingeschränkt (Andre et al., 2016).

2.7.4 Potentieller Modellorganismus

Cannabis sativa ist eine schnellwachsende weitgehend stresstolerante Pflanze. Sie ist sehr gut erforscht und es ist viel über ihren Anbau und ihre Wachstumsbedürfnisse bekannt. Es gibt viele Studien über ihre Inhaltstoffe und deren Synthesewege. *Cannabis* ist ein Lieferant von wichtigen Gütern, wie Nahrung, Fasern und Arzneistoffen. Der Faseranteil macht diese Pflanze zu einem geeigneten Modell für die sekundäre Zellwandsynthese. Durch die Jahrtausende lange Kultivierung des Menschen gibt es eine sehr hohe genetische Vielfalt innerhalb dieser Spezies, welche intensiv beforscht wird. Die Zweihäusigkeit bietet interessante Möglichkeiten bei der Erforschung der Geschlechtsvererbung (Karlov, Razumova, Alexandrov, Divashuk, & Kroupin, 2017). Biotechnologische Anwendungen sind auch gut untersucht (Chandra, Lata, & ElSohly, 2017). Diese Eigenschaften machen *Cannabis sativa* zu einem geeigneten Modellorganismus in der Biologie, sowie *Arabidopsis thaliana* oder *Zea mays* (Strable & Scanlon, 2009) es schon lange sind.

2.7.5 Werkzeug für die Neurowissenschaften

Für die Grundlagenforschung in den Neurowissenschaften kann Hanf mit seinen Inhalten auch ein interessantes Werkzeug darstellen. Das Endocannabinoid-System besteht im engeren Sinne aus dem Cannabinoidrezeptor Typ-1 (CB₁R) und Typ-2 (CB₂R), zwei G-Protein gekoppelte Transmembranproteine. Die am besten untersuchten endogenen Liganden sind Anandamid und 2-Arachidonylglycerol. Diese haben jedoch, wie die Phytocannabinoide auch, mehrere Zielrezeptoren und nicht nur CB₁R und CB₂R. Außerdem gibt es für deren Abbau nicht nur einen Stoffwechselweg und ein Set von Enzymen, sondern viele und so erklärt sich die diverse Wirkungsweise der unterschiedlichen Endo- und Phytocannabinoide. Der Abbau dieser Stoffe führt manchmal wiederum zu rezeptorbindenden Stoffen (Marzo & Piscitelli, 2015). Das Endocannabinoid-System spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Gehirns. So konnte im Cortex von Nagetieren gezeigt werden, dass CB₁R im Wachstumskegel von γ -Aminobuttersäure enthaltenden (GABAergic) Axonen, in der späten Embryonalphase, angereichert werden. Endocannabinoide triggern CB₁R Internalisierung in das Zellinnere und Elimination von Filopodien. Außerdem induzieren sie Chemorepulsion und den Kollaps der axonalen Wachstumskegel der GABAergic Interneuronen durch die Aktivierung von GTPasen. In gleicher Weise schwächen Endocannabinoide bei *Xenopus laevis* den Galvanotropismus der Neuronen ab. Weiters zeigen kortikale Interneurone, welche einen CB₁R Mangel aufweisen eine verminderte Fähigkeit ihre Zielbereiche zu finden. Dies zeigt, dass Endocannabinoide die Axone, bei ihrem Wachstum zu ihren Zielbereichen führen, und somit die Synaptogenese und die Zielwahl der Axone bei der Gehirnentwicklung regulieren (Berghuis et al., 2007).

2.8 *In vitro* Kultur von *Cannabis sativa*

Hanf gilt als notorisch hartnäckig in Bezug auf die *in vitro* Kultur (Andre et al., 2016) obwohl dieses Vorgehen gerade für diese Pflanzenspezies gut geeignet wäre. Durch die Heterogenität der Spezies *Cannabis sativa* ist die Variation, von über Samen vermehrten Pflanzen nämlich sehr groß, selbst wenn die Samen von einem Individuum stammen. Darum kommt für die meisten Anwendungen nur die klonale Vermehrung von ausgewählten Mutterpflanzen in Frage. Dies geschieht meist über konventionelle Verfahren, wie das Schneiden von Stecklingen. Diese Methode ist jedoch arbeitsintensiv und anfällig für die Weitergabe von Krankheitserregern, wie zum Beispiel Blattläuse, Spinnmilben, Mehltau oder verschiedene Viruserkrankungen. Die *in vitro* Kultur bietet hier einige Vorteile gegenüber den konventionellen Vermehrungsverfahren. Diese Form der Vermehrung kann nicht nur sehr viele Pflanzen mit den gewünschten Eigenschaften in kurzer Zeit erzeugen, sondern bietet auch die Möglichkeit Pflanzen, frei von jeglichen Krankheitserregern, in Massen zu

produzieren. Auch neues Genmaterial kann so also schnell vervielfältigt werden. Die *in vitro* Kultur ist jedoch auch eine notwendige Methode um genetische Modifikation überhaupt erst durchführen zu können. Außerdem ist die *in vitro* Kultur eine hervorragende Methode um eine Vielzahl an Genotypen zu konservieren. Dies kann durch laufende *in vitro* Propagation oder durch Kryokonservierung erfolgen. Es bestehen auch noch eine Vielzahl von weiteren biotechnologischen Verfahren, die ohne die *in vitro* Kultur nicht möglich wären, wie zum Beispiel Kalluskulturen, Zellsuspensionskulturen und Wurzelkulturen (Lata, Chandra, Khan, & ElSohly, 2017).

So konnten zum Beispiel aus Kallus von *Cannabis sativa* Haarwurzelkulturen gewonnen werden. Aus diesen Haarwurzelkulturen konnten Cannabinoide gewonnen werden. Diese Haarwurzelkulturen könnten eventuell im industriellen Maßstab eine Quelle von Cannabinoiden darstellen. Das wäre wichtig, weil ein weiter steigender Bedarf zu weiteren Engpässen bei der Produktion führen wird. Probleme bei diesem Verfahren stellen die geringen Ausbeuten und die rentable Produktion im großen Maßstab dar (Farag & Kayser, 2015). Zellsuspensionkulturen sind eine weitere Methode um Cannabinoide ohne vollständige Pflanzen zu produzieren (Flores-Sanchez et al., 2009).

Aktuell versuchen mehrere Unternehmen ein wirtschaftliches *in vitro* Verfahren für Hanf zu entwickeln. So zum Beispiel Phytoplant Research S.L. in Spanien. Dieses Unternehmen hat gute Erfolge mit eigens entwickelten Kulturmedien speziell für Cannabis, so wird zum Beispiel Kokosfaser als Substrat verwendet. Dieses Unternehmen arbeitet aktuell auch daran die Blütenbildung bei automatisch blühenden Pflanzen zu unterdrücken (pers. Komm. Salvatore Casano, 2017). In Österreich arbeiten zurzeit die AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, 1220 Wien, Spargelfeldstrasse 191) und Flowery Field GmbH (Hosnedlgasse 12/Objekt 3, 1220 Wien) daran ein wirtschaftliches *in vitro* Verfahren für Hanf zu entwickeln, dies stellt die Unternehmen jedoch vor enorme Herausforderungen aufgrund des schlechten Wuchsverhaltens bei der Verwendung von herkömmlichen *in vitro* Kulturmethoden (pers. Komm. Andrea Kodym, 2017).

2.8.1 Kulturmedien

Es werden in vielen Pflanzenspezies positive Resultate erzielt, wenn die Zusammensetzung der Nährstoffe im Medium weitgehend der Zusammensetzung der Nährstoffe in der Pflanze entspricht. Dazu wird eine Elementaranalyse der zu propagierenden Pflanze, in einem guten physiologischen Zustand durchgeführt und daraufhin das Medium angepasst (Bouman, Morris, & Tiekstra, 2001; Henry, Fulcheri, & Morard, 1999). Meistens wird jedoch in der *in vitro* Kultur das von Murashige und Skoog für die Varietät Wisconsin 38 der Spezies *Nicotiana tabacum* entwickelte MS-Medium verwendet (Murashige & Skoog, 1962). So auch bei der *in vitro* Kultur von *Cannabis*. Es wurden in einem Zeitraum von 1972 bis 2016 über 75 % der Versuche mit MS-Medien durchgeführt (Lata et al., 2017).

Der Großteil der Autoren verwendet MS-Medien für *Cannabis* ohne Alternativen zu testen (Chaohua et al., 2016; Flores-Sanchez et al., 2009; Lata, Chandra, Khan, & ElSohly, 2009a, 2010, 2009b; Lata, Chandra, Mehmedic, Khan, & ElSohly, 2012; Lata, Chandra, Tech, Khan, & ElSohly, 2016; Loh, Hartsel, & Robertson, 1983; Movahedi, Ghasemi-Omrani, & Torabi, 2015; Slusarkiewicz-Jarzina, Ponitka, & Kaczmarek, 2005; Wang et al., 2009).

Ausnahmen zur ausschließlichen Verwendung des MS-Mediums bilden die Verwendung von B5-Medium (Gamborg, Miller, & Ojima, 1968) in Zellsuspensionskulturen (Hartsel, Loh, & Robertson, 1983) und Kallus- und Haarwurzelkulturen (Farag & Kayser, 2015) sowie die Verwendung von

DARIA-Medium zur Kalluskultur und Sprossinduktion (Wielgus, Luwanska, Lassocinski, & Kaczmarek, 2008).

Einen Vergleich von einem MS-Medium mit einem eigens entwickelten Medium, dem β -Based-Medium, stellten Casano und Grassi an. Die besten MS-Medium basierten Resultate zeigte ein Medium mit MS-Nährsalzen, Gamborgs B5 Vitaminen, 3 % Saccharose, 0,1 % Aktivkohle und einem pH-Wert von 5,8. Es wurden im β -Based-Medium in Zusammenarbeit mit CANNA Research die Nährsalzgehalte den physiologischen Bedürfnissen von *Cannabis* angepasst. Im Vergleich von MS-Medium mit β -Based-Medium zeigte das β -Based-Medium eine deutlich höhere Wachstums- und Vermehrungsrate (Casano & Grassi, 2009).

2.8.2 Wuchsstoffe

Verschiedene Wuchsstoffe finden bei der *in vitro* Kultur von *Cannabis* Verwendung (Tab. 1). So wurde das Auxin 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) schon in den 1980er Jahren für Kallus- und Zellsuspensionskulturen eingesetzt (Hartsel et al., 1983; Loh et al., 1983).

Tab. 1 Verwendung von Wuchsstoffen in der Literatur

Verwendung	Wuchsstoffe
Zellkultur	KIN + 2,4-D; 2,4,5-T
Kalluskultur	NAA; DICAMBA; 2,4,5-T
Haarwurzelkultur	NAA
Sprossinduktion	BAP + IBA; TDZ; m-T
Wurzelinduktion	BAP + IBA; IBA; m-T

Der Wuchsstoff 1-Naphthylessigsäure (NAA), welcher eine auxinanaloge Wirkung aufweist, wurde für Kallus- und Haarwurzelkulturen verwendet (Farag & Kayser, 2015; Lata et al., 2010).

Das Auxin 3,6-Dichlor-2-methoxybenzoësäure (Dicamba) wurde für die Induktion von Kallus verwendet (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005).

Benzylaminopurin (BAP), ein Cytokinin wurde in Kombination mit dem Auxin 4-(Indol-3-yl)buttersäure (IBA) für die Spross- und Wurzelregeneration eingesetzt (Movahedi et al., 2015).

Das Auxin IBA alleine wurde erfolgreich für die Bildung von Wurzeln vor der Akklimatisierung verwendet (Chaohua et al., 2016; Lata et al., 2009b, 2012; Wang et al., 2009).

Eine Kombination des Cytokinin Kinetin (KIN) und des Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) wurden für Zellkulturen verwendet (Flores-Sanchez et al., 2009).

Thidiazuron (TDZ), ein Wuchsstoff mit Cytokinin-ähnlicher Wirkung, wurde alleine und in Kombination mit anderen Wuchsstoffen erfolgreich für die Sprossproliferation eingesetzt (Chaohua et al., 2016; Lata et al., 2010, 2009b, 2012; Movahedi et al., 2015; Wang et al., 2009).

Meta-Topolin (m-T), ein Adenin basiertes Cytokinin, wurde erfolgreich für ein einstufiges Massenpropagationsverfahren verwendet. Dabei wurde nicht zuerst ein Wuchsstoff für die Sprossförderung, zum Beispiel TDZ und anschließend einer für die Rhizogenese, zum Beispiel IBA verwendet, sondern es findet der ganze Prozess von Sprossproliferation und Rhizogenese in einem Schritt auf einem Medium statt (Lata, Chandra, Tech, et al., 2016).

2.8.3 Oberflächensterilisationsverfahren

Sehr oft wird in der *in vitro* Kultur von *Cannabis* für die oberflächliche Sterilisation der Explantate Natriumhypochlorit (NaOCl) verwendet. Oft wird eine Konzentration von 0,5 % (w/v) empfohlen (Lata et al., 2010; Lata, Chandra, Khan, & ElSohly, 2016; Lata et al., 2009b; Lata, Chandra, Tech, et al., 2016). Es werden auch höhere Konzentrationen bis 3 % (w/v) und Vorbehandlungen mit Schwefelsäure und Ethanol verwendet (Chaohua et al., 2016). Außer NaOCl ist auch der erfolgreiche

Einsatz von Quecksilberchlorid (HgCl_2) dokumentiert (Wang et al., 2009). Quecksilberchlorid wurde aufgrund seiner Giftheit in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

2.8.4 Konservierung und Lagerung

Konservierung von genetischen Ressourcen spielt bei heterogenen Spezies wie dem Hanf eine große Rolle. Die *in vitro* Kultur bietet neben konventionellen Verfahren, bei denen vor allem die Ausbreitung von Krankheitserregern und deren Befall von Pflanzen ein Problem darstellt, gute Möglichkeiten um gesunde Pflanzen zu erhalten. Neben der Kryokonservierung bei Temperaturen weit unter dem Gefrierpunkt, besteht auch die Möglichkeit durch langsamem Wuchs unter aseptischen Bedingungen die genetische Ressource für die Zukunft zu erhalten. Verlangsamter Wuchs wird meist durch kühle Temperaturen und geringe Beleuchtungsstärke erzielt (Kozai et al., 2005), oder aber durch die Zugabe von osmotisch aktiven und wachstumshemmenden Substanzen oder aber das Weglassen von wachstumssteigernden Wuchsstoffen. Es wurden auch schon synthetische Samen über mehrere Monate bei Temperaturen von 5 bis 25°C gelagert und wieder erfolgreich angebaut. Synthetische Samen erhält man, indem kleine Axillarknospen von aseptischen Pflanzen aus der *in vitro* Kultur in Calciumalginat Kugelchen eingebettet werden. Mit diesen synthetischen Samen kann man ähnlich wie mit echten Samen verfahren. Sie sind eine bestimmte Zeit lagerfähig und können *in vitro* oder *in vivo* ausgesät werden (Lata et al., 2012).

Ein Problem das sowohl bei der Konservierung, als auch bei der klonalen Vermehrung eine Rolle spielen kann, ist der Übergang von der vegetativen in die reproduktive Phase, also die Blütenbildung. Eine vegetative also klonale Vermehrung von Hanf setzt voraus, dass sich die Pflanzen im vegetativen Stadium befinden, weil diese im fortgeschrittenen reproduktivem Stadium das vegetative Wachstum zur Gänze einstellen und lediglich Blüten produzieren. Die meisten Hanfarten, so auch der Wildtyp, sind obligatorische Kurztagpflanzen, das heißt sie beginnen die Blüte, wenn die Dunkelphase eine Dauer von circa 10 bis 12 Stunden aufweist. Es gibt jedoch auch Sorten, darunter einige Faser- und Industriehanfarten, bei denen ein Verhältnis von 16 Stunden Photoperiode und 8 Stunden Dunkelphase lediglich eine Verzögerung der Blütenbildung auslöst (Lisson, Mendham, & Carberry, 2000). Unter Freilandbedingungen beginnt die Blüte, zum Beispiel der EU-zertifizierten Sorten Felina 34 und Futura 75 spätestens Ende Juli, kann jedoch zur Sommersonnenwende am 21. Juni schon voll in Gang sein (Cosentino, Testa, Scordia, & Copani, 2012). Ein derartiges Blühverhalten ist von einer Kurztagpflanze nicht zu erwarten.

2.8.5 Photoautotrophe *in vitro* Kultur als Alternative

Unter den üblichen *in vitro* Kulturbedingungen ernähren sich die Pflanzen einerseits phototroph durch die Nutzung von Licht, jedoch andererseits auch heterotroph durch energieliefernde Nährstoffe im Medium, vor allem Saccharose. Das hat einen mixotrophen Stoffwechsel zur Folge. Einerseits hemmt die Saccharoseaufnahme der Pflanze die Photosyntheseleistung. Andererseits ist durch die mehr oder weniger hermetisch abgeschlossenen Kulturgefäße das enthaltene Kohlendioxid (CO_2), das zur Photosynthese nötig ist, schnell verbraucht und somit der CO_2 -Gehalt zu gering. So stellt sich bei genauerer Betrachtung heraus, dass sich Pflanzen unter den üblichen *in vitro* Kulturbedingungen eben mixotroph verhalten, das heißt zu Beginn der Photoperiode verbrauchen sie das im Dunkelzyklus angereicherte CO_2 autotroph durch Photosynthese, bis der CO_2 -Gehalt zu niedrig wird. Danach ernähren sie sich heterotroph von der im Medium enthaltenen Saccharose bis der CO_2 -Gehalt wieder hoch genug für Photosynthese ist (Kozai et al., 2005).

Es gibt aber auch Bestrebungen den Pflanzen in der *in vitro* Kultur ein Milieu zu schaffen, das vielmehr den Bedingungen entspricht unter denen sich Pflanzen evolviert haben. Außer einigen

wenigen Ausnahmen sind alle Pflanzen zur Photosynthese fähig und ernähren sich photoautotroph. Dieser Fähigkeit wird unter konventionellen Bedingungen im Glashaus oder am Feld Beachtung geschenkt. Die Pflanzen werden außer mit Nährstoffen auch mit viel Licht und teilweise mit CO₂ versorgt, weil die optimale CO₂-Konzentration für gut versorgte Pflanzen über dem atmosphärischen Niveau liegt. In der *in vitro* Kultur hingegen liegt das Hauptaugenmerk auf Art und Konzentration von geeigneten Wuchsstoffen oder organischen Zusätzen wie Vitaminen, die dem Medium zugefügt werden. Der Beleuchtungsstärke wird wenig und der CO₂-Konzentration keinerlei Beachtung geschenkt. Bei manchen Pflanzenarten führt diese Herangehensweise trotzdem zu wünschenswerten Ergebnissen, bei anderen jedoch wird das pflanzliche Potential so nicht ausgeschöpft. Es sollte also bei Problemen von Nodien- und Sprossvermehrungen in der *in vitro* Kultur die Etablierung einer phototrophen Kultur in Betracht gezogen werden. Dabei werden dem Medium im Idealfall keinerlei organische Substanzen zugefügt. Geliermittel wie Agar sollten auch nicht verwendet werden, stattdessen sollten feste Substrate wie Steinwolle, Vermiculit oder Zellulose in Flüssigmedium getränkt werden. Die Pflanze muss ausreichend mit Licht versorgt werden und der CO₂-Gehalt muss für eine effiziente Photosynthese hoch genug sein (Kubota, 2001). Dies kann man durch passive Belüftung mittels Gasaustausch durch Membranen, die keine Krankheitserreger durchlassen, oder durch Zwangsbelüftung erreichen. Bei der Zwangsbelüftung wird sterile Luft oder CO₂ mittels Druck kontrolliert in die Kulturgefäße eingeleitet (Kozai et al., 2005; Zobayed, Afreen, Xiao, & Kozai, 2004).

