

## ***In vitro* – Kultur von Dianthus**

Dianthus, eine Pflanze aus der Familie der Karyophyllaceae, wird vorzugsweise verwendet um die Meristemebildung zu untersuchen. Einfache Experimente während der Wachstumsphase zeigen die Auswirkungen unterschiedlicher Wachstumsregulatoren (Phytohormone) im Kulturmedium.

### **Experimentelles Funktionsprinzip**

Die Nelken-Samen werden zur Keimung in Erde gegeben. Die jungen Sprösslinge werden nach der Keimung vereinzelt, desinfiziert und in drei unterschiedliche Kulturmedien genommen um die Pflanzen wahlweise zu vermehren, die Knotenbildung oder die Verwurzelung zu beobachten. Alle Pflanzmedien sind identisch, sie unterscheiden sich lediglich in der Zugabe der verschiedenen Phytohormone. Während eines Zeitraums von 4-6 Wochen beobachtet man die unterschiedlichen Entwicklungen. Die ausgewurzelten Pflanzen können unter Umständen während der Phase der Akklimatisierung in ein Gewächshaus gesetzt werden.

### **Keimung von Nelkensämen**

Bereiten Sie Keimgefäße zur Aussaat der Nelkensämen vor, die hinreichend Erde enthalten um die jungen Sprösslinge bis zur Pikierung darin wachsen zu lassen. Befeuchten Sie die Samen bei der Einsaat. Stellen Sie die Aussaatgefäße an einen hellen Ort, halten Sie sie hinreichend feucht und düngen Sie nach Bedarf. Bis zur Keimung der Pflanzen können gut 2 Monate vergehen.

#### **1 Vorbereitung der Anzuchtmedien**

Notwendiges Material:

- Destilliertes Wasser
- Chlorbleiche (Javelwasser / Typ: Javel Plus)
- Alkohol zum Abflammen
- Bunsenbrenner
- Autoklav oder Dampfdrucksterilisator
- 6 Einmachgläser zur Desinfektion der Sprösslinge

#### **2 Vorbereitung der Pflanzmedien**

Mischen Sie die Phytohormone mit der auf der Verpackung angegebenen Menge an destilliertem Wasser. Zum Auflösen rühren Sie zunächst um, dann geben Sie das Gemisch bei geringer Leistung (650W) für einige Minuten in die Mikrowelle. Wenn die Lösung vollkommen klar ist, haben sich die entsprechenden Phytohormone vollständig gelöst. Anschließend geben Sie die Lösungen in 1000 ml Weithalsflaschen (bitte denken Sie daran, die Flaschen nur bis 800 ml aufzufüllen und den Schraubdeckelverschluss während der Autoklavierung nicht vollständig zu schließen, da sonst das Gefäß unter Druck platzt!). Es wird für 25 min. bei 115°C oder 20 min. bei 120°C unter Dampfdruck sterilisiert. Anschließend lassen Sie die für mindestens 3 Stunden Flaschen auskühlen .

Sterilisieren Sie außerdem Ihre Arbeitswerkzeuge (Pinzetten, Skalpelle, Scheren), je 6 Einmachgläser pro Gruppe (zur Desinfektion der Pflanzen) und stellen Sie genügend destilliertes Wasser her.

### 3 Kultivierung

Notwendiges Material pro Gruppe:

- 2 Einmachgläser zur Desinfektion
- 1 Einmachglas mit Alkohol zur Aufbewahrung
- 1 Skalpell oder 1 Schere
- 1 Pinzette
- 1 sterile Petrischale
- 1 Bunsenbrenner

Erforderliche Lösungen:

- Spülmittel
- Alkohol zum Abflammen
- Chlorbleiche (Javelwasser / Typ: Javel Plus)
- 4 sterile Einmachgläser mit destilliertem Wasser

Pflanzen:

- 3 Nelkensprösslinge

### 5 Vorbereitung der Arbeitsfläche

Vor Arbeitsbeginn waschen Sie sich bitte die Hände mit Seife und reinigen Sie die Arbeitsfläche mit Chlorbleiche.

In die Mitte der Arbeitsfläche stellen Sie bitte Ihren Bunsenbrenner.

Rechts davon (Linkshänder organisieren Ihren Arbeitsplatz spiegelbildlich) platzieren Sie das Einmachglas, welches Ihre Arbeitsgeräte in Alkohol enthält.

Stellen Sie eine sterile Petrischale vor den Bunsenbrenner, welche

links neben dem Bunsenbrenner platzieren Sie die Flasche mit dem Kulturmedium; hinter den Brenner die zur Desinfektion dienenden Einmachgläser.

### 6 Desinfektion der Pflanze

Nehmen Sie die Keimlinge aus der Erde und spülen Sie sie kurz unter fließendem Wasser. Jede Schülergruppe setzt wenigstens 3 Keimlinge in eine Spülmittellösung. Anschließend werden die Keimlinge 8 min. in Chlorbleiche desinfiziert. Anschließend sind die Keimlinge steril.

Zur Sterilisierung der Arbeitsgeräte reicht es aus, diese in Alkohol zu lagern und kurz vor Gebrauch „abzuflammen“. Dazu hält man die Spitze der jeweiligen Instrumente kurz in die farbige Flamme des Bunsenbrenners – letzte Alkoholreste werden dabei in einer hell-leuchten Flamme verbrannt (abgeflammt).

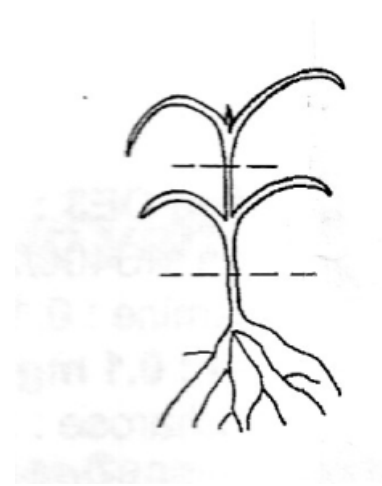
Die Keimlinge werden in den vier bereits vorbereiteten Einmachgläsern mit sterilem Wasser jeweils 5 min gewässert, um letzte Reste der Chlorbleiche zu entfernen.

### Zusammensetzung der Kulturmedien

OE1:	0,1 mg/l Thiamin	OE2:	0,1 mg/l Thiamin	OE3:	0,1 mg/l Thiamin
	0,5 mg/l 6 BA		1 mg/l Kinétine		0,1 mg/l ANA
	20 g/l Saccharose		20 g/l Saccharose		20 g/l Saccharose
	7 g/l Agarose		7 g/l Agarose		7 g/l Agarose
			1 mg/l D2.4		