Die Etablierung von photoautotrophen Kulturen bietet zahlreiche Vorteile. Die Wurzelbildung ist in Medien mit fester-, flüssiger- und Gasphase meist wesentlich besser im Vergleich zu semisoliden gelierteren Medien (Xiao, Niu, & Kozai, 2011). Die Gefahr von Kontaminationen ist wesentlich geringer, weil sich keine Kohlenstoffquellen für Mikroben im Medium befinden. In der *in vitro* Kultur werden oft, unter photoautotrophen Bedingungen, nicht pathogene Mikroben zum Problem, die von den Zuckern und Vitaminen im Medium profitieren. Unter gewöhnlichen *in vitro* Bedingungen muss sich die Pflanze bei der Akklimatisierung von mixotrophen auf autotrophe Bedingungen umstellen und so zum Beispiel das Schließen von Stomata wieder erlernen. Die Akklimatisierung von photoautotrophen *in vitro* Kulturen wird wesentlich erleichtert, weil die Bedingungen im Kulturgefäß und während der Akklimatisierung nahezu identisch sind (Kozai et al., 2005; Nguyen, Xiao, & Kozai, 2016). Die photoautotrophe *in vitro* Kultur in großen Kulturgefäßen wurde auch schon kommerziell erfolgreich eingesetzt (Xiao & Kozai, 2004).

Weil eben Hanf als notorisch hartnäckig in Bezug auf die *in vitro* Kultur gilt (Andre et al., 2016), kann gerade in diesem Fall, wo die üblichen Verfahren der *in vitro* Kultur keine befriedigenden Ergebnisse erzielen, die Etablierung von photoautotrophen *in vitro* Kulturen ungeahnte Möglichkeiten bieten.

3 Material und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Versuche dienten einerseits oberflächlich sterilisierte Samen welche *in vitro* gekeimt wurden. Von diesen Sämlingen wurden dann Nodien und Sprossspitzen für die weitere Subkultivierung gewonnen. Andererseits wurden im Gewächshaus unter konventionellen gärtnerischen Bedingungen Mutterpflanzen aus Samen gezogen, welche über klonale Vermehrung mittels Stecklingen vervielfältigt wurden. Diese Mutterpflanzen und deren Klone dienten dann als Quelle von Nodien und Sprossspitzen für die weitere *in vitro* Kultur.

3.1.1 Verwendete Hanfsorten

Es wurden die europäischen zertifizierten Nutzhanfsorten **Futura 75**, **Santhica 27**, **Fedora 17** und **Finola** verwendet. Außerdem wurde eine Nutzhanfsoorte **Arzneigarten** verwendet, welche seit mehreren Generationen im Arzneigarten des Institutes für Pharmakognosie über Samen vermehrt wurde, deren genaue Abstammung jedoch unbekannt ist. Weiters wurde ein Wildtyp dessen Samen in Himachal Pradesh, Indien (31°59'43.4"N 77°30'27.6"E) gesammelt wurden und die Sorte **Felina 32**, welche aus einer Packung Speisesamen der Davert GmbH entnommen wurde, angebaut (Tab. 2).

Tab. 2 Verwendete Hanfsorten

Bezeichnung	Diözisch	Obligatorische Kurztagpflanze	Sonstiges
Futura 75	Nein	Nein	Zertifiziertes Saatgut
Santhica 27	Nein	Nein	Zertifiziertes Saatgut
Fedora 17	Nein	Nein	Zertifiziertes Saatgut
Finola	Ja	Nein	Zertifiziertes Saatgut
Felina 32	Nein	Unbekannt	Speisesamen, F2-Hybrid
Arzneigarten	Nein	Nein	Sortenreine Inzuchtvariante
Wildtyp	Ja	Ja	Herkunft Indien

3.1.2 Anbau der Mutterpflanzen

Die in Tab. 2 gelisteten Hanfsorten wurden im Glashaus des Institutes für Pharmakognosie als Mutterpflanzen konventionell auf handelsüblicher Pflanzenerde angebaut. Es stand circa eine Fläche von 5 m² zur Verfügung (Abb. 1). Um den Übergang der vegetativen in die reproduktive Phase zu verhindern bzw. hinaus zu zögern wurden diese Pflanzen 18 Stunden pro Tag beleuchtet. Als Leuchtmittel dienten Osram BioLux Leuchtstoffröhren (4 x 58 Watt, 3700 lm, Farbtemperatur 6500 K) und Aequator LEDs (1 x 300 Watt, 1 x 150 Watt, Wellenlängen der verbauten LEDs: 410 nm, 455 nm, 632 nm, 660 nm). Die Lichtstärke betrug nur mit Kunstlicht, an der dunkelsten Stelle auf Höhe des höchsten Triebes 95 µmol/(m²s), mit zusätzlichem Tageslicht an einem leicht bewölkten Tag zur Mittagszeit 605 µmol/(m²s). Die Mutterpflanzen wurden mit regelmäßigen Düngergaben versorgt. Als Dünger diente Nutri Forte AB von Bio Nova (Tab. 4, S. 20).



Abb. 1 Anbau der Mutterpflanzen im Gewächshaus

3.1.3 Vegetative Vermehrung der Mutterpflanzen über Stecklinge

Zur vegetativen Vermehrung aller angebauten Mutterpflanzen wurden Stecklinge geschnitten und unverzüglich in Steinwollwürfel mit 25 mm Kantenlänge gesteckt. Zuvor wurden die Steinwollwürfel mit AB Dünger für Hydrokultur (Tab. 4, S. 20) mit einem EC-Wert von 1,3 mS/cm in der Lösung und einem pH-Wert von 5,8 getränkt. Die Stecklinge wurden die erste Woche in eine Akklimatisationskammer gestellt. Innerhalb dieser Woche wurde die Luftfeuchtigkeit kontinuierlich von 95 %rH auf 70 %rH gesenkt. Die Lichtstärke betrug circa 50 µmol/(m²s) bei einer Belichtungsdauer von 18 Stunden pro Tag. Nach einer Woche wurden die Stecklinge ins Glashaus gestellt.

3.2 Medien

Als Nährsalz bzw. Düngemittel wurde einerseits das MS-Medium verwendet (Murashige & Skoog, 1962). Es wurde als gebrauchsfertiges Pulver bezogen. Anderseits fand ein Zwei-Komponenten Flüssigdünger AB für den hydroponischen Anbau, Nutri Forte A+B, Verwendung. Dieser Dünger ist unter anderem in spezialisierten Geschäften für die Kultivierung von Hanf erhältlich. Die Nährstoffzusammensetzungen unterscheiden sich teilweise erheblich voneinander (Tab. 3). Die Düngemitteldeklaration des AB Düngers wurde in mmol/L Düngemittellösung, bei einer Konzentration von 2 mL Dünger pro Liter Wasser umgerechnet.

Tab. 3 Nährstoffgehalt der Düngemittellösungen in mmol/L, in eckiger Klammer nicht essentielle Nährstoffe nach (Schubert, 2011)

Nährstoffe	MS-Medium	AB	Entspricht % (w/v) des Düngemittels
N (Stickstoff)	60,028	13,450	8 % (N)
P (Phosphor)	1,25	0,91	6,5 % (P ₂ O ₅)
K (Kalium)	20,055	2,525	12 % (K ₂ O)
S (Schwefel)	1,730	1,211	4 % (SO ₃ ²⁻)

Ca (Calcium)	3,0	4,1	9,5 % (CaO)
Mg (Magnesium)	1,5	2,6	4 % (MgO)
Fe (Eisen)	0,1	0,028	0,065 % (Fe)
Mn (Mangan)	0,1	0,0081	0,016 % (Mn)
Cu (Kupfer)	0,0001	0,00132	0,002 % (Cu)
Zn (Zink)	0,03	0,003	0,007 % (Zn)
Mo (Molybdän)	0,001	-	
B (Bor)	0,1	0,018	0,012 % (B)
Cl (Chlor)	6,0	2,676	4,74 % (Cl)
Ni (Nickel)	-	-	
[Si (Silizium)]	-	0,019	0,027 % (Si)
[Na (Natrium)]	0,002	-	
[Co (Cobalt)]	0,0001	-	
[I (Jod)]	0,005	-	
Total	93,901	27,552	

Für die Herstellung der Medien fanden außer den Nährsalzen, welche essentiell für die Pflanzenernährung sind, noch eine Vielzahl von nicht essentiellen Stoffen Verwendung (Tab. 4). Als Geliermittel wurden Gelrite und Agar verwendet. Um den pH-Wert auf den Zielwert 5,8 einzustellen wurde HCl verwendet um den pH-Wert zu senken und NaOH um ihn zu heben. Als organische Zusätze dienten Saccharose und MS-Vitamine (Tab. 5, S. 21). Zugesetzte Wuchsstoffe waren Thidiazuron (TDZ) und meta Topolin (m-T).

Tab. 4 Liste verwendeter Stoffe

Bezeichnung	Name	Chem. Details	Verwendungs- zweck	Hersteller
Gelrite	Gellan	Polysaccharid	Geliermittel	Sigma-Aldrich
Agar	Agar-Agar	Polysaccharid	Geliermittel	Sigma-Aldrich
HCl	Salzsäure	HCl, 36,46 g/mol	pH-Regulation	
NaOH	Natronlauge	NaOH, 39,997 g/mol	pH-Regulation	
MS-Medium	Murashige & Skoog Nährsalz	Details siehe Tab. 3	Dünger	Duchefa Biochemie B.V., Niederlande
AB	Nutri Forte A+B	Details siehe Tab. 3	Dünger für Hydrokultur	Bio Nova B.V., Niederlande
Sac	Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , 342,30 g/mol	Pflanzen- ernährung	Wiener Zucker
MS-Vit	Murashige & Skoog Vitamine	Details siehe Tab. 5	Förderung der Vitalität	Duchefa Biochemie B.V., Niederlande
TDZ	Thidiazuron	C ₉ H ₈ N ₄ OS, 220,25 g/mol	Wuchsstoff	
m-T	Meta Topolin	C ₁₂ H ₁₁ N ₅ O, 241,4 g/mol	Wuchsstoff	Duchefa Biochemie B.V., Niederlande
A-Kohle	Aktivkohle		Zusatz	

Saccharose wird zur heterotrophen Ernährung der Pflanzen als organischer Zusatz verwendet. MS-Vit (Tab. 5) werden zur Förderung des Wuchses zugesetzt. Edamin wurde zwar original von Murashige und Skoog 1962 zugesetzt, fand jedoch in dieser Arbeit keinerlei Verwendung.

Tab. 5 Zusammensetzung der MS-Vit (Murashige & Skoog, 1962)

Stoff	Summenformel	Molare Masse (g/mol)	Zugesetzte Menge (mg/L)
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	100
Nicotinsäure	C ₆ H ₅ NO ₂	123,11	0,5
Pyridoxin	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169,18	0,5
Thiamin	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	337,27	0,1
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	75,07	2

3.2.1 Herstellung

Zur Herstellung von 1,5 L Medium wurde ein 1 L Messkolben circa bis zur Hälfte mit reinem Wasser gefüllt. Daraufhin wurden alle Bestandteile zugesetzt, während ein Magnetrührer für permanente Durchmischung sorgte. Bei der Verwendung von Gelrite war darauf zu achten, dass zuerst der AB-Dünger dem Wasser zugefügt wurde. In umgekehrter Reihenfolge kam das konzentrierte Düngemittel mit Gelrite in Kontakt, was ein Ausfallen und Verklumpen zur Folge hatte. Es war auch von Vorteil, wenn man das Geliermittel vor dem Auflösen mit z.B. Zucker mischte, um einem Verklumpen beim Einrühren in die Flüssigkeit entgegen zu wirken. Die so entstandene Lösung wurde auf das Zielvolumen mit Wasser aufgefüllt. Daraufhin wurde der pH-Wert auf den Zielwert 5,8 mit HCl oder NaOH (Tab. 4, S. 20) eingestellt.

Das noch flüssige Medium wurde dann in die Kulturgefäße abgefüllt und verschlossen.

Das Medium in den Kulturgefäßen wurde im Autoklaven für 20 Minuten bei 121 °C und einem Überdruck von 1 bar sterilisiert. Danach musste das Medium noch im heißen und flüssigen Zustand mittels Schütteln durchmischt werden, um ein homogenes Resultat zu erhalten. Beim Erkalten verfestigte sich dann das Medium und wurde gekühlt bis zum Gebrauch gelagert.

3.2.2 Medienzusammensetzungen

Für die sterile Aussaat wurden die Medien #1, #2 und #3 ausschließlich in Reagenzgläsern (Durchmesser: 25 mm, Höhe: 150 mm) mit je 11 mL Medium verwendet. Für die Sprosskulturen wurden die Medien #1 bis #12b in Reagenzgläser (Durchmesser: 25 mm, Höhe: 150 mm) zu je 11 mL und die Medien #21 bis #25 wurden in Hipp Gläser (Durchmesser: 61 mm, Höhe: 96 mm) zu je 50 mL gefüllt. Medien mit dem Buchstaben a enthielten MS-Vit mit dem Buchstaben b nicht (Tab. 6).

Tab. 6 Liste der Medienformulierungen

Medium	x-fache Konzentration	Saccharose % (w/v)	Andere organische Zusätze	Wuchsstoff (µmol/L)	Geliermittel	Verwendung
#1	-	-	-	-	Agar	Samenkeimung
#2	½ MS	3	MS-Vit	-	Gelrite	Samenkeimung
#3	MS	-	MS-Vit	-	Gelrite	Samenkeimung
#4	½ AB	-	-	-	Gelrite	Sprosskultur
#5	½ AB	3	-	-	Gelrite	Sprosskultur
#6	½ AB	3	MS-Vit	0,5 TDZ	Gelrite	Sprosskultur

#7	AB	-	-	0,5 TDZ	Gelrite	Sprosskultur
#8	$\frac{1}{2}$ MS	-	-	0,5 TDZ	Gelrite	Sprosskultur
#9 ^a	MS	3	MS-Vit	0,5 TDZ	Gelrite	Sprosskultur
#10a ^b	MS	3	MS-Vit, 0,5 g/L A-Kohle	2 m-T	Agar	Sprosskultur
#10b	MS	3	0,5 g/L A-Kohle	2 m-T	Agar	Sprosskultur
#11	$\frac{1}{2}$ AB	1	-	-	Gelrite	Sprosskultur
#12a	AB	1	MS-Vit	2 m-T	Gelrite	Sprosskultur
#12b	AB	1	-	2 m-T	Gelrite	Sprosskultur
#21	MS	3	MS-Vit	2 m-T	Gelrite	Sprosskultur
#22	MS	1	MS-Vit	2 m-T	Gelrite	Sprosskultur
#23	MS	1	MS-Vit	-	Gelrite	Sprosskultur
#24	MS	-	MS-Vit	-	Gelrite	Sprosskultur
#25	AB	-	-	-	Gelrite	Sprosskultur

Quellen: ^a(Lata et al., 2009b), ^b(Lata, Chandra, Tech, et al., 2016)

3.3 Kulturbedingungen

3.3.1 Kulturraum

Im Kulturraum hatte es 25 ± 1 °C bei einer Luftfeuchte von 50 %rH. Um Kondensation in den Kulturgefäßen zu verhindern, wurden die Regalböden mittels Mattenkühlung etwas kühler als die Umgebungstemperatur gehalten. Die Photoperiode betrug 16 Stunden pro Tag (Abb. 2).

Im Kulturraum herrschten drei verschiedene Lichtbedingungen:

1. Eine Mischung aus Sylvania GroLux (Farbtemperatur 8500 K) und Osram BioLux (Farbtemperatur 6500 K) Leuchtstoffröhren. Die Beleuchtungsstärke betrug 45 – 64 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.
2. Ausschließlich Osram BioLux Leuchtstoffröhren. Die Beleuchtungsstärke betrug 54 – 64 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.
3. Philips MASTER LEDtube HF InstantFit EVG (26 Watt, Farbtemperatur 6500 K) LED-Röhren. Die Beleuchtungsstärke betrug 146 – 176 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.



Abb. 2 Hipp Gläser im Kulturraum

3.3.2 Kühlraum

Im Kühlraum hatte es 8 °C bei einer Photoperiode von 18 Stunden pro Tag und einer Beleuchtungsstärke von 32 – 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$. Zur Beleuchtung wurden Osram Lumilux Warm White Leuchtstoffröhren eingesetzt. Es herrschte eine Luftfeuchtigkeit von 50 %rH.

3.4 Oberflächensterilisationsmethoden

3.4.1 Sterilisationsmittel

Zum Sterilisieren der Oberflächen von Samen und Pflanzenteilen wurden NaOCl und NaDCC (Sigma Aldrich Best-Nr.: 218928) verwendet. Die NaOCl-Lösung wurde aus einer 10 % (w/v) NaOCl-Lösung

bereitet. Das NaDCC wurde als Pulver eingewogen und in reinem Wasser gelöst. Den Lösungen wurde Tween 20 zugefügt um eine vollständige Benetzung des zu sterilisierenden Materials zu erzielen. In manchen Fällen wurde zur Vorbehandlung der zu sterilisierenden Samen Ethanol (Alk) oder H_2SO_4 verwendet (Tab. 7).

Tab. 7 Verwendete Oberflächensterilisationsmittel und Zusätze

Bezeichnung	Name	Summenformel
NaOCl	Natriumhypochlorid	NaOCl
NaDCC	Natriumdichlorisocyanurat	$C_3Cl_2N_3NaO_3$
Tween 20	Polysorbat 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$
Alk	Ethanol	C_2H_6O
H_2SO_4	Schwefelsäure	H_2SO_4

3.4.2 Sterilisationsmethoden

Die Samen wurden mit Methode I bis IX, welche NaOCl oder NaDCC in verschiedenen Konzentrationen enthielten, oberflächlich sterilisiert (Tab. 8). Die frischen Pflanzenteile, also Nodien und Triebspitzen, wurden ausschließlich mit Methode X (0,5 % (w/v) NaOCl Lösung) oberflächlich sterilisiert. Die Samen beziehungsweise das frische Pflanzenmaterial wurde zuerst in Wasser gewaschen um grobe Verunreinigungen zu entfernen. Danach wurde mit der Vorbehandlung bzw. Oberflächensterilisation begonnen (Tab. 8).

Nach erfolgter Oberflächensterilisation wurden die Samen und frischen Pflanzenteile in einer sterilen Werkbank auf die autoklavierten Medien in den Kulturgefäßen gesetzt. Samen wurden ohne weitere Manipulation auf die Medien gelegt. Von dem frischen Pflanzenmaterial wurden, vor dem Einsetzen, die Schnittflächen entfernt, weil diese durch die Sterilisationsmittel angegriffen waren. So wurde erreicht, dass die Explantate nur aus gesundem, lebendem Gewebe bestanden.

1. Bei manchen Methoden fand eine Vorbehandlung mit Alk oder H_2SO_4 statt.
2. Das Material wurde für eine bestimmte Zeit in einer bestimmten Sterilisationslösung oberflächlich sterilisiert. Dies fand unter ständiger Durchmischung auf einem Magnetrührer statt.
3. Das Material wurde kurz mit destilliertem und sterilem Wasser abgespült.
4. Das Material wurde in destilliertem und sterilem Wasser unter sterilen Bedingungen mehrmals für eine bestimmte Zeit gewaschen um Rückstände des Desinfektionsmittels zu entfernen. Nach jedem Waschgang wurde das Wasser erneuert (Tab. 8).

Tab. 8 Verwendete Oberflächensterilisationsmethoden

Methode	1. Vorbehandlung	2. Oberflächensterilisation	4. Waschen
	Art und Dauer	Art und Konzentration des Sterilisationsmittels	Dauer der Einwirkzeit
I	Alk 70 % (v/v) 1 min	NaOCl 1 % (w/v)	30 min
II ^a	Alk 70 % (v/v) 10 sec	NaOCl 1 % (w/v)	20 min
III	Alk 70 % (v/v) 3 min	NaOCl 2,8 % (w/v)	30 min
IV	H_2SO_4 1 mol/L 20 sec	NaOCl 2,8 % (w/v)	20 min
V	Alk 70 % (v/v)	NaOCl 0,1 % (w/v)	10 min
			4 x 5 min

Vla	NaOCl 0,1 % (w/v)	10 min	3 x 10 min
Vlb	NaOCl 0,5 % (w/v)	10 min	3 x 10 min
Vlc	NaOCl 1 % (w/v)	10 min	3 x 10 min
Vld	NaOCl 1,5 % (w/v)	10 min	3 x 10 min
VII	NaOCl 0,5 % (w/v)	10 min	4 x 10 min
VIII	NaDCC 3 % (w/v)	10 min	3 x 10 min
IX	NaDCC 1 % (w/v)	10 min	3 x 10 min
X^b	NaOCl 0,5 % (w/v)	20 min	3 x 10 min

Quellen: ^a(Wielgus et al., 2008), ^b(Lata, Chandra, Techen, et al., 2016)

3.4.3 Keimung oberflächlich sterilisierter Samen

Ziel des Versuches war es einerseits die Samen für weitere Versuche keimfrei zu bekommen und andererseits die in Tab. 8 aufgelistete Oberflächensterilisationsmethoden, ausgenommen Methode X, anhand von Samen und deren Keimung zu evaluieren. Methode X wurde ausschließlich für die oberflächliche Sterilisation von frischen Pflanzenteilen, also nicht für Samen verwendet.

Tab. 9 Überblick: Keimung oberflächlich sterilisierter Samen

Pflanzensorten	Futura 75, Santhica 27, Fedora 17, Finola, Felina 32, Arzneigarten
Pflanzenmaterial	Samen
Stichprobengröße Total	792
Beleuchtung	Lichtbedingung 1 [45 – 64 µmol/(m ² s)]
Kulturgefäß	Reagenzglas
Verschluss	Magenta 2-way Cap
Medien	#1 bis #3
Oberflächensterilisationsmethoden	I bis IX
Erhobene Daten	steril/kontaminiert, gekeimt/nicht gekeimt
Berechnete Daten	Mittelwerte und Standardabweichung von Gruppen zu je 36 Individuen

Bei der sterilen Aussaat von Samen wurden insgesamt 792 Samen oberflächlich mit den Oberflächensterilisationsmethoden I bis IX sterilisiert. Es wurden die Samen der Sorten Futura, Fedora, Finola, Santhica und Arzneigarten verwendet. Diese wurden nach der oberflächlichen Sterilisation auf einer sterilen Werkbank in Reagenzgläsern mit den Medien #1, #2 und #3 angesetzt (Tab. 9).

Es wurde die Anzahl der Individuen in den vier Kategorien kontaminiert & gekeimt, kontaminiert & ungekeimt, steril & gekeimt und steril & ungekeimt erhoben. Ein Reagenzglasträger fasste 36 Stück, und es wurden bei den Oberflächensterilisationsmethoden VII bis IX mehrere Durchgänge mit Einheiten zu je 36 Individuen durchgeführt. So war es möglich Mittelwerte und Standardabweichungen und somit die Zuverlässigkeit der Methode zu analysieren.

3.4.4 Etablierung oberflächlich sterilisierter Pflanzenteile

Ziel dieses Versuches war es einerseits keimfreies Pflanzenmaterial für weiter Versuche zu gewinnen und andererseits die in der Literatur häufig verwendete Oberflächensterilisationsmethode X anhand von frischem Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus zu

evaluieren. Das oberflächlich sterilisierte Pflanzenmaterial wurde unter *in vitro* Bedingungen kultiviert.

Tab. 10 Überblick: Etablierung oberflächlich sterilisierter Pflanzenteile

Pflanzensorten	Futura 75, Santhica 27, Fedora 17, Finola, Felina 32, Arzneigarten, Wildtyp
Herkunft Pflanzenmaterial	Glashaus
Stichprobengröße	396
Beleuchtung	Lichtbedingung 1 [45 – 64 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$]
Kulturgefäß	Reagenzglas
Verschluss	Magenta 2-way Cap
Medien	#4 bis #12b
Oberflächensterilisationsmethode	X
Erhobene Daten	steril/kontaminiert
Berechnete Daten	Sterilrate in %, Standardabweichung von Gruppen zu je 36 Individuen

Bei der Etablierung oberflächlich sterilisierter frischer Pflanzenteilen wurde insgesamt 396 Explantate mit Methode X oberflächlich sterilisiert. Es wurde die Anzahl der keimfreien Individuen erhoben. Ein Reagenzglasträger fasste 36 Stück, und es wurden elf Durchgänge mit Einheiten zu je 36 Individuen durchgeführt. So war es möglich Mittelwerte und Standardabweichungen und somit die Zuverlässigkeit der Methode zu analysieren.

Es wurden die Sorten Felina, Futura, Finola, Santhica, Fedora, Arzneigarten und der Wildtyp verwendet. Es wurde ausschließlich die Oberflächensterilisationsmethode X und die Medien #4 bis #12b verwendet (Tab. 10). Bevor die oberflächlich sterilisierten Pflanzenteile auf die Medien in den Kulturgefäßen gesetzt wurden, wurden Schnittstellen, welche mit dem Sterilisationsmittel in Kontakt kamen und von diesem angegriffen wurden entfernt. Dieser Schritt wurde auf einer sterilen Werkbank durchgeführt.

3.5 Micropropagation auf verschiedenen Kulturmedien

Ziel des Versuches war es Medien zu finden auf denen Hanf eine hohe Vermehrungsrate aufweist. So wurden die in Tab. 6 (S. 21) aufgelisteten Medien #4 bis #12b in Bezug auf ihre Eignung auf ihnen Hanf *in vitro* zu kultivieren verglichen. Um eine möglichst allgemein gültige Aussage treffen zu können und somit eine robuste Methode zu erarbeiten, wurden verschiedene Geno- und Phänotypen verwendet.

Tab. 11 Überblick: Micropropagation auf verschiedenen Kulturmedien

Pflanzensorten	Futura 75, Santhica 27, Fedora 17, Finola, Felina 32, Arzneigarten
Herkunft Pflanzenmaterial	<i>In vitro</i> Sämlinge, <i>in vitro</i> Pflanzen, Glashaus
Stichprobengröße Total	549
Beleuchtung	Lichtbedingung 1 [45 – 64 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$]
Kulturgefäß	Reagenzgläser
Verschluss	Magenta 2-way Cap
Medien	#4 bis #12b
Versuchsdauer	14 bis 52 Tage
Erhobene Daten	Sprosshöhe, Anzahl Nodien, Anzahl Wurzeln, Blütenbildung

Berechnete Daten	Höhenzuwachs pro 10 Tage, Zuwachs Nodienanzahl pro 10 Tagen, Wurzelbildung % der Individuen
-------------------------	---

Es wurden Nodien und Triebspitzen einerseits von Mutterpflanzen aus dem Gewächshaus und andererseits aus der *in vitro* Kultur von allen vorhandenen Sorten, bis auf den Wildtyp verwendet. Die frischen Pflanzenteile aus dem Gewächshaus wurden mit Methode X oberflächlich sterilisiert.

Als Kulturgefäße dienten Reagenzgläser (Durchmesser: 25 mm, Höhe: 150 mm), diese wurden in Träger zu je 36 Stück gestellt und mit Magenta 2-way Caps verschlossen. Es wurden die Medien #4 bis #12b verwendet (Tab. 6, S. 21). Die Kulturen wurden in den Kulturraum unter Lichtbedingung 1 (Sylvania GroLux und Osram BioLux Leuchtstoffröhren, Beleuchtungsstärke 45 – 64 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$) gestellt. Pro Kulturgefäß wurde ein Explantat eingesetzt.

Es wurden die totale Sprosshöhe, die Anzahl an Nodien, die Anzahl gebildeter Wurzeln und die Blütenbildung zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 14 und 52 Tagen erhoben (Tab. 11, S. 25).

Es wurden für die Sprosshöhen und gebildeten Nodien Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen wurden die Zuwächse von Höhen und Nodien pro zehn Tagen berechnet. Es wurde dabei darauf geachtet, dass sich die Zuwächse linear verhielten.

3.6 Micropropagation in Kulturgefäßen mit erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese

3.6.1 Vorversuch in Reagenzgläsern

Ziel des Versuches war es zu untersuchen ob eine erhöhte Möglichkeit zur Photosynthese die Wachstums- und Vermehrungsraten erhöhen. Dazu wurden zwei Kulturbedingungen miteinander verglichen. Die Kontrollgruppe wurde unter den üblicherweise verwendeten Kulturbedingungen gehalten, Lichtbedingung 2 und Verschluss der Kulturgefäße mit Magenta 2-way Caps. Die Kontrollgruppe wird im Weiteren als „Normal“ bezeichnet. Die zweite Gruppe erhielt eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Möglichkeit zur Photosynthese und wird im Weiteren als „Photo+“ bezeichnet. Dies wurde durch eine stärkere Beleuchtung (Lichtbedingung 3) und erhöhten Gasaustausch mit der Umgebung durch den Verschluss des Kulturgefäßes mit Steristopfen erreicht (Tab. 12).

Tab. 12 Überblick: Vorversuch der Kulturbedingungen mit erhöhten Möglichkeit zur Photosynthese

Pflanzensorte	Santhica 17
Herkunft Pflanzenmaterial	Glashaus
Stichprobengröße	Normal: 36 Photo+: 18
Beleuchtung	Normal: Lichtbedingung 2 [54-64 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$] Photo+: Lichtbedingung 3 [146-176 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$]
Kulturgefäß	Reagenzglas
Verschluss	Normal: Magenta 2-way Cap Photo+: Steristopfen
Medien	#12a, #12b
Versuchsdauer	Normal: 17 Tage Photo+: 14 Tage

Erhobene Daten**Berechnete Daten**

Sprosshöhe, Nodienanzahl

Höhenzuwachs pro Tag, Zuwachs Nodienanzahl
pro Tag, Nodienanzahl pro cm Pflanzenhöhe

Für den Vorversuch wurden Triebspitzen der Sorte Santhica 17 aus dem Glashaus verwendet. Diese wurden mit Methode X oberflächlich sterilisiert und in Reagenzgläser mit Medium #12a und #12b gesetzt (Tab. 6, S. 21). Medium #12 enthält generell AB-Dünger in voller Konzentration, 1 % (w/v) Saccharose, 2 μ mol m-T und wurde mit Gelrite geliert. Medium #12a enthielt MS-Vitamine wohingegen #12b keine Vitamine enthielt.

Es wurden 36 Reagenzgläser für die normale Bedingung als Kontrollgruppe verwendet. Für die Versuchsgruppe (Photo+) wurden 18 Reagenzgläser mit Steristopfen verschlossen (Abb. 3). Jeweils die Hälfte der normalen und der Photo+ Bedingungen wurde auf Medium #12a und die andere auf #12b propagiert.

Zur Beleuchtung der 36 Reagenzgläser unter normalen Bedingungen wurden Osram BioLux Leuchtstoffröhren eingesetzt. Die Beleuchtungsstärke betrug 54 – 64 μ mol/(m²s).

Im Gegensatz dazu wurde zur Beleuchtung der 18 Reagenzgläser der Versuchsgruppe Philips MASTER LED-Röhren bei einer Beleuchtungsstärke von 146 – 176 μ mol/(m²s) verwendet.

Es wurden die Sprosshöhe, die Anzahl der Nodien erster Ordnung und die totale Anzahl an Nodien erhoben. Daraus wurde der Höhenzuwachs pro Tag, der Zuwachs an Nodien pro Tag und die Anzahl an Nodien pro cm beziehungsweise 10 mm Pflanzenhöhe als Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Pflanzen unter den Photo+ Bedingungen wurden nach 14 Tagen und jene unter normalen Bedingungen nach 17 Tagen ausgewertet.

3.6.2 Versuch in Hipp Gläsern

Ziel dieses Versuches war es wie im Vorversuch zu untersuchen, ob eine erhöhte Möglichkeit zur Photosynthese das Wuchsverhalten verbessert. Dazu wurden wie im Vorversuch zwei Kulturbedingungen, nämlich Normal und Photo+ verglichen, jedoch mit Verwendung größerer Kulturgefäße. Es wurden Hipp Gläser mit einem Durchmesser von 61 mm, einer Höhe von 96 mm und einer Füllmenge des Mediums von 50 mL verwendet. Außerdem wurde das Wuchsverhalten unter den zwei verschiedenen Kulturbedingungen auf fünf verschiedene Medien untersucht, von welchen zwei keine Saccharose enthielten und so zu einer photoautotrophen Kultur führen mussten.



Abb. 3 Santhica auf Medium #12a; oben: Photo+ Bedingungen; unten: normale Bedingungen

Tab. 13 Überblick: Kulturbedingungen mit erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese

Pflanzensorte	Felina 32
Herkunft Pflanzenmaterial	Glashaus
Stichprobengröße	Normal: 100 Photo+: 100
Beleuchtung	Normal: Lichtbedingung 2 [54-64 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$] Photo+: Lichtbedingung 3 [146-176 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$]
Kulturgefäß	Hipp Glas
Verschluss	Normal: Magenta B-Cap Photo+: Magenta B-Cap mit Membran
Medien	#21 bis #25
Versuchsdauer	36 Tage
Erhobene Daten	Höhenzuwachs, Zuwachs Nodienanzahl, Überlebensrate
Berechnete Daten	Quartile
Statistische Auswertung	Kruskal-Wallis-Test ($p < 0,05$)

Es wurden 200 Triebspitzen der Sorte Felina 32 von einer einzigen Mutterpflanze verwendet. Diese wurden mit Methode X oberflächlich sterilisiert.

Als Kulturgefäße dienten Hipp Gläser (Abb. 4). Diese wurden für die normalen Bedingungen der Kontrollgruppe mit Magenta B-Caps verschlossen und mit Osram BioLux Leuchtstoffröhren (Lichtbedingung 2) beleuchtet. Die Beleuchtungsstärke betrug 54 – 64 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$.

Für die Versuchsgruppe (Photo+) waren die Deckel zur besseren Belüftung durchbohrt und mit Polytetrafluorethylen Flasking Patches (Durchmesser: Total 16 mm; Membran 9 mm) von Tissue Quick Plant Labs verschlossen, um den Eintritt von Kontaminationen zu verhindern. Zur Beleuchtung dieser Hipp Gläser unter Bedingungen mit erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese, also mit erhöhtem Gasaustausch durch die Flasking Patches auf der Bohrung des Verschlusses und erhöhter Beleuchtung, wurden Philips MASTER LED-Röhren bei einer Beleuchtungsstärke von 146 – 176 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ verwendet (Lichtbedingung 3).

Es wurden die Medien #21 [MS-Medium, 3 % Suc. (w/v), MS-Vitamine, 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ m-T], #22 [MS-Medium, 1 % Suc. (w/v), MS-Vitamine, 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ m-T], #23 [MS-Medium, 1 % Suc. (w/v)], #24 [MS-Medium, 0 % Suc., MS-Vitamine] und #25 [AB-Medium, 0 % Suc.] verwendet (Tab. 6, S. 21).

Es wurde der Höhenzuwachs, der Nodienzuwachs und die Überlebensrate nach 21 und 36 Tagen erhoben (Tab. 13).

Der statistische Vergleich der fünf verschiedenen Medien mit und ohne erhöhte Möglichkeit zur Photosynthese wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Aufgrund der nicht normalverteilten Daten konnte keine ANOVA durchgeführt werden. Es wurde also ein 2-seitiger



Abb. 4 von links nach rechts Medium #21 bis #25; oben: normale Bedingungen; unten Photo+ Bedingungen

multipler Vergleich der p-Werte mittels Kruskal-Wallis-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ durchgeführt.

3.7 Etablierung einer aseptischen photoautotrophen Kultur durch Zwangsbelüftung

3.7.1 Vorversuch ohne Zwangsbelüftung

Ziel dieses Vorversuches war es zu untersuchen, wie die Pflanzen auf eine aseptische photoautotrophe Kultur mit guter Belüftung bei Verwendung von handelsüblicher Pflanzenerde als Medium reagieren.

Tab. 14 Überblick: Vorversuch zur photoautotrophen Kultur ohne Zwangsbelüftung

Pflanzensorte	Felina 32, Futura 17, Santhica 27, Arzneigarten
Herkunft Pflanzenmaterial	Glashaus
Stichprobengröße Total	4
Beleuchtung	Lichtbedingung 3 [146-176 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$]
Kulturgefäß	Hipp Glas
Verschluss	Petrischale + Watte
Medien	Anzuchterde
Versuchsdauer	40 Tage
Erhobene Daten	Photodokumentation der Pflanzen und Wurzelbildung

Es wurden für diesen Versuch Hipp Gläser verwendet. Diese wurden mit Watte und durchsichtigen Petrischalen derart verschlossen, dass einerseits zwischen Glas und Petrischale die Watte dafür sorgte, dass keine Kontaminationen eindringen konnten, jedoch vermehrter Luftaustausch ermöglicht wurde (Abb. 5). Ziel dieses Vorgehens war es während der gesamten Photoperiode Photosynthese zu ermöglichen. So konnte auch mehr Licht von oben durch die transparenten Petrischalen einfallen als mit Magenta B-Caps. Die Gläser wurden mit Anzuchterde der Compo Sana GmbH (Ausgangsstoffe: Hochmoortorf H₂ – H₇, Perlite, NPK-Dünger, Agrosil, Kalk; Salzgehalt KCl < 3,0 g/L; N 50 – 250 mg/L, P₂O₅ 80 – 250 mg/L, K₂O 100 – 350 mg/L) befüllt, autoklaviert und mit oberflächensterilisierten Pflanzen bestückt. Als Explantate dienten Sprosse von Mutterpflanzen aus dem Gewächshaus. Es wurde je ein Individuum der Sorte Arzneigarten, Futura, Santhica und Felina verwendet (Tab. 14).



Abb. 5 Hipp Glas mit Anzuchterde und Verschluss für gute Belüftung

3.7.2 Zwangsbelüftete Weck Gläser

Ziel dieses Versuches war die Etablierung einer aseptischen photoautotrophen *in vitro* Kultur mittels Zwangsbelüftung. Es wurden drei poröse und ein geliertes Medium verwendet (Tab. 15).

Tab. 15 Überblick: Etablierung einer aseptischen photoautotrophen Kultur durch Zwangsbelüftung

Pflanzensorte	Wildtyp
Herkunft Pflanzenmaterial	Glashaus
Stichprobengröße Total	8 (2 pro 4 Gläser)
Beleuchtung	Lichtbedingung 2 (mit gereinigten Schutzhüllen) Außerhalb Kulturgefäß: 85 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ Innerhalb Kulturgefäß: 66 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$

Kulturgefäß	Weck Gläser
Verschluss	Glasdeckel mit Gummidichtung und zwei Durchbohrungen für Luftein- und Luftauslass
Medien	Vermiculit, Steinwolle, Erde, #4
Versuchsdauer	34 Tage
Erhobene Daten	Photodokumentation der Pflanzen und Wurzelbildung

Die zwangsbelüfteten Weckgläser wurden im Kulturraum aufgestellt (Abb. 6).

Zur Beleuchtung der Weckgläser (Höhe außen: 240 mm, Durchmesser außen: 120 mm, Fassungsvermögen: 2 L) mit Zwangsbelüftung wurden Lichtbedingung 2 mit ganz neuen Osram BioLux Leuchtstoffröhren eingesetzt. Außerdem wurden die alten vergilbten dursichtigen Schutzröhren, welche als Schutz für die Leuchtstoffröhren dienen, durch neue ersetzt. So wurde eine erhöhte Beleuchtungsstärke von 85 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ erzielt. Die Beleuchtungsstärke innerhalb der Weckgläser betrug 66 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$. Zur zwanghaften Belüftung der Gläser wurde während der Photoperiode (16 Stunden pro Tag) sterile Druckluft eingeleitet. Die getrocknete Luft vom Kompressor wurde, bevor sie in die Gläser eingeleitet wurde, wieder befeuchtet um Flüssigkeitsverluste des Mediums zu vermeiden. Die Luft wurde dazu, in einer zur Hälfte mit Wasser gefüllten 2 L Flasche, mittels eines Rohres unterhalb des Wasserspiegels zum Austreten gebracht. Weiters strömte die befeuchtete Luft durch einen Sterilfilter mittels Schlauch bzw. Röhrchen in die untere Hälfte der Weck Gläser. Die eingeleitete Luft entwich durch eine Bohrung im Deckel an der ein zweiter Sterilfilter angebracht war, um das Auftreten von Kontaminationen zu vermeiden (Abb. 7).



Abb. 6 Zwangsbelüftete Weck Gläser mit vorgeschaltetem Luftbefeuhter

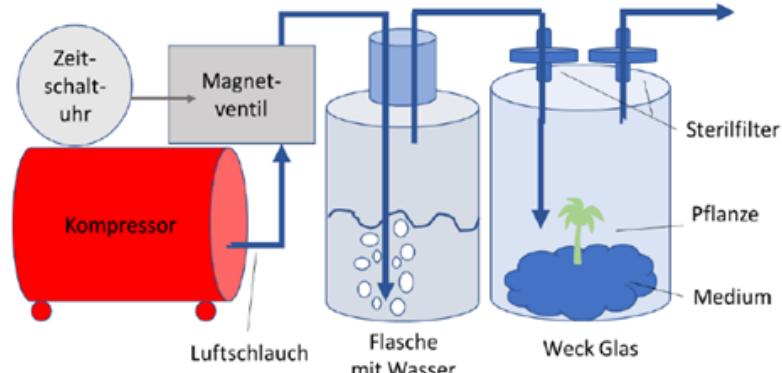


Abb. 7 Versuchsaufbau der zwangsbelüfteten Weck Gläser

Als Pflanzenmaterial fanden Sprossspitzen von Mutterpflanzen des Wildtyps aus dem Gewächshaus Verwendung, welche zuvor mit Methode X oberflächlich sterilisiert wurden.

Als Medien dienten #4, Anzuchterde (Compo Sana GmbH), Vermiculit und Steinwollwürfel. Das Medium #4 enthielt ausschließlich Gelrite und AB-Dünger in halber Konzentration. Das Vermiculit und die Steinwollwürfel wurden in $\frac{1}{2}$ AB Düngerlösung (EC 1,3 mS/cm, pH 5,8) getränkt. Die Steinwollwürfel mit einer Kantenlänge von 100 mm wurden an den Ecken so zugeschnitten, dass sie in die Weckgläser passten.

Es wurden nach 8 und 34 Tagen Fotos angefertigt. Dieser Versuch konnte nicht quantitativ ausgewertet werden, weil durch Abwesenheit in den Sommerferien und Beendigung der empirischen Arbeit, die Datenlage unvollständig ist.

3.8 Erhaltung der sterilen Kulturen

3.8.1 Lagerung von Sämlingen im Kulturraum

Ziel dieses Versuches war die Bereitstellung von steriles Pflanzenmaterial für die weitere *in vitro* Kultur.

Tab. 16 Überblick: Lagerung von Sämlingen im Kulturraum

Pflanzensorte	Futura 75, Santhica 27, Fedora 17, Finola, Felina 32, Arzneigarten
Herkunft Pflanzenmaterial	Sterile Samenkeimung
Beleuchtung	Lichtbedingung 1 [45 – 64 µmol/(m ² s)]
Kulturgefäß	Reagenzglas
Verschluss	Magenta 2-way Cap
Medien	#4
Versuchsdauer	100 Tage
Erhobene Daten	Photodokumentation von 2 Individuen und daraus gewonnene Explantate

Die Sämlinge wurden im Kulturraum bei 25 ± 1 °C und einer Luftfeuchte von 50 %rH aufbewahrt. Zur Beleuchtung der Reagenzgläser welche mit Magenta 2-Way Caps verschlossen waren, wurde eine Mischung aus Sylvania GroLux (Farbtemperatur 8500 K) und Osram BioLux (Farbtemperatur 6500 K) Leuchtstoffröhren eingesetzt (Lichtbedingung 1). Die Beleuchtungsstärke betrug 45 – 64 µmol/(m²s) (Tab. 16). Die Photoperiode betrug 16 Stunden pro Tag. Es wurde exemplarisch die Subkultivierung von zwei Pflanzen der Sorte Fedora und Finola nach 100 Tagen im Kulturraum dokumentiert.

3.8.2 Langzeitkonservierung bei 8 °C

Ziel dieses Versuches war eine Langzeitkonservierung von *in vitro* Pflanzen.

Tab. 17 Überblick: Langzeitkonservierung bei 8 °C

Pflanzensorte	Fedora 17, Futura 75
Herkunft Pflanzenmaterial	<i>In vitro</i> Pflanzen aus Kulturraum
Stichprobengröße Total	54
Beleuchtung	Lichtbedingung Kühlraum: 32 – 40 µmol/(m ² s)
Kulturgefäß	Reagenzglas
Verschluss	Magenta 2-way Cap
Medien	#7, #8, #12a, #12b
Versuchsdauer	200 Tage
Erhobene Daten	Gestorben/lebendig

Es wurden Pflanzen aus dem Kulturraum in den Kühlraum gestellt um deren Stoffwechsel zu verlangsamen, damit diese möglichst lange ohne weitere Subkultivierung aufbewahrt werden können. Im Kühlraum hatte es 8 °C bei einer Photoperiode von 18 Stunden pro Tag und einer

Beleuchtungsstärke von 32 – 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$. Es wurde der Zustand von 54 Individuen nach 200 Tagen dokumentiert. Davon waren 18 von der Sorte Fedora und 36 von der Sorte Futura (Tab. 17).

4 Resultate

4.1 Anbau der Mutterpflanzen

Die Mutterpflanzen gedeihen gut im Gewächshaus. Es gab einen leichten Schädlingsbefall durch Thripse (*Ordo Thysanoptera*) der jedoch leicht durch die Maßnahmen des Gärtners behoben werden konnte. Eine Photoperiode von 18 Stunden pro Tag konnte den Übergang von der vegetativen in die reproduktive Phase bei den Sorten Felina 32 und Wildtyp verhindern, wobei Felina 32 in den unteren beschatteten Pflanzenbereichen teilweise männliche Blüten bildete. Der Wildtyp wurde als Kontrollgruppe im Glashaus angebaut, um zu untersuchen, ob die äußeren Bedingungen oder genetische Prädispositionen im Gewächshaus zur Blütenbildung führten. Da der Wildtyp nicht zur Blüte kam, ist daraus zu schließen, dass die Bedingungen geeignet



Abb. 8 Blüten und Wurzelbildung in der *in vitro* Kultur

wären die Blütenbildung zu verhindern. Dennoch kamen die Sorten Futura 75, Santhica 27, Fedora 17, Finola und Arzneigarten teilweise schon nach wenigen Wochen zur Blüte (Abb. 9). Bei Mutterpflanzen für die klonale Vermehrung ist es jedoch wichtig, dass sie im vegetativen Wachstum bleiben um weiteres vegetatives Pflanzenmaterial zu erhalten. Die Blütenbildung stellte bei allen weiteren Versuchen große Probleme dar.

Obwohl möglichst darauf geachtet wurde vegetatives Material zu verwenden, kamen in der *in vitro* Kultur nach 14 – 16 Tagen 28,2 % (N=78) der Individuen zur Blüte und nach mindestens 49 Tagen kamen 50,0 % (N=72) der Individuen zur Blüte (Abb. 8). In der *in vitro* Kultur bildete Felina 32 auch weibliche Blüten aus.

Dies stellte ein sehr großes Problem bei allen Versuchen dar, weil blühende Hanfpflanzen das vegetative Wachstum komplett einstellen und so weder eine vegetative Vermehrung noch die Beobachtung von Wuchsverhalten auf den verschiedenen Medien mehr möglich war.

4.2 Vegetative Vermehrung über konventionelle Stecklinge

Bei allen Sorten, bis auf den Wildtyp, kam es zu Problemen durch die Blütenbildung. Es wurde zwar darauf geachtet vegetative Sprosse der blühenden Mutterpflanzen für die Stecklinge, sowie für alle anderen Versuche zu verwenden, doch nachdem sich in der ersten Woche Wurzeln gebildet hatten, setzte die Blütenbildung ein und die Stecklinge wurden unbrauchbar. Die Vermehrung des Wildtyps über Stecklinge verlief reibungslos (Abb. 10). Der Wildtyp zeigt das typische Verhalten für eine Kurztagpflanze. Bei einer Photoperiode von 18 Stunden pro Tag blüht er nicht. Dieses typische Verhalten zeigten alle anderen verwendeten Sorten nicht. Sie begannen auch bei einer Photoperiode von 18 Stunden pro Tag zu blühen.



Abb. 9: Blütenbildung der Mutterpflanzen im Gewächshaus unter Kunstlicht; Photoperiode 18h



Abb. 10 Steckling nach 3 Wochen

4.3 Oberflächensterilisation

4.3.1 Samen

Die erfolgreichste Oberflächensterilisationsmethode stellt Methode VII [NaOCl 0,5 % (w/v), Einwirkzeit 10 min, 4 x 10 min waschen] dar, mit 79 % sterilen und gekeimten Samen. Das Ergebnis der sieben Durchgänge wichen im Durchschnitt 7,9 % vom Mittel ab. Methode IX [NaDCC 1 % (w/v), Einwirkzeit 10 min, 3 x 10 min waschen] erwies sich mit 76 % steriler und gekeimter Samen als ähnlich erfolgreich, das Ergebnis ist mit einer durchschnittlichen Abweichung von 17,9 %, zwischen den Durchgängen jedoch nicht so gut reproduzierbar (Tab. 18).

Tab. 18 Erfolgsraten der Oberflächensterilisationsmethoden bei Samen; Mittelwert in Prozent \pm Standardabweichung

Methode	N	Sterilrate	Keimrate	Steril und gekeimt
I	36	89 %	48 %	43 %
II	36	97 %	24 %	23 %
III	36	97 %	48 %	47 %
IV	36	100 %	48 %	48 %
V	36	75 %	70 %	53 %
VIa	36	100 %	64 %	64 %
VIb	36	100 %	60 %	60 %
VIc	36	100 %	34 %	34 %
VID	36	97 %	43 %	42 %
VII	252 (7 x 36)	81 \pm 7,4 %	97 \pm 7,9 %	79 \pm 7,9 %
VIII	108 (3 x 36)	64 \pm 31,3 %	75 \pm 11,23 %	48 \pm 12,9 %
IX	108 (3 x 36)	76 \pm 25,8 %	100 \pm 4,24 %	76 \pm 17,9 %

4.3.2 Frisches Pflanzenmaterial

Die oberflächliche Sterilisation des frischen Pflanzenmaterials mit Methode X [NaOCl 0,5 % (w/v), 20 min Einwirkzeit, 3 x 10 min waschen] war in 86 % der Fälle erfolgreich und im Durchschnitt wichen die Ergebnisse zwischen den elf Durchgängen um 9,8 % ab (Tab. 19).

Tab. 19 Erfolgsrate der Oberflächensterilisation beim Pflanzenmaterial, Mittelwert in Prozent \pm Standardabweichung

Methode	N	Sterilrate
X	396 (11 x 36)	86 \pm 9,8 %

4.4 Micropropagation auf verschiedenen Kulturmedien

Den größten Zuwachs wiesen die Pflanzen auf Medium #10a, mit 19,1 mm Zuwachs pro zehn Tagen auf, gefolgt von #10b mit einem Zuwachs von 15,5 mm. Diese beiden MS-Medien enthielten 2 μ Mol/L m-T und 3 % Saccharose. Medium #10a enthielt MS-Vitamine. Ebenfalls einen Zuwachs von 15,5 mm wies #9 mit 0,5 μ Mol/L TDZ auf, jedoch mit einer geringeren Zuverlässigkeit durch eine Standardabweichung von \pm 10,4 mm. Die Medien #4, #7 und #8 führten durch das Fehlen von Zucker und anderen Energiequellen für die Pflanzen im Medium zu einem photoautotrophen Wuchs. Medium #4 und #7 unterschieden sich durch die Konzentration und #8 durch die Art des Düngers. Die Zuwächse waren nicht bemerkenswert. Wurzelbildung wurde lediglich auf Medium #4, mit einem Zuwachs von 4,9 mm beobachtet. Auf diesem Medium bildeten 39 % der Individuen Wurzeln aus (Tab. 20).

Tab. 20 Zehntägiger Zuwachs auf diversen Medien

Medium	N	Höhenzuwachs (mm/10d)	Zuwachs von Nodien (N/10d)	Zusammensetzung der Medien (Details siehe Tab. 6, S.21)
#10a	79	19,08 ± 8,04	1,43 ± 0,68	MS, 3 % Suc., MS-Vit, A-Kohle, 2 µmol m-T
#10b	78	15,49 ± 7,27	0,02 ± 0,04	MS, 3 % Suc., A-Kohle, 2 µmol m-T
#9	62	14,64 ± 10,43	1,30 ± 0,75	MS, 3 % Suc., MS-Vit, 0,5 µmol TDZ
#11	18	9,92 ± 3,66	1,11 ± 0,64	½ AB, 1 % Suc.
#12b	18	9,64 ± 4,27	0,95 ± 0,34	AB, 1 % Suc., 2 µmol m-T
#12a	18	8,66 ± 3,76	0,92 ± 0,43	AB, 1 % Suc., MS-Vit, 2 µmol m-T
#5	9	5,40 ± 3,66	0,89 ± 0,45	½ AB, 3 % Suc.
#4	122	4,90 ± 2,16	0,82 ± 0,44	½ AB
#8	54	3,45 ± 1,71	0,49 ± 0,25	½ MS, 0,5 µmol TDZ
#7	55	3,30 ± 1,56	0,76 ± 0,57	AB, 0,5 µmol TDZ
#6	36	3,16 ± 1,18	0,54 ± 0,47	½ AB, 3 % Suc., MS-Vit, 0,5 µmol TDZ

4.5 Micropropagation in Kulturgefäßen mit erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese

4.5.1 Vorversuch in Reagenzgläsern

Die Pflanzen unter Bedingungen mit der Möglichkeit zur erhöhten Photosynthese (Photo+), also mit höherer Beleuchtungsstärke und erhöhtem Gasaustausch des Kulturgefässes, zeigten einen höheren Wuchs und eine größere Anzahl an gebildeten Nodien im Vergleich zu der Kontrollgruppe unter normalen Bedingungen (Abb. 11, S. 36). In der vorliegenden Arbeit ist unter der Bezeichnung normale Bedingungen stets die konventionelle Vorgehensweise in der *in vitro* Kultur zu verstehen. Unter den Photo+ Bedingungen wuchsen die Pflanzen der Sorte Santhica 27 im Durchschnitt in den 14 bis 17 Tagen 3,8 cm auf Medium #12a [AB-Medium, 1 % Suc. (w/v), MS-Vitamine, 2 µmol/L m-T] und 4,2 cm auf Medium #12b [AB-Medium, 1 % Suc. (w/v), 2 µmol/L m-T]. Im Vergleich dazu wuchsen die Pflanzen unter normalen Bedingungen 1,5 cm auf Medium #12a und 1,6 cm auf Medium #12b. Auf Medium #12a zeigten die Pflanzen unter normalen Bedingungen einen etwas mehr gestauchten Wuchs mit 1,14 Nodien/cm, als die Pflanzen mit der Möglichkeit zur erhöhten Photosynthese mit 1,11 Nodien/cm. Die Anzahl der gebildeten Nodien war unter den Photo+ Bedingungen im Mittel mit 3,6 Nodien auf Medium #12a und 4,6 Nodien auf #12b größer als unter normalen Bedingungen mit 1,6 Nodien auf #12a und auf #12b (Tab. 21).

Tab. 21 Mittelwert und Standardabweichung von Pflanzen ohne (Normal) und mit (Photo+) erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese auf Medium #12a und #12b nach 14 bis 17 Tagen in Kultur.

	Photo+ #12a (N=9)	Normal #12a (N=18)	Photo+ #12b (N=9)	Normal #12b (N=18)
Totale Höhe (cm)	3,78 ± 1,42	1,47 ± 0,64	4,17 ± 1,33	1,64 ± 0,73
Nodien 1. Ordnung (N)	3,56 ± 0,72	1,56 ± 0,73	4,44 ± 0,84	1,61 ± 0,59
Nodien Total (N)	3,56 ± 0,72	1,56 ± 0,73	4,56 ± 0,81	1,61 ± 0,59
Höhenzuwachs (mm/Tag)	2,70 ± 1,01	0,87 ± 0,38	2,98 ± 0,95	0,96 ± 0,42
Nodienzuwachs	0,25 ± 0,05	0,09 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,09 ± 0,03

(Nodien/Tag)				
Nodien/Pflanzenhöhe	1,11 ± 0,43	1,14 ± 0,44	1,19 ± 0,31	1,07 ± 0,32
(Nodien/cm)				

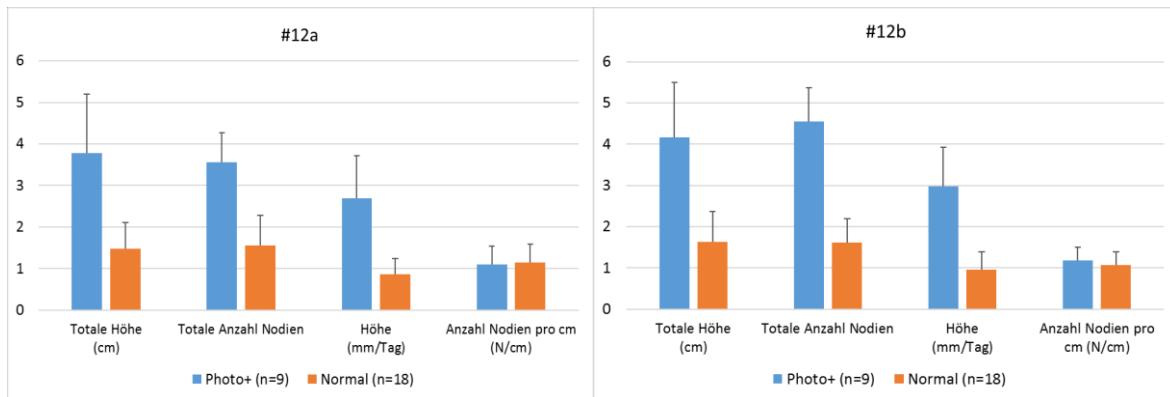


Abb. 11 Mittelwert und Standardabweichung von Pflanzen ohne (Normal) und mit (Photo+) erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese auf Medium #12a (links) und Medium #12b (rechts) nach 14 bis 17 Tagen in Kultur.

4.5.2 Versuch in Hipp Gläsern

Medium #22 [MS-Medium, 1 % Suc. (w/v), MS-Vit, 2 μ mol/L m-T] zeigte unter allen Bedingungen den größten Höhenzuwachs. Dieses Medium enthält im Vergleich zu Medium #21 nur 1 % (w/v) Saccharose anstatt 3 % (w/v). Den zweitgrößten Höhenzuwachs zeigte #21 [MS-Medium, 3 % Suc. (w/v), MS-Vit, 2 μ mol/L m-T] unter normalen Bedingungen gefolgt von #25 [AB-Medium] unter Photo+ Bedingungen. Die Medien #21, #22 und #23 [MS-Medium, 1 % Suc. (w/v), MS-Vit] enthielten Saccharose und zeigten unter normalen Bedingungen einen stärkeren Wuchs, als jene unter den Photo+ Bedingungen mit der Möglichkeit zu einer erhöhten Photosyntheserate, durch stärkere Beleuchtung und erhöhte Kohlendioxidversorgung mittels erhöhtem Luftaustausch der Kulturgefäße. Die Medien #24 [MS-Medium, MS-Vit] und #25 enthielten keine Saccharose und die Bedingungen waren somit ausschließlich photoautotroph. Bei erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese zeigten diese Medien, im Gegensatz zu den anderen, einen erhöhten Zuwachs an Höhe und Nodien. Den geringsten Wuchs mit 3,8 mm in den ersten 21 Tagen und einer Überlebensrate mit nur 5 % in 36 Tagen zeigte #24 unter normalen Bedingungen (Tab. 22).

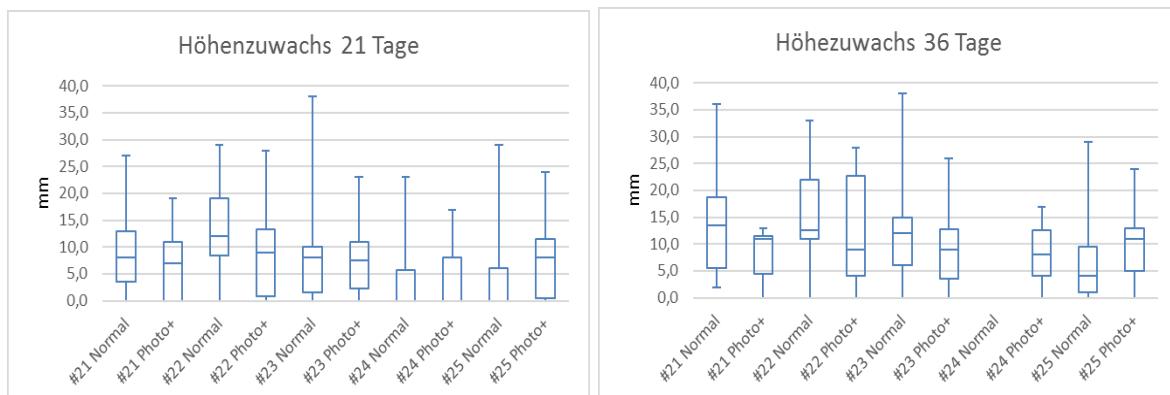


Abb. 12 Boxplotdiagramm (max/min., oberes/unteres Quartil, Median) der Höhenzuwächse in 21 und 36 Tagen, fünf verschiedener Medien ohne (Normal) und mit Möglichkeit zur erhöhten Photosyntheserate (Photo+)

Medium #25 enthielt als Dünger kein MS sondern AB und zeigte unter erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese nach 21 Tagen einen statistisch signifikanten größeren Höhenzuwachs als Medium #24. Zu beachten ist, dass unter den normalen Bedingungen alle Pflanzen auf Medium #24, bis auf eine, starben. So war es nicht möglich einen Median und Quartile zu ermitteln. Überhaupt ist die Sterblichkeit auf dem saccharose- und hormonfreien MS basierten Medium #24 nach 36 Tagen, mit 95 % unter normalen und 85 % unter Photo+ Bedingungen, sehr hoch. In Abb. 12 (S. 36) ist zur Übersicht ein Boxplotdiagramm der Höhenzuwächse nach 21 Tagen und nach 36 Tagen abgebildet. Keine der Pflanzen bildete Wurzeln oder Blüten aus.

Tab. 22 Durchschnittliche Überlebensrate (%), Höhen- und Nodienzuwächse (Mittel \pm Standardabweichung) nach 21 und 36 Tagen von 5 verschiedenen Medien unter normalen (Nor) Bedingungen und erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese (P+). Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, $p<0,05$)

21 Tage				36 Tage			Zusammen-setzung
	Überlebt (n=20)	Höhenzw. (mm)	Nodienzw. (Anzahl)	Überlebt (n=20)	Höhenzw. (mm)	Nodienzw. (Anzahl)	
#21 Nor	95 %	9,8 $\pm 6,1^{ac}$	1,7 $\pm 0,9^a$	70 %	14,9 $\pm 8,4^{ad}$	2,8 $\pm 0,8^{ac}$	MS 3 % Suc. MS-Vit 2 μ mol m-T
	85 %	7,1 $\pm 5,2^{abcd}$	1,4 $\pm 0,7^{ad}$	35 %	8,0 $\pm 4,3^{bd}$	2,0 $\pm 0,9^{ab}$	
#22 P+	100 %	12,6 $\pm 6,6^c$	1,2 $\pm 0,6^a$	100 %	15,9 $\pm 7,4^a$	3,6 $\pm 1,8^c$	MS 1 % Suc. MS-Vit 2 μ mol m-T
	100 %	8,5 $\pm 7,5^{ac}$	1,7 $\pm 0,8^a$	50 %	12,7 $\pm 9,2^{bd}$	3,4 $\pm 1,5^{abc}$	
#23 Nor	95 %	8,7 $\pm 6,2^{abc}$	1,9 $\pm 1,2^a$	85 %	11,9 $\pm 7,3^{acd}$	3,4 $\pm 1,5^{cd}$	MS 1 % Suc. MS-Vit
	100 %	7,0 $\pm 4,5^{abcd}$	1,9 $\pm 1,1^a$	60 %	9,6 $\pm 5,5^{abd}$	2,8 $\pm 0,8^{abc}$	
#24 Nor	60 %	3,8 $\pm 5,0^{bd}$	0,3 $\pm 0,4^{bc}$	5 %	0,0 $\pm 0,0^b$	1,0 $\pm 0,0^b$	MS MS-Vit
	25 %	5,0 $\pm 6,0^b$	1,0 $\pm 0,4^{bde}$	15 %	8,3 $\pm 5,8^b$	3,0 $\pm 1,3^{ab}$	
#25 Nor	95 %	4,2 $\pm 4,9^{abd}$	0,7 $\pm 0,4^{ab}$	75 %	6,7 $\pm 6,0^{bd}$	1,7 $\pm 0,7^{abc}$	AB
	95 %	7,7 $\pm 5,4^{acd}$	0,9 $\pm 0,8^{ace}$	55 %	10,0 $\pm 5,1^{ab}$	2,7 $\pm 1,3^{abc}$	

Zwischen den Medien #24 unter normalen Bedingungen und #21 und #22 unter normalen Bedingungen gibt es statistisch signifikante Unterschiede nach 21 und 36 Tagen, sowohl bei der Bildung von Nodien als auch bei dem Zuwachs der Höhen. Unter Photo+ Bedingungen gibt es zwischen #24 und #22 unter normalen Bedingungen signifikante Unterschiede nach 21 und 36 Tagen bei Höhen- und Nodienzuwachs. Zwischen #24 Photo+ und #21 bestehen jedoch nur in Bezug auf den Höhenzuwachs nach 21 und 36 Tagen signifikante Unterschiede. Nach 21 und 36 Tagen unterschieden sich #25 und #22 unter normalen Bedingungen in Bezug auf den Zuwachs von Höhe

signifikant voneinander. Das Medium #22 zeigt nach 36 Tagen unter normalen Bedingungen einen signifikant größeren Höhenzuwachs verglichen mit der Photo+ Bedingung.

4.6 Etablierung einer aseptischen photoautotrophen Kultur durch Zwangsbelüftung

4.6.1 Vorversuch ohne Zwangsbelüftung

Die Triebspitzen von den Mutterpflanzen aus dem Gewächshaus zeigten nach 40 Tagen in Kultur einen guten Wuchs und Wurzelbildung. Als Explantate dienten Sprossspitzen mit einem Laubblatt. In Abb. 13 sieht man bei dem ganz rechten Individuum eine Braunfärbung der Blätter, es wurden jedoch gesunde Blätter nachgebildet. In Abb. 14 ist in allen Fällen eine gute Wurzelbildung deutlich zu erkennen. Die Ergebnisse sind mit denen der konventionellen klonalen Vermehrung über Stecklinge vergleichbar.



Abb. 13 Triebspitzen vom Gewächshaus nach 40 Tagen auf Anzuchterde mit guter Belüftung



Abb. 14 Wurzelbildung nach 40 Tagen

4.6.2 Versuch in zwangsbelüfteten Weck Gläsern

Die Pflanzen in den zwangsbelüfteten Weck Gläsern zeigten auf allen Medien bis auf Medium #4 einen guten Wuchs und kräftige Wurzelbildung. Medium #4 enthielt lediglich AB-Dünger in halber Konzentration und Gelrite als Geliermittel. Nach acht Tagen waren die Pflanzen auf allen Medien gesund und begannen Wachstum zu zeigen. Auf Erde zeigte sich ein Anlegen der Blätter nach unten hin, was für eine schlechte Versorgung mit Wasser der Pflanze spricht (Abb. 15, S. 39). Nach 34 Tagen zeigt sich auf dem gelierten Medium #4, dass die Pflanzen keinen gesunden Wuchs

aufweisen, mit Chlorosen und fehlender Wurzelbildung (Abb. 17, S. 39). Die Wurzelbildung auf Vermiculit, Steinwolle und Erde war gut (Abb. 16, S. 39).



Abb. 15 Pflanzen in zwangsbelüfteten Weck Gläsern nach acht Tagen, von links nach rechts: Vermiculit, Steinwolle, Erde und Medium #4



Abb. 16 Wurzelbildung in zwangsbelüfteten Weck Gläsern nach 34 Tagen, von links nach rechts: Vermiculit, Steinwolle, Erde und Medium #4



Abb. 17 Pflanzen in zwangsbelüfteten Weck Gläsern nach 34 Tagen, von links nach rechts: Vermiculit, Steinwolle, Erde und Medium #4

4.7 Erhaltung der sterilen Kulturen

4.7.1 Lagerung von Sämlingen im Kulturraum

Der Zustand von Sämlingen wurde nach 100 Tagen im Kulturraum dokumentiert. Diese waren gesund solange die Flüssigkeit im Medium noch nicht verdunstet war. Es konnten laufend vitale Nodien für die weitere Kultur entnommen werden. So konnten zum Beispiel von dem linken Individuum in Abb. 20 zwölf Explantate für die Subkultivierung gewonnen werden. Diese sind in Abb. 19 dargestellt. In Abb. 18 sind erfolgreich subkultivierte Sämlinge zu sehen. Rechts ist ein männlicher Blütenstand zu sehen. Dieses Individuum wurde somit unbrauchbar, weil das vegetative Wachstum komplett eingestellt wurde. Links ist ein vegetativer Sprossaustrrieb zu sehen. Ein solches Individuum konnte in weiterer Folge als Quelle für weiteres vegetatives Pflanzenmaterial verwendet werden.



Abb. 19 Explantate für die Subkultivierung, mit weiblicher Blütenbildung des apikalen Triebes, Fedora (links), Finola (rechts); Skala 5 mm

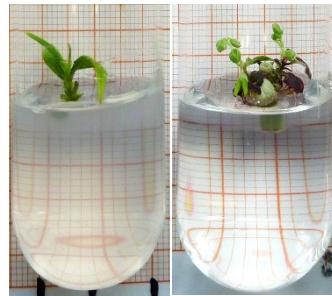


Abb. 18 Subkultivierte Nodien, links: vegetativer Austrieb, rechts: männliche Blütenbildung



Abb. 20 Fedora (links) und Finola (rechts) Sämling nach 100 Tagen auf #4 [½ AB-Medium]

4.7.2 Langzeitkonservierung bei 8 °C

Es wurde der Zustand der Kulturen nach 200 Tagen im Kühlraum dokumentiert. Während dieser Zeit stellten die Pflanzen das Wachstum ein und solange der flüssige Anteil des Mediums noch nicht verdunstet war, waren diese in mehr als der Hälfte der Fälle gesund. Es wurden laufend mit Erfolg Pflanzen aus dem Kühlraum subkultiviert. In Abb. 21 (S. 41) sieht man neun Pflanzen der Sorte Fedora auf Medium #8 [½ MS-Medium, 0,5 µmol/L TDZ]. Sechs dieser neun Pflanzen sind gesund und können ohne Probleme weiter subkultiviert werden. Eine Pflanze ist völlig frei von Chlorophyll und enthält keine lebenden Zellen mehr. Zwei der Pflanzen weisen Chlorosen und einen geringen Chlorophyllgehalt auf. Aus ihnen könnten auch Explantate für die Subkultur gewonnen werden. In Abb. 22 (S. 41) ist die Sorte Futura auf Medium #12b [AB-Medium, 1 % Suc. (w/v), 2 µmol/L m-T] zu sehen. Alle neun Pflanzen sind gesund, zeigen jedoch leichte Chlorosen und Braunfärbungen. Die Trübung des Mediums ist durch die Verwendung von Agar als Geliermittel bedingt.

In Tab. 23 sind Sterbe- und Überlebensraten dargestellt. Insgesamt waren nach den 200 Tagen im Kühlraum noch 76 % der Individuen lebend. Der Prozentsatz hing vom verwendeten Medium ab beziehungsweise von der Sorte und schwankte zwischen 67 und 89 %. Am höchsten war die Überlebensrate auf Medium #8 mit 89 %, dieses Medium enthielt keine Saccharose und somit mussten sich die Pflanzen wie auch auf #7 [AB-Medium, 0,5 µmol/L TDZ] photoautotroph ernähren. Die Medien #12a und #12b enthielten Saccharose. Die zweithöchste Überlebensrate wies Medium #12b auf. Das schlechteste Ergebnis wurde auf Medium #7 und #12a erzielt.

Tab. 23 Überlebens- und Sterberate der Pflanzen im Kühlschrank nach 200 Tagen

	N	Sorte	% Überlebt	Zusammensetzung
#7	9	Fedora	67%	AB-Medium, 0,5 µmol/L TDZ
#8	9	Fedora	89%	½ MS-Medium, 0,5 µmol/L TDZ
#12a	18	Futura	67%	AB-Medium, 1 % Suc., MS-Vit, 2 µmol m-T
#12b	18	Fedora	83%	AB-Medium, 1 % Suc., 2 µmol m-T
Total	54	-	76%	



Abb. 21 Fedora auf Medium #8, 200 Tage im Kühlschrank



Abb. 22 Futura auf Medium #12b, 200 Tage im Kühlschrank

5 Diskussion

5.1 Pflanzenmaterial

Es wurden zertifizierte europäische Nutzhanfsorten verwendet. Dies erleichtert die Kultivierung in rechtlicher Hinsicht erheblich, weil der Anbau von nahezu THC-freien Cannabis Sorten keinen weiteren Auflagen unterliegt, auch wenn diese zur Blütenbildung kommen. Der Anbau von THC-reichen Sorten ist grundsätzlich auch gestattet, es muss jedoch darauf geachtet werden, dass diese Pflanzen nicht zur Blütenbildung kommen, da diese aufgrund ihres THC-Gehaltes vom Suchtmittelgesetz streng reglementiert werden. Laut der Änderung der Suchtmittelverordnung 2017 im österreichischen Bundesgesetzblatt sind nämlich vom Suchtmittelgesetz ausgenommen nur Blüten- und Fruchtstände von Hanfsorten die im gemeinsamen Sortenkatalog der EU oder der österreichischen Sortenliste angeführt sind und deren „Gehalt an Tetrahydrocannabinol 0,3 % vor, während und nach dem Produktionsprozess nicht übersteigt und daraus nicht leicht oder wirtschaftlich rentabel Suchtgifte in einer zum Missbrauch geeigneten Konzentration oder Menge gewonnen werden kann“. Außerdem sind „die nicht mit Blüten- oder Fruchtständen vermengten Samen und Blätter der zur Gattung Cannabis gehörenden Pflanzen“ ausgenommen (BGBl II 2017/292). Die strengen Regelungen bezüglich des THC-Gehaltes erschweren somit die Grundlagenforschung im Bereich der Biotechnologie, Medizin, Pharmazie und Neurobiologie.

Die legale Produktion und der Verkauf von Marihuana, also den getrockneten Blütenständen, und Haschisch, das daraus gewonnene Harz, mit einem THC-Gehalt von unter 0,3 % erlebt zurzeit in Österreich große Aufmerksamkeit. Einige wenige Beispiele für Händler 2018 in Österreich welche diese Produkte verkaufen sind Magu CBD GmbH (magu-cbd.com), CBD-Vital Limited (cbd-vital.at), Hanfstube Gabriel Notz (hanfstube.at), Deep Nature Project GmbH (medihemp.at), Göttergarten GmbH (goettergarten.com), BioBloom GmbH (cannabin.at), HGV Kräutergarten GmbH (hanfgarten.at), Nooon GmbH (nooon-cbd.com), Budzbunny GmbH (budzbunny.at), CBD Theke (cbd-theke.at) und viele weitere. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf dem enthaltenen CBD und anderen Cannabinoiden. Die Produktpalette reicht dabei von verschiedenen Marihuana- und Haschischsorten über Speiseölpräparate mit CBD und anderen Cannabinoiden bis hin zu reinen CBD-Kristallen. Es gibt unzählige Produzenten und Geschäfte die diese Produkte verkaufen. Teilweise wird zwar die „Einnahme nicht empfohlen“ und die „Verwertung untersagt“, das hindert die Käufer jedoch nicht Preise von über 10 €/g Marihuana, welches einen THC-Gehalt von unter 0,3 % aufweist, zu bezahlen. Das entspricht in etwa dem Schwarzmarktpreis für THC-haltiges Marihuana. So erfährt auch die Kultivierung von zertifizierten EU-Nutzhanfsorten, welche eben weniger als 0,3 % THC aufweisen großes Interesse. Bei der Kultivierung von Nutzhanf sind jedoch Unterschiede zu herkömmlichen Cannabis Sorten zu beachten, wie zum Beispiel Einhäusigkeit oder Blütenbildung bei Beleuchtungszeiten von über 16 Stunden pro Tag.

Die verwendeten Nutzhanfsorten unterscheiden sich also stark vom Wildtyp. Die meisten Nutzhanfsorten sind einhäusig und beginnen im Freiland die Blütenbildung teilweise schon vor der Sonnenwende am 21. Juni, spätestens jedoch Ende Juli, abhängig von Aussaattermin und Temperatur. Dies ist kein typisches Verhalten für eine Kurztagpflanze. Der verwendete Wildtyp und die allermeisten Drogenhanfsorten unterscheiden sich stark vom Verhalten der Nutzhanfvarietäten. Sie sind zweihäusig und zeigen ein für Kurztagpflanzen typisches Verhalten. Für eine Blüteninduktion muss die Dunkelphase mindestens 10 bis 12 Stunden andauern, bei einem 24 Stunden Rhythmus bedeutet das vice versa eine Photoperiodendauer von 12 bis 14 Stunden. Zu beachten ist jedoch, dass nicht die Dauer der Photoperiode, sondern die Dauer der Dunkelphase entscheidend ist. Im Freiland bedeutet das, dass die Blüte etwas vor dem Äquinoktium Ende

September eingeleitet wird, also frühestens Ende August. Im Freiland ist das Blühverhalten natürlich auch vom Breitengrad, auf welchem kultiviert wird, abhängig. Sorten die für äquatoriale Anbaugebiete geeignet sind, wo das ganze Jahr über circa 12 Stunden Nacht und Tag ist, müssen natürlich auch unter solchen Bedingungen vegetatives Wachstum aufweisen.

Das spontane Auftreten von Blüten stellt bei der klonalen Vermehrung ein schier unüberwindbares Hindernis dar. Als natürlicherweise sommerannuelle Kurztagpflanze beendet *Cannabis sativa* nach Beginn der Blütenbildung ihr vegetatives Wachstum und weist nur mehr reproduktives Wachstum auf. Danach werden die Samen für das Überdauern des Winters ausgereift und die Pflanze stirbt. Weil die allermeisten *in vitro* Kultur Methoden auf die klonale Vermehrbarkeit und somit auf das vegetative Wachstum der Pflanze angewiesen sind, sind diese Methoden bei Pflanzen, welche kein vegetatives Wachstum aufweisen, zum Scheitern verurteilt. Die meisten Hanfsorten bleiben bei einer künstlichen Beleuchtung von 16 bis 18 Stunden im vegetativen Wachstum und sind somit leicht über Klone zu vermehren.

Für Sorten bei denen eine erhöhte Beleuchtungsdauer die Blütenbildung nicht unterdrückt, sondern nur verzögert, müssen Methoden entwickelt werden um die Blütenbildung zu unterdrücken. Ansonsten ist eine klonale Vermehrung und somit eine *in vitro* Kultur nicht möglich. Mir sind keine Arbeiten bekannt, in welchen dies versucht wird. Gerade in der *in vitro* Kultur würde es sich anbieten Versuchsreihen mit Wuchsstoffen durchzuführen, um eventuell auf diese Art und Weise die Blütenbildung zu unterdrücken.

5.2 Oberflächensterilisation

Bei der oberflächlichen Sterilisation von Samen und frischen Pflanzenteilen ist darauf zu achten, dass einerseits eine ausreichende Sterilisation stattfindet, andererseits aber das zu kultivierende Pflanzenmaterial nicht zu stark darunter leidet. Sowohl eine stärkere Konzentration des Sterilisationsmittels, als auch eine längere Einwirkzeit haben zwar eine stärkere Abtötung der mikrobiellen Belastung zufolge, jedoch schädigt dies die Samen und das frische Pflanzenmaterial stärker. So muss eine Abwägung getroffen werden, ob man das vermehrte Auftreten von Kontaminationen mit einhergehender geringerer Schädigung der Samen und des frischen Pflanzenmaterials in Kauf nimmt. Oder aber man nimmt in Kauf, dass die Samen und das frische Pflanzenmaterial stärkere Schäden davontragen, jedoch mikrobielle Kontaminationen weniger häufig auftreten. So wies zum Beispiel Sterilisationsmethode IX [NaDCC 1 % (w/v), Einwirkzeit 10 min, 3 x 10 min. waschen] 100 % gekeimte Samen auf, davon waren jedoch nur 76 % keimfrei. Im Gegensatz dazu zeigten Samen welche mit Sterilisationsmethode VIc [NaOCl 1 % (w/v), Einwirkzeit 10 min, 3 x 10 min waschen] oberflächlich sterilisiert wurden keinerlei Kontaminationen, doch die Keimrate betrug nur 34 %. Die oberflächliche Sterilisationsmethode X [NaOCl 0,5 % (w/v), Einwirkzeit 20 min, 3 x 10 min waschen] für die frischen Pflanzenteile wurde aus einer Publikation von Lata, Chandra, Techen und anderen aus 2016 übernommen und konnte in der vorliegenden Arbeit unverändert angewendet werden, weil bei einer Sterilrate von 86 % alle Individuen den oberflächlichen Sterilisationsvorgang überlebten. Wohingegen die von Wielgus und anderen 2008 publizierte Methode II [NaOCl 1 % (w/v), Einwirkzeit 20 min, 3 x 10 min waschen] für Samen, welche zwar eine Sterilrate von 97 % aufwies, bei der jedoch nur 23 % der Samen gekeimt und kontaminationsfrei waren, überarbeitet werden musste.

Ein zufriedenstellendes Ergebnis bei geringer Keimrate kann dadurch erzielt werden, dass man die Anzahl oder Dauer der Waschgänge erhöht beziehungsweise die Konzentration des Sterilisationsmittels verringert. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Konzentration des Sterilisationsmittels von 0,5 % NaOCl (w/v) die Keimrate der Samen von 60 % nach anschließendem

drei Mal zehnminütigem Waschgang, auf 97 % nach vier Mal zehnminütigem Waschgang erhöht werden konnte. Grundsätzlich kam es bei den Samen zu größeren Komplikationen als bei den frischen Pflanzenteilen. Bei den frischen Pflanzenteilen kam es bei einer Sterilrate von 86 % zu keinen Verlusten durch Schädigungen durch die oberflächliche Sterilisation, wohingegen bei den Samen bei einer Sterilrate von 89 % nur knapp die Hälfte zur Keimung kamen. Wahrscheinlich sorgt die Samenschale für einen höheren Kontaminationsdruck als die frischen Pflanzenteile. Bei Problemen mit Kontaminationen bei der sterilen Samenkeimung ist es theoretisch zu empfehlen die Samenschale vor der oberflächlichen Sterilisation zu entfernen, was sich in der Praxis jedoch als aufwendiges Unterfangen darstellt. Eine weitere Möglichkeit wäre es die zu kultivierenden Samen zuerst konventionell anzubauen und danach das frische Pflanzenmaterial in *in vitro* Kultur zu nehmen.

5.3 Zusammensetzung der Medien

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wuchsstoffe meta-Topolin (m-T) und Thidiazuron (TDZ) verwendet. Beide zeigten ähnlich gute Ergebnisse, so zeigte zum Beispiel Medium #10a, welches 2 $\mu\text{mol/L}$ m-T enthielt den größten Höhenzuwachs mit 19 mm in 10 Tagen. Medium #9 enthielt 0,5 $\mu\text{mol/L}$ TDZ und zeigte Höhenzuwächse von durchschnittlich 15 mm in 10 Tagen. Lata et al. publizierten 2016, dass mit der Verwendung von m-T als Wuchsstoff Wurzeln *in vitro* gebildet werden und so eine Bewurzelung *in vitro* mit dem Wuchsstoff 4-(Indol-3-yl)buttersäure (IBA) nicht nötig wäre. Zu beachten ist jedoch, dass in der vorliegenden Arbeit auf keinem der Wuchsstoff enthaltenden Medien Wurzeln gebildet wurden und das Wuchsverhalten teilweise mit Vitrifizierungen, Kallusbildungen und Chlorosen, abnormal war. Um solche Kulturen zu akklimatisieren sollte eben schon eine Behandlung mit Wuchsstoffen, welche Wurzelbildung induzieren erfolgen, um größere Komplikationen und Verluste bei der Akklimatisation zu verhindern. Interessanterweise bildeten Pflanzen auf Medium #4, welches nur Dünger und Geliermittel enthielt, in 39 % der Fälle Wurzeln aus und das Wuchsverhalten war augenscheinlich gesund. Es könnte also eventuell bei der *in vitro* Kultur von *C. sativa* generell auf Wuchsstoffe verzichtet werden, vorausgesetzt die anderen Kulturbedingungen entsprechen den Bedürfnissen der Pflanzen.

Das von Murashige und Skoog entwickelte MS-Medium ist mit Abstand das meist verwendete Medium in der *in vitro* Kultur. Die *in vitro* Kultur von *Cannabis sativa* bildet hier keine Ausnahme. Dieses Medium wurde für die Propagation von einer bestimmten Tabaksorte *Nicotiana tabacum* var. Wisconsin 38 entwickelt. Zu beachten ist, dass Tabak und Hanf in ihren Ansprüchen sehr unterschiedlich sind. Tabak ist eine anspruchsvolle stark zehrende Kulturpflanze, wohingegen Hanf eine Pflanze mit geringen Ansprüchen darstellt.

Casano und Grassi (2009) erkannten dieses Problem und entwickelten zusammen mit dem Düngemittelhersteller Canna International B.V. ein *in vitro* Kultur Medium speziell für *Cannabis sativa*, das sogenannte β -Based-Medium. Dieses wies im Vergleich mit dem MS-Medium eine signifikant höhere Micropropagationsrate auf. Sie konnten auch zeigen das *Cannabis sativa* nicht gut auf MS-Vitamine reagiert. In ihrer Studie 2009 empfahlen sie die Verwendung von Gamborgs B5-Vitaminen.

Neuere Untersuchungen durch Codesido-Sampedro, Casano und Meyer von Phytoplant Research S.L., welche auf dem “meeting of the spanish society for *in vitro* tissue culture 2017” (SECIVTV2017) präsentiert wurden zeigen, dass der Einsatz von β -Based-Medien, verglichen mit dem MS-Medium, bessere Vermehrungsraten und Kostenersparnis aufweist. Außerdem ist der Einsatz von

Vitaminzusätzen nicht nötig, und die Zugabe von Saccharose, nur wenn keine photoautotrophe Ernährung der Pflanzen durch die Kulturbedingungen möglich ist.

Diese Beobachtungen decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit. Die Verwendung des Zweikomponenten AB-Düngers von Bio Nova B.V., welcher für den hydroponischen Anbau entwickelt wurde und gute Resultate beim Anbau von Hanf erzielt, bringt Kosteneinsparungen und gute Ergebnisse bei der *in vitro* Kultur. Die Zusammensetzung der Makronährstoffe von MS-Medium und AB-Dünger unterscheiden sich deutlich voneinander (Tab. 3, S. 19). Im MS-Medium ist mehr als vier Mal so viel Stickstoff, fast um die Hälfte mehr Phosphor und acht Mal so viel Kalium als im AB-Dünger. Auch die Mikronährstoffe unterscheiden sich teilweise um ein Vielfaches und die molare Konzentration aller enthaltenen Nährstoffe ist im MS-Medium um mehr als das Dreifache höher.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass unter photoautotrophen Bedingungen auf dem MS-Medium die Überlebensrate um mehr als die Hälfte geringer ist als auf einem AB-Medium (Tab. 22, S. 37).

Es ist bekannt, dass sowohl eine hohe Nährstoffkonzentration und schlechte Versorgung des Mediums mit Sauerstoff im konventionellen Anbau, als auch Saccharose in der *in vitro* Kultur die Wurzelbildung hemmen. So war Medium #4 welches ausschließlich Gelrite und AB-Dünger in halber Konzentration enthielt, das einzige auf welchem Wurzeln gebildet wurden. Zu beachten ist, dass auf Medium #25, welches auch nur Gelrite und AB-Dünger enthielt, diesen jedoch in voller Konzentration, keine Wurzeln gebildet wurden. Das Problem der gelierten Medien dürfte eine unzureichende Durchlüftung und somit eine schlechte Versorgung mit Sauerstoff sein. Die stärkste Bildung von Wurzeln in der vorliegenden Arbeit wurde auf Medien beobachtet, welche aus einer flüssigen, festen und gasförmigen Phase bestehen, wie zum Beispiel Erde, Vermiculit oder Steinwolle, getränkt in Nährlösung. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Kozai und anderen.

5.4 Photoautotrophie: Jede grüne Pflanze kann das

Auf den ersten Blick ist es verwunderlich, dass sich gerade eine so schnell wüchsige, anspruchslose und gegen viele Widrigkeiten resistente Pflanzenspezies wie *Cannabis sativa* bei der *in vitro* Kultur so widerspenstig verhält. Unter konventionellen gärtnerischen Kulturbedingungen stellt *Cannabis sativa* keine besonderen Ansprüche. Die Pflanze wächst auf einer Vielzahl von verschiedenen Bodenbedingungen, kommt mit einer breiten Palette klimatischer Umstände zurecht und wächst zügig mit einhergehender Bildung von Fasern, Samen und sekundären Metaboliten.

Unter den üblichen *in vitro* Kultur Bedingungen wird versucht die Pflanze über Energiequellen im Medium, in den allermeisten Fällen lediglich Saccharose, zu ernähren. Dies macht die Versorgung der Pflanze mit Energie mittels Photosynthese theoretisch überflüssig. Weiters hat dieses Vorgehen zur Folge, dass die Kulturgefäße mehr oder weniger luftdicht verschlossen werden. Einerseits um das Eindringen von Kontaminationen zu verhindern, andererseits weil eine Versorgung der Pflanze mit Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle als unnötig erachtet wird. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Pflanzen einen mixotrophen Stoffwechsel aufweisen, das heißt sie können mittels Photosynthese nur das Kohlendioxid verbrauchen, das durch die Veratmung der aus dem Medium aufgenommenen Saccharose entsteht. Manche Pflanzenarten haben damit kein Problem, andere dürften genau damit ein Problem haben.

Die Saccharose im Medium kann einige negative Folgen haben. Sie ist osmotisch aktiv, was sich negativ auf das osmotische Potential zwischen Pflanze und Medium auswirkt. Das Vorhandensein von Saccharose hemmt das Wurzelwachstum. Außerdem steht Saccharose im Medium unter

Verdacht, die Fähigkeit von Stomata, sich zu schließen, herabzusetzen. Dies führt vor allem zu Problemen bei der Akklimatisierung, weil durch die Unfähigkeit der Stomata sich zu schließen eine erhöhte Gefahr von Trockenheitsstress besteht. Weiters vermindert Saccharose im Medium die Photosyntheserate.

Eine Lösung die negativen Auswirkungen der Saccharose im Medium verhindern zu können ist die photoautotrophe *in vitro* Kultur, bei der im Idealfall keine organischen Stoffe, aber auf keinen Fall Saccharose im Medium enthalten ist. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Explantate genügend Gewebe besitzen das zu Photosynthese fähig ist und diese in der *in vitro* Kultur ausreichend mit Licht und Kohlendioxid versorgt werden (Kozai et al., 2005). Diese Methode bietet sich vor allem bei Pflanzenarten an, welche unter konventionellen gärtnerischen Bedingungen sehr einfach und gut wachsen, nicht jedoch unter den üblichen *in vitro* Kultur Bedingungen. Die Umweltbedingungen der Pflanze unter konventionellen gärtnerischen Bedingungen und der photoautotrophen *in vitro* Kultur unterscheiden sich schließlich lediglich in der Anbeziehungsweise Abwesenheit von nicht definierten Organismen.

In der vorliegenden Arbeit konnte in einem Vorversuch anhand von Kulturgefäßen mit erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese, durch erhöhten Gasaustausch und erhöhte Beleuchtungsintensität, eine bessere Propagationsrate verglichen mit denen unter normalen Bedingungen erzielt werden (Tab. 21, S. 35). Dieses Ergebnis konnte im Versuch mit den Hipp Gläsern nicht so deutlich reproduziert werden. Ganz klar geht jedoch aus dem Versuch in den Hipp Gläsern hervor, dass jene Medien welche keine Saccharose enthielten, also echte photoautotrophe Kulturen, von der Photo+ Bedingung profitieren und jene die Saccharose enthielten, also mixotrophe Kulturen, nicht (Tab. 22, S. 37).

Eine weitere Möglichkeit bietet die Kombination von photoautotrophen *in vitro* Kultur Verfahren zum Erhalten von pathogenfreiem Pflanzenmaterial mit der anschließenden Aufzucht und Kultivierung in „plant factories with artificial lightning“ (PFAL). Diese „Fabriken“ sind geschlossene Systeme, also Kulturräume in die als Input nur elektrischer Strom, Nährstoffe, eine minimale Menge an Wasser und Kohlendioxid in Gasflaschen eingebracht werden. Somit ist eine Versorgung mit Frischluft unnötig und es können keine Pathogene von der Umwelt in die Anlage eindringen. Der Output beschränkt sich auf Wärme, die erwünschten Produkte und eventuell Bioabfall. Der Strom wird für Bewässerungspumpen, Beleuchtung, Klimatisierung und zur Trocknung der Luft eingesetzt. Das Wasser, das die Pflanzen verdunsten, wird durch einen Luftentfeuchter kondensiert und den Pflanzen wieder zu Verfügung gestellt, somit wird die Luftfeucht konstant gehalten und eine PFAL verbraucht nur so viel Wasser wie die geernteten Pflanzen in ihrer Frischmasse speichern. Das von den Pflanzen verbrauchte Kohlendioxid wird durch eine geregelte Gasflasche nachgeliefert. Die von der elektrischen Beleuchtung erzeugte Wärme wird von einer Klimaanlage abgeführt. Die Funktionsweisen und Vorteile von PFALs sind in dem Buch „Plant Factory“ (Kozai, Niu, & Takagaki, 2015) ausführlich beschrieben.

Produkte die auf diese Art und Weise erzeugt werden belasten in ihrer Erzeugung die Umwelt nicht durch Eutrophierung oder den Einsatz von giftigen und umweltschädlichen Stoffen. Außerdem sind sie unabhängig von den Umweltbedingungen überall produzierbar, was Transportwege verkürzt, und sie sind von höchster Qualität. Durch die nahezu vollständige Keimfreiheit sind sie länger haltbar beziehungsweise erfüllen sehr hohe Ansprüche an Hygienestandards. Auch wenn durch den technischen Aufwand die Kosten sehr hoch scheinen ist dieses Verfahren durchaus mit konventionellen Verfahren konkurrenzfähig.

5.5 Erhaltung der sterilen Kulturen

Es stehen dabei grundsätzlich drei *in vitro* Methoden zur Verfügung, nämlich die Kryokonservierung, die laufende *in vitro* Subkultivierung und die Lagerung von *in vitro* Kulturen bei niedrigen Temperaturen nahe dem Lichtkompensationspunkt. Die Kryokonservierung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht angewendet.

Bei der laufenden Subkultivierung können die Kulturen im Wachstum gehalten und eben weiter subkultiviert werden. Diese Methode ist relativ arbeitsintensiv. Die Pflanzen werden unter Bedingungen gehalten, bei denen sie gut Wachsen, was zur Folge hat, dass das Medium und der Raum im Kulturgefäß zügig aufgebraucht werden und eine Subkultivierung regelmäßig nötig ist, um die Gesundheit der Pflanzen zu erhalten. Diese Methode ist vor allem dann zu empfehlen, wenn nur eine kurzfristige Konservierung, oder aber nicht nur eine Erhaltung der Kultur, sondern auch eine gleichzeitige Vermehrung der Kultur angestrebt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde exemplarisch die Subkultivierung von Sämlingen nach 100 Tagen dokumentiert. Pro Sämling konnten dabei mehr als 10 Explantate für weitere Subkultur gewonnen werden. Bei einer Lagerfähigkeit von 100 Tagen hält sich auch der Arbeitsaufwand in Grenzen, da in einem Jahr lediglich bis zu vier Subkulturen angelegt werden müssen.

Eine weitere Methode ist die Lagerung und Konservierung bei niedrigen Temperaturen und geringer Beleuchtungsintensität. In der vorliegenden Arbeit wurden die Pflanzen bei 8 °C und circa 35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ Beleuchtungsstärke für 200 Tage gelagert. Es ist dabei rund ein Viertel der Pflanzen verstorben. Der Vergleich von den zuckerfreien Medien #7 und #8, mit einer Durchschnittlichen Überlebensrate von 78 % und den zuckerhaltigen Medien #12a und #12b, mit einer Überlebensrate von 75 %, zeigt keinen wesentlichen Unterschied. Die Bedingungen, unter denen die Pflanzen gelagert wurden, lassen sich durchaus weiters verbessern. Es wird von Toyoki Kozai neben der zuckerfreien photoautotrophen Lagerung der zu konservierenden Kulturen, auch eine Lagerung nahe dem Lichtkompensationspunkt empfohlen. Der Lichtkompensationspunkt ist erreicht, wenn die durch Photosynthese beziehungsweise den Calvinzyklus aufgenommene Menge und die durch Atmung abgegebene Menge an Kohlendioxid identisch sind. Dieser ist von der Temperatur und der Lichtintensität im photosynthetisch aktiven Bereich abhängig. Bei *Brassica oleracea* wurde zum Beispiel gezeigt, dass der Lichtkompensationspunkt bei einer Temperatur von 5 °C und einer Beleuchtungsstärke im photosynthetisch aktiven Bereich von 2 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ liegt (Kozai et al., 2005). So lagen in der vorliegenden Arbeit die Bedingungen sicherlich weit über dem Lichtkompensationspunkt. Für die fachgerechte mittelfristige beziehungsweise langfristige Lagerung von *Cannabis sativa* Kulturen sollte also in einem ersten Schritt der Lichtkompensationspunkt ermittelt werden um das Verfahren zu optimieren.

5.6 Conclusio

Falls bei der *in vitro* Micropagation von bestimmten Pflanzenarten Komplikationen auftreten bietet die photoautotrophe *in vitro* Kultur, etabliert von Toyoki Kozai, bei der kein Zucker, keine Vitamine und im Normalfall keine Wuchsstoffe im Kulturmedium enthalten sind, gute Möglichkeiten für eine Verbesserung der Kulturführung. So können bessere Ergebnisse bei gleichzeitiger Einsparung von Kosten erzielt werden. Dies gilt vor allem für Pflanzen, welche unter konventionellen gärtnerischen Bedingungen schnellwüchsig sind, wie eben *C. sativa*. Bei der photoautotrophen Kultur ist jedoch zu beachten, dass die Pflanzen ausreichend mit Licht und Kohlendioxid für die Photosynthese versorgt werden. Von Casano und Anderen wird außerdem empfohlen, dass für jede Pflanzenart eine geeignete Nährstoffzusammensetzung im Medium entwickelt werden sollte und eben nicht nur das häufig verwendete MS-Medium mit seinen

Vitaminzusätzen eingesetzt werden sollte. Außerdem zeigte die Verwendung von porösen Materialien, wie Pflanzenerde, Steinwolle oder Vermiculit, im Vergleich mit Medien welche mit Agar oder Gelrite geliert wurden, große Vorteile in Bezug auf die Wurzelbildung und somit auch auf die Nährstoffaufnahme.

Die oberflächliche Sterilisation von Pflanzenmaterial zur *in vitro* Inkulturnahme stellte keine größeren Probleme dar. Grundsätzlich gestaltete sich das Sterilisieren von Samen schwieriger als von frischem Pflanzenmaterial, wahrscheinlich aufgrund der Samenschale. Ein Entfernen der Samenschale gestaltet sich jedoch als aufwendiges Unterfangen. Bei zu hoher Konzentration des Sterilisationsmittels leidet die Keimfähigkeit und bei zu geringer Konzentration werden Keime nur unzureichend abgetötet. Eine Behandlung von 10 Minuten mit einer 0,5 % Natriumhypochlorid-Lösung erwies sich als geeignet. Nach der Behandlung muss das Saatgut ausreichend gewaschen werden, mindestens viermal für 10 Minuten, um Reste des Sterilisationsmittels zu entfernen. Bei schlechtem Saatgut oder Problemen bei der Sterilisation empfiehlt sich der konventionelle Anbau der Samen mit anschließender oberflächlicher Sterilisation des frischen Pflanzenmaterials mit 0,5 % Natriumhypochlorid-Lösung bei einer Behandlungsdauer von 20 Minuten.

Ein in der Literatur unzureichend diskutiertes Problem bei klonalen Vermehrungsformen stellt die Unterdrückung der Blütenbildung dar. Dies gilt für Pflanzen die in der Blühphase ihr vegetatives Wachstum komplett einstellen, wie eben *C. sativa*. Bei den meisten *C. sativa* Varietäten, wie auch beim Wildtyp, kann die Blütenbildung zuverlässig durch die Dauer der Photoperiode unterdrückt werden und somit können diese auch unbegrenzt klonal vermehrt werden. Anders ist das bei Zuchtformen bei denen eine Photoperiode von 18 Stunden pro Tag nur eine Verzögerung, jedoch keine zuverlässige Verhinderung der Blütenbildung auslöst. Um solche Varietäten zeitlich unbegrenzt klonal zu vermehren, müssen Verfahren entwickelt werden um die Blütenbildung zuverlässig zu unterdrücken. Gerade in der *in vitro* Kultur würde sich die Verwendung von Wuchsstoffen dafür eventuell eignen.

Es sollten also in Zukunft Versuche auf porösen Medien wie Vermiculit, Steinwolle, Pflanzenerde oder ähnliches durchgeführt werden. Weiters empfiehlt sich eine photoautotrophe Kulturführung. Dies wird erreicht indem dem Kulturmedium kein Zucker und keine Vitamine zugesetzt werden, dadurch muss die Pflanze jedoch mit ausreichend Kohlendioxid und Licht für die Photosynthese versorgt werden. Die Zusammensetzung des MS-Mediums entspricht nicht den Anforderungen von *C. sativa*, deshalb sollte zur problemlosen *in vitro* Vermehrung von *C. sativa* ein Medium entwickelt werden, dass den physiologischen Ansprüchen von *C. sativa* besser entspricht.

6 Zusammenfassung (english Abstract p. 1)

Cannabis sativa L. (Cannabaceae) dient der Menschheit seit hunderten von Jahren als Quelle von Nahrung, Fasern und Medizin und stellt geringe Anforderungen an Boden und Klima. Die geringen Anforderungen an die Kulturbedingungen, die wirtschaftliche Bedeutung und die intensive Beforschung von *C. sativa* machen diese Pflanze zu einem geeigneten Modellorganismus. Die *in vitro* Micropropagation mit ihren vielen Verfahren eignet sich für Grundlagenforschung, Züchtung, Erhaltung und Vermehrung von genetischen Ressourcen. Darüber hinaus könnten auch informationsverarbeitende Prozesse innerhalb der Pflanze untersucht werden.

Die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit sind Vorteile und Möglichkeiten einerseits der *in vitro* Micropropagation, als keimfreie Kulturmethode unter kontrollierten Bedingungen, aufzuzeigen. Andererseits werden Vorteile und Möglichkeiten der Pflanze *Cannabis sativa* als Nutzpflanze und Modellorganismus beschrieben. Weiters werden verschiedene Verfahren der *in vitro* Micropropagation in Bezug auf *C. sativa* angewendet und weiterentwickelt, um sowohl der Forschung als auch der Industrie befriedigende Lösungen zu bieten.

Obwohl *C. sativa* unter konventionellen gärtnerischen Bedingungen sehr einfach zu kultivieren ist, gestaltet sich die *in vitro* Micropropagation als schwierig, weil die Vermehrungsraten niedrig sind. Meistens wird in der Literatur das von Murashige & Skoog 1962 entwickelte MS-Medium als Kulturmöglichkeit verwendet, ohne Alternativen zu testen. Zur Verbesserung der Kulturbedingungen liegt das Hauptaugenmerk meist auf Konzentration und Art der Wuchsstoffe. Es wurden jedoch auch mit Erfolg Untersuchungen von Casano und Grassi durchgeführt, bei denen Medien verwendet wurden, welche den Bedürfnissen von *C. sativa* weit besser entsprechen. Eine weitere Möglichkeit die Micropropagation von *C. sativa* zu verbessern stellt die von Kozai beschriebene photoautotrophe *in vitro* Kultur dar. Sie unterscheidet sich von den üblichen Verfahren durch die Abwesenheit von organischen Stoffen, wie Sucrose und Vitaminen im Medium und der Verfügbarkeit von ausreichend Kohlendioxid und Licht für die Photosynthese.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal EU-zertifizierte Industriehanfsorten *in vitro* kultiviert. Diese Sorten eignen sich zur Erzeugung von Nahrung, Fasern und Cannabinoiden wie zum Beispiel Cannabidiol, unterliegen jedoch aufgrund ihres extrem niedrigen Tetrahydrocannabinol-Gehaltes keinen strengen gesetzlichen Regelungen.

Im Vergleich von zehn verschiedenen Medien unter konventionellen Micropropagation Bedingungen wies das MS-Medium mit 3 % (w/v) Sucrose (Suc.), MS-Vitaminen, 0,5 g/L Aktivkohle und 2 µmol/L meta-Topolin (m-T), publiziert von Lata et al. 2016, die größten Zuwächse an Höhe (19 mm/10 Tage) und Anzahl an Nodien (1,4/10 Tage) auf. Ein ähnlich gutes Ergebnis wies das von Lata et al. 2009 veröffentlichte MS-Medium auf, welches sich vom vorherigen nur durch den verwendeten Wuchsstoff und das Fehlen von Aktivkohle unterschied. Dieses enthielt 0,5 µmol/L Thidiazuron und zeigte ebenfalls gute Zuwächse an Höhe (15 mm/10 Tage) und der Anzahl von Nodien (1,3/10 Tage). Die Qualität der Pflanzen auf diesen Medien war nicht gut, weil diese einen abnormalen Habitus aufwiesen. Es wurden auch keine Wurzel gebildet und so muss vor der Akklimatisierung Wurzelbildung initiiert werden.

Medien ohne MS-Salze und MS-Vitamine zeigten, dass MS-Nährsalze, bei der Verwendung von Alternativen, und Vitaminzusätze nicht zwingend notwendig für die *in vitro* Micropropagation sind. Das Medium mit handelsüblichem Pflanzendünger für die Hydrokultur (AB-Medium) mit 1 % (w/v) Suc. und 2 µmol/L m-T zeigte einen etwas größeren Höhenzuwachs (10 mm/10 Tagen) als das gleiche Medium mit zusätzlichen MS-Vitaminen (9 mm / 10 Tagen). Das AB-Medium, auf dem als einziges Wurzeln gebildet wurden, enthielt lediglich Dünger in halber Konzentration und musste

somit zu einer photoautotrophen Kultur führen. Die Zuwächse an Höhe (5 mm/10 Tage) sind zwar nicht hervorragend, jedoch bildeten 39 % der Individuen Wurzeln aus und zeigten einen gesunden Wuchs, was für die Qualität dieser Kulturen spricht.

Weiters wurden Kulturmedien in Kulturgefäßen ohne (Normal) und mit erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese (Photo+) durch erhöhte Beleuchtung (Normal: $\sim 59 \text{ } \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, photo+: $\sim 161 \text{ } \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) und Gasaustausch mit der Umgebung, mittels permeabler Verschlüsse, verglichen. Im Vorversuch mit AB-Medien zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der Photo+ Bedingungen. Im Hauptversuch wurden größere Kulturgefäße verwendet. Es wurden dabei vier verschiedene MS-Medien mit und ohne Sucrose, m-T und MS-Vit und ein AB-Medium ohne Sucrose, m-T und MS-Vit verwendet. Dabei zeigte die Photo+ Bedingung nur bei Abwesenheit von Sucrose im Medium (photoautotroph) einen größeren Zuwachs an Höhe und Anzahl der Nodien. In Anwesenheit von Sucrose (mixotroph) zeigte die normale Bedingung größere Zuwächse. Die Sterblichkeit der mixotrophen Kulturen lag zwischen 0 und 65 %. Die Sterblichkeit der photoautotrophen Kulturen war auf dem MS-Medium (85 % tot) deutlich höher als auf dem AB-Medium (45 % tot). Das deutet darauf hin, dass MS-Medien für die photoautotrophe *in vitro* Micropropagation von *C. sativa* nicht geeignet sind.

In einem anderen Experiment zeigten oberflächlich sterilisierte Sprossspitzen auf porösen Medien in aseptischen Kulturgefäßen mit ausreichend Licht ($85 \text{ } \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) und Luftaustausch durch Zwangsbelüftung, gutes Wachstum und Wurzelbildung. Im Vergleich zu gelierten Medien bietet der Einsatz poröser Sucrose-freier Medien große Vorteile bei der Wurzelbildung. In diesem Experiment zeigten die Pflanzen auf Vermiculit, Steinwolle und Blumenerde, alle in AB-Nährlösung getränkt, gutes Wachstum und Wurzelbildung. Im Gegensatz dazu wurde auf dem gelierten Medium kein gutes Wachstum und keine Wurzelbildung beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass gelierte Medien die Wurzelbildung und ein gesundes Wachstum von *C. sativa* hemmen.

Zur oberflächlichen Sterilisation von Samen erwies sich die Methode mit 0,5 % (w/v) Natriumhypochlorid (NaOCl), zehn Minuten Einwirkzeit und viermal 10-minütigem Waschen, wobei 79 % der Samen steril und gekeimt waren, als geeignete Methode. Für die oberflächliche Sterilisation von frischen Pflanzenteilen zeigte sich die Methode mit 0,5 % (w/v) NaOCl, 20 Minuten Einwirkzeit und dreimal 10-minütigem Waschen, wobei 86 % der Explantate steril waren, als geeignet.

Die Blütenbildung war ein Problem, weil es bei der klonalen Vermehrung, also auch bei der *in vitro* Micropropagation, unabdinglich ist, dass sich die *C. sativa* Pflanzen im vegetativen Stadium befinden und nicht in das reproduktive Stadium übergehen. Bei dem *C. sativa* Wildtyp konnte eine Photoperiode von 18 Stunden pro Tag, wie es bei einer Kurztagpflanze zu erwarten ist, die Blütenbildung verhindern. Bei den EU-zertifizierten Nutzhanfsorten Futura 75, Santhica 27, Fedora 17, Finola und der Sorte aus dem Arzneigarten gelang die Unterdrückung der Blüte gar nicht und bei der F2-Generation von Felina 32 nur bedingt. Um diese Sorten klonal vermehren zu können, bei denen die Photoperiode das Blühen nur verzögert und nicht verhindert, müssen zuerst Verfahren entwickelt werden, um die Blütenbildung zuverlässig verhindern zu können. Dies könnte zum Beispiel durch den Einsatz von Wuchsstoffen erreicht werden.

Zur Erhaltung der sterilen Kulturen wurden Sämlinge ständig weiter subkultiviert. Eine Lagerung von keimfreien Sämlingen [$25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\sim 55 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$, 16h/d] über 100 Tage stellte keine Probleme dar und es konnten mehrere Nodien für die Subkultur erhalten werden. Für die längerfristige Konservierung von keimfreien Kulturen wurden diese bei $8 \text{ } ^\circ\text{C}$ [$\sim 35 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$, 18h/d] für 200 Tage gelagert, wobei 76 % der Individuen überlebten. Durch die Ermittlung und anschließende Lagerung der Kulturen nahe dem Lichtkompensationspunkt ließe sich dieses Verfahren weiter optimieren.

Zusammenfassend waren photoautotrophe Kulturbedingungen für die *in vitro* Micropropagation von *C. sativa* am besten geeignet und sollten weiter untersucht werden. Dabei müssen die Pflanzen mit ausreichend Kohlendioxid und Licht für die Photosynthese versorgt werden. Auf porösen Sucrose-freien Kulturmedien wurden in allen Fällen Wurzeln gebildet, was zu einer guten Nährstoffaufnahme und einem gesunden Wuchs führte. Die Zusammensetzung von MS-Medien ist nicht an die Anforderungen von *C. sativa* angepasst, wohingegen Medien mit handelsüblichem Dünger für die Hydrokultur ohne MS-Vitaminen, zu einem guten Wachstum und zu guter Pflanzenqualität führten. Für die klonale Vermehrung von *C. sativa* muss die Blütenbildung unterdrückt werden. Für die Erhaltung von Pathogen-freien Kulturen können diese laufend subkultiviert oder bei niedrigen Temperaturen und wenig Licht gelagert werden.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmadi, A., Azadfar, D., & Jafari Mofidabadi, A. (2012). Study of inter-generic hybridization possibility between *Salix aegyptica* and *Populus caspica* to achieve new hybrids. *International Journal of Plant Production*, 4(2), 143–148. <https://doi.org/10.22069/ijpp.2012.690>
- Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2008). Hormonal Modulation of Citrus Responses to Flooding. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(3), 241. <https://doi.org/10.1007/s00344-008-9051-x>
- Armus, H. L., Montgomery, A. R., & Jellison, J. L. (2006). DISCRIMINATION LEARNING IN PARAMECIA (*P. caudatum*). *The Psychological Record; Heidelberg*, 56(4), 489–498.
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- Bairu, M. W., & Kane, M. E. (2011). Physiological and developmental problems encountered by in vitro cultured plants. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 101–103. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9565-2>
- Ball, P. (2008). Cellular memory hints at the origins of intelligence. *Nature News*, 451(7177), 385–385. <https://doi.org/10.1038/451385a>
- Basu, S. K., Datta, M., Sharma, M., & Kumar, A. (2011). Haploid production technology in wheat and some selected higher plants. *Australian Journal of Crop Science*, 5(9), 1087.
- Berghuis, P., Rajnicek, A. M., Morozov, Y. M., Ross, R. A., Mulder, J., Urbán, G. M., ... Canty, A. (2007). Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science*, 316(5828), 1212–1216.

Bouman, H., Morris, B., & Tiekstra, A. (2001). DEVELOPMENT OF NEW TISSUE CULTURE MEDIA, USING THE RELATION BETWEEN MINERAL COMPOSITION OF PLANT AND MEDIUM. *Acta Horticultae*, (560), 373–376. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.560.70>

Brown, D. C. W., & Thorpe, T. A. (1995). Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 409–415. <https://doi.org/10.1007/BF00364616>

Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(7), 1377–1385. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.059>

Casano, S., & Grassi, G. (2009). Evaluation of media for hemp (*Cannabis sativa L.*) in vitro propagation. *Italus Hortus*, 16(2), 109–112.

Chandra, S., Lata, H., & ElSohly, M. A. (2017). *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*. Springer.

Chaohua, C., Gonggu, Z., Lining, Z., Chunsheng, G., Qing, T., Jianhua, C., ... Jianguang, S. (2016). A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa L.*). *Industrial Crops and Products*, 83(Supplement C), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.035>

Chen, T., He, J., Zhang, J., Zhang, H., Qian, P., Hao, J., & Li, L. (2010). Analytical Characterization of Hempseed (Seed of *Cannabis sativa L.*) Oil from Eight Regions in China. *Journal of Dietary Supplements*, 7(2), 117–129. <https://doi.org/10.3109/19390211003781669>

Cheong, Y. H., Hur-Song, C., Gupta, R., Wang, X., & al, et. (2002). Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology; Rockville*, 129(2), 661–77.

Cosentino, S. L., Testa, G., Scordia, D., & Copani, V. (2012). Sowing time and prediction of flowering of different hemp (*Cannabis sativa L.*) genotypes in southern Europe. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 20–33.

Darwin, C. (1865). On the Movements and Habits of Climbing Plants. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 9(33–34), 1–118. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1865.tb00011.x>

- Dussutour, A., Latty, T., Beekman, M., & Simpson, S. J. (2010). Amoeboid organism solves complex nutritional challenges. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4607–4611. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912198107>
- Eigen, M., & Maeyer, L. de. (1966). Chemical means of information storage and readout in biological systems. *Naturwissenschaften*, 53(3), 50–57. <https://doi.org/10.1007/BF00594747>
- Evans, D. A. (1983). Agricultural Applications of Plant Protoplast Fusion. *Nature Biotechnology*, 1(3), nbt0583-253–253. <https://doi.org/10.1038/nbt0583-253>
- Farag, S., & Kayser, O. (2015). Cannabinoids production by hairy root cultures of Cannabis sativa L. *American Journal of Plant Sciences*, 6(11), 1874.
- Farag, S., & Kayser, O. (2017). Chapter 1 - The Cannabis Plant: Botanical Aspects. In V. R. Preedy (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (pp. 3–12). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00001-6>
- Flores-Sánchez, I. J., Peč, J., Fei, J., Choi, Y. H., Dušek, J., & Verpoorte, R. (2009). Elicitation studies in cell suspension cultures of Cannabis sativa L. *Journal of Biotechnology*, 143(2), 157–168.
- Flores-Sánchez, I. J., & Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 615–639.
- Gagliano, M., Renton, M., Depczynski, M., & Mancuso, S. (2014). Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. *Oecologia*, 175(1), 63–72. <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2873-7>
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37(3), 5–30. <https://doi.org/10.7764/rcia.v37i3.145>

Gutiérrez, A., & Jose, C. (2005). Chemical characterization of pitch deposits produced in the manufacturing of high-quality paper pulps from hemp fibers. *Bioresource Technology*, 96(13), 1445–1450.

Harding, K. (2007). Plant and algal cryopreservation: issues in genetic integrity, concepts in cryobionomics and current applications in cryobiology. In *Proceedings Asia Pacific Conference on Plant Tissue and Agribiotechnology (APaCPA)* (Vol. 17, p. 21).

Hartsel, S. C., Loh, W. H.-T., & Robertson, L. W. (1983). Biotransformation of Cannabidiol to Cannabielsoin by Suspension Cultures of Cannabis sativa and Saccharum officinarum. *Planta Medica*, 48(05), 17–19. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969870>

Hemminger, H., & Kirkilionis, E. (2004). *Lexikon der Biologie. 14: Trade off bis Zythos* (1. Aufl). Heidelberg: Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag.

Henry, M., Fulcheri, C., & Morard, P. (1999). Development of New Plant Tissue Culture Media. In *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century* (pp. 647–650). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4661-6_146

Heß, D. (1992). *Biotechnologie der Pflanzen: eine Einführung ; 18 Tabellen*. Ulmer.

Hillig, K. W. (2005). Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(2), 161–180. <https://doi.org/10.1007/s10722-003-4452-y>

Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In A. Leva (Ed.), *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50568>

Idowu, P. E., Ibitoye, D. O., & Ademoyegun, O. T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*, 8(16). Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/62060>

Jewell, M. C., Campbell, B. C., & Godwin, I. D. (2010). Transgenic Plants for Abiotic Stress Resistance. In *Transgenic Crop Plants* (pp. 67–132). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04812-8_2

- Karban, R. (2015). *Plant Sensing and Communication*. University of Chicago Press.
- Karlov, G. I., Razumova, O. V., Alexandrov, O. S., Divashuk, M. G., & Kroupin, P. Y. (2017). Classical and Molecular Cytogenetics of Cannabis Sativa L. In *Cannabis sativa L.-Botany and Biotechnology* (pp. 385–394). Springer.
- Khan, B. A., Warner, P., & Wang, H. (2014). Antibacterial properties of hemp and other natural fibre plants: a review. *BioResources*, 9(2), 3642–3659.
- Kozai, T., Afreen, F., & Zobayed, S. M. A. (2005). *Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System*. Springer Science & Business Media.
- Kozai, T., Niu, G., & Takagaki, M. (2015). *Plant factory: an indoor vertical farming system for efficient quality food production*. Academic Press.
- Kubota, C. (2001). Concepts and background of photoautotrophic micropropagation. *Progress in Biotechnology*, 18, 325–334.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2009a). Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of Cannabis sativa L.—an important medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(1), 79–86.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I., & ElSohly, M. A. (2009b). Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of Cannabis sativa L. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45(1), 12–19. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9167-5>
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2010). High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high Δ9-tetrahydrocannabinol yielding Cannabis sativa L. *Planta Medica*, 76(14), 1629–1633.
- Lata, H., Chandra, S., Mehmedic, Z., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2012). In vitro germplasm conservation of high Δ9-tetrahydrocannabinol yielding elite clones of Cannabis sativa L. under slow growth conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(2), 743–750. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0874-x>

Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2016). In Vitro Propagation of Cannabis sativa L. and Evaluation of Regenerated Plants for Genetic Fidelity and Cannabinoids Content for Quality Assurance. In *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second Edition* (pp. 275–288). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7_19

Lata, H., Chandra, S., Techén, N., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2016). In vitro mass propagation of Cannabis sativa L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.12.001>

Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2017). Micropropagation of Cannabis sativa L.—An Update. In *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (pp. 285–297). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_13

Levitis, D. A., Lidicker, W. Z., & Freund, G. (2009). Behavioural biologists do not agree on what constitutes behaviour. *Animal Behaviour*, 78(1), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.03.018>

Li, X., Krasnyanski, S. F., & Korban, S. S. (2002). Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa. *Journal of Plant Physiology*, 159(3), 313–319. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00688>

Lisson, S. N., Mendham, N. J., & Carberry, P. S. (2000). Development of a hemp (Cannabis sativa L.) simulation model 2. The flowering response of two hemp cultivars to photoperiod. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 40(3), 413–417. <https://doi.org/10.1071/ea99059>

Loh, W.-T., Hartsel, S. C., & Robertson, L. W. (1983). Tissue culture of Cannabis sativa L. and in vitro biotransformation of phenolics. *Zeitschrift Fuer Pflanzenphysiologie*, 111(5), 395–400.

Marzo, V. D., & Piscitelli, F. (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*, 12(4), 692–698. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0374-6>

McPartland, J. M. (2017). Cannabis sativa and Cannabis indica versus “Sativa” and “Indica”. In *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (pp. 101–121). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_4

Movahedi, M., Ghasemi-Omran, V., & Torabi, S. (2015). The effect of different concentrations of TDZ and BA on in vitro regeneration of Iranian cannabis (Cannabis sativa) using cotyledon and epicotyl explants. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 3(2), 20–27. <https://doi.org/10.22058/jpmb.2015.15371>

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nakagaki, T., Kobayashi, R., Nishiura, Y., & Ueda, T. (2004). Obtaining multiple separate food sources: behavioural intelligence in the *Physarum* plasmodium. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(1554), 2305–2310. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2856>

Nguyen, Q. T., Xiao, Y., & Kozai, T. (2016). Photoautotrophic Micropropagation. In *Plant Factory* (pp. 271–283). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.00020-2>

Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L.-S. P. (2013). Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 445–458. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers354>

Park, H.-Y., Seok, H.-Y., Park, B.-K., Kim, S.-H., Goh, C.-H., Lee, B., ... Moon, Y.-H. (2008). Overexpression of Arabidopsis ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.128>

Pérez-Clemente, R., & Gomez-Cadenas, A. (2012). In vitro Tissue Culture, a Tool for the Study and Breeding of Plants Subjected to Abiotic Stress Conditions. In A. Leva (Ed.), *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50671>

Petrović, M., Debeljak, Ž., Kezić, N., & Džidara, P. (2015). Relationship between cannabinoids content and composition of fatty acids in hempseed oils. *Food Chemistry*, 170(Supplement C), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.039>

Preedy, V. R. (2016). *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment*. Academic Press.

Raman, V., Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2017). Morpho-Anatomy of Marijuana (*Cannabis sativa L.*). In *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (pp. 123–136). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_5

Russo, E. B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>

Saigusa, T., Tero, A., Nakagaki, T., & Kuramoto, Y. (2008). Amoebae Anticipate Periodic Events. *Physical Review Letters*, 100(1), 018101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.018101>

Schubert, S. (2011). *Pflanzenernährung*. UTB.

Schlüter, R. E., Klein, W. M., Plowman, T., & Lockwood, T. E. (1974). CANNABIS: AN EXAMPLE OF TAXONOMIC NEGLECT. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 23(9), 337–367.

Siahsar, B., Rahimi, M., Tavassoli, A., & Raissi, A. (2011). Application of biotechnology in production of medicinal plants. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 11(3), 439–444.

Silvertown, J., & Gordon, and D. M. (1989). A Framework for Plant Behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20(1), 349–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.002025>

Slusarkiewicz-Jarzina, A., Ponitka, A., & Kaczmarek, Z. (2005). Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biol Craco Series Bot*, 47(2), 145–151.

Small, E. (2017). Classification of *Cannabis sativa* L. in Relation to Agricultural, Biotechnological, Medical and Recreational Utilization. In *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (pp. 1–62). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_1

Small, E., & Cronquist, A. (1976). A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis. *Taxon*, 25(4), 405–435. <https://doi.org/10.2307/1220524>

Strable, J., & Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb.emo132. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo132>

Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology; Totowa*, 37(2), 169–80. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>

Trewavas, A. (1999). How plants learn. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4216–4218.

Trewavas, A. (2014). *Plant Behaviour and Intelligence*. OUP Oxford.

Trewavas, A. (2016). Intelligence, Cognition, and Language of Green Plants. *Frontiers in Psychology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00588>

Trewavas, A. (2017). The foundations of plant intelligence. *Interface Focus*, 7(3), 20160098. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0098>

Trujillo, L. E., Sotolongo, M., Menéndez, C., Ochogavía, M. E., Coll, Y., Hernández, I., ... Hernández, L. (2008). SodERF3, a Novel Sugarcane Ethylene Responsive Factor (ERF), Enhances Salt and Drought Tolerance when Overexpressed in Tobacco Plants. *Plant and Cell Physiology*, 49(4), 512–525. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn025>

Tyagi, R. K., Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Hussain, Z., & Tyagi, H. (2007). Low-cost media for in vitro conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD

markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43(1), 51–58. <https://doi.org/10.1007/s11627-006-9000-y>

Vinocur, B., & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.001>

Wang, R., He, L.-S., Xia, B., Tong, J.-F., Li, N., & Peng, F. (2009). A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis sativa* L.) by shoot tip culture. *Pak. J. Bot*, 41(2), 603–608.

Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>

Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2001). BIOTECHNOLOGY OF PLANT OSMOTIC STRESS TOLERANCE PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR CONSIDERATIONS. *Acta Horticulturae*, (560), 285–292. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.560.54>

Wielgus, K., Luwanska, A., Lassocinski, W., & Kaczmarek, Z. (2008). Estimation of *Cannabis sativa* L. Tissue Culture Conditions Essential for Callus Induction and Plant Regeneration. *Journal of Natural Fibers*, 5(3), 199–207. <https://doi.org/10.1080/15440470801976045>

Xiao, Y., & Kozai, T. (2004). Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: plantlet growth and production cost. *HortScience*, 39(6), 1387–1391.

Xiao, Y., Niu, G., & Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(2), 149–158. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>

Yildiz, M. (2012). The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. <https://doi.org/10.5772/51097>

Zobayed, S. M. A., Afreen, F., Xiao, Y., & Kozai, T. (2004). Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40(5), 450–458.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AB	Pflanzendünger, Nutri Forte A + B von Bio Nova B.V.
Abb.	Abbildung
Alk	Ethanol
d	Tag
h	Stunde
K	Grad Kelvin
LED	Light Emitting Diode, Leuchtdiode
lm	Lumen
MS-Medium	Medium für <i>in vitro</i> Kultur (Murashige & Skoog, 1962)
MS-Vit	Vitaminzusatz (Murashige & Skoog, 1962)
m-T	Metatopolin, ein Pflanzenwuchsstoff
NaDCC	Natriumdichlorisocyanurat
NaOCl	Natriumhypochlorid
Photo+	Bedingungen mit Möglichkeit zur erhöhten Photosynthese im Vergleich zu konventionellen (normalen) <i>in vitro</i> Kultur Bedingungen
Tab.	Tabelle
TDZ	Thidiazuron, ein Pflanzenwuchsstoff

8.2 Definitionen

aseptisch	Frei von Krankheitserregern
Explantat	Teil einer Pflanze der zur <i>in vitro</i> Kultur verwendet wird
<i>In vitro</i>	Unter Glas
Medium	flüssiges bis festes Stoffgemisch zur Kultivierung von Zellen, Geweben oder Organismen
Pflanzenwuchsstoff	Substanzen, welche das Pflanzenwachstum beeinflussen

Propagation	Kultivierung und Vermehrung von Pflanzen
Subkultur	Die Teilung und anschließende Propagation von aseptischen Material

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verwendung von Wuchsstoffen in der Literatur.....	15
Tab. 2 Verwendete Hanfsorten	18
Tab. 3 Nährstoffgehalt der Düngemittellösungen in mmol/L, in eckiger Klammer nicht essentielle Nährstoffe nach (Schubert, 2011).....	19
Tab. 4 Liste verwendeter Stoffe	20
Tab. 5 Zusammensetzung der MS-Vit (Murashige & Skoog, 1962).....	21
Tab. 6 Liste der Medienformulierungen	21
Tab. 7 Verwendete Oberflächensterilisationsmittel und Zusätze.....	23
Tab. 8 Verwendete Oberflächensterilistationsmethoden	23
Tab. 9 Überblick: Keimung oberflächlich sterilisierter Samen	24
Tab. 10 Überblick: Etablierung oberflächlich sterilisierter Pflanzenteile.....	25
Tab. 11 Überblick: Micropropagation auf verschiedenen Kulturmedien	25
Tab. 12 Überblick: Vorversuch der Kulturbedingungen mit erhöhten Möglichkeit zur Photosynthese	26
Tab. 13 Überblick: Kulturbedingungen mit erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese	28
Tab. 14 Überblick: Vorversuch zur photoautotrophen Kultur ohne Zwangsbelüftung	29
Tab. 15 Überblick: Etablierung einer aseptischen photoautotrophen Kultur durch Zwangsbelüftung	29
Tab. 16 Überblick: Lagerung von Sämlingen im Kulturraum.....	31
Tab. 17 Überblick: Langzeitkonservierung bei 8 °C.....	31
Tab. 18 Erfolgsraten der Oberflächensterilisationsmethoden bei Samen; Mittelwert in Prozent ± Standardabweichung	34
Tab. 19 Erfolgsrate der Oberflächensterilisation beim Pflanzenmaterial, Mittelwert in Prozent ± Standardabweichung	34
Tab. 20 Zehntägiger Zuwachs auf diversen Medien	35

Tab. 21 Mittelwert und Standardabweichung von Pflanzen ohne (Normal) und mit (Photo+) erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese auf Medium #12a und #12b nach 14 bis 17 Tagen in Kultur.....	35
Tab. 22 Durchschnittliche Überlebensrate (%), Höhen- und Nodienzuwächse (Mittel \pm Standardabweichung) nach 21 und 36 Tagen von 5 verschiedenen Medien unter normalen (Nor) Bedingungen und erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese (P+). Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, $p<0,05$)	37
Tab. 23 Überlebens- und Sterberate der Pflanzen im Kühlraum nach 200 Tagen.....	41

8.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Anbau der Mutterpflanzen im Gewächshaus	19
Abb. 2 Hipp Gläser im Kulturraum	22
Abb. 3 Santhica auf Medium #12a; oben: Photo+ Bedingungen; unten: normale Bedingungen....	27
Abb. 4 von links nach rechts Medium #21 bis #25; oben: normale Bedingungen; unten Photo+ Bedingungen	28
Abb. 5 Hipp Glas mit Anzuchterde und Verschluss für gute Belüftung	29
Abb. 6 Zwangsbelüftete Weck Gläser mit vorgeschaltetem Luftbefeuchter.....	30
Abb. 7 Versuchsaufbau der zwangsbelüfteten Weck Gläser	30
Abb. 8 Blüten und Wurzelbildung in der in vitro Kultur.....	33
Abb. 9: Blütenbildung der Mutterpflanzen im Gewächshaus unter Kunstlicht; Photoperiode 18h	33
Abb. 10 Steckling nach 3 Wochen	33
Abb. 11 Mittelwert und Standardabweichung von Pflanzen ohne (Normal) und mit (Photo+) erhöhter Möglichkeit zur Photosynthese auf Medium #12a (links) und Medium #12b (rechts) nach 14 bis 17 Tagen in Kultur.....	36
Abb. 12 Boxplotdiagramm (max/min., oberes/unteres Quartil, Median) der Höhenzuwächse in 21 und 36 Tagen, fünf verschiedener Medien ohne (Normal) und mit Möglichkeit zur erhöhten Photosyntheserate (Photo+)	36
Abb. 13 Triebspitzen vom Gewächshaus nach 40 Tagen auf Anzuchterde mit guter Belüftung....	38
Abb. 14 Wurzelbildung nach 40 Tagen	38
Abb. 15 Pflanzen in zwangsbelüfteten Weck Gläsern nach acht Tagen, von links nach rechts: Vermiculit, Steinwolle, Erde und Medium #4	39
Abb. 16 Wurzelbildung in zwangsbelüfteten Weck Gläsern nach 34 Tagen, von links nach rechts: Vermiculit, Steinwolle, Erde und Medium #4	39

Abb. 17 Pflanzen in zwangsbelüfteten Weck Gläsern nach 34 Tagen, von links nach rechts: Vermiculit, Steinwolle, Erde und Medium #4	39
Abb. 18 Subkultivierte Nodien, links: vegetativer Austrieb, rechts: männliche Blütenbildung.....	40
Abb. 19 Explantate für die Subkultivierung, mit weiblicher Blütenbildung des apikalen Triebes, Fedora (links), Finola (rechts); Skala 5 mm	40
Abb. 20 Fedora (links) und Finola (rechts) Sämling nach 100 Tagen auf #4 [½ AB-Medium].....	40
Abb. 21 Fedora auf Medium #8, 200 Tage im Kühlraum	41
Abb. 22 Futura auf Medium #12b, 200 Tage im Kühlraum.....	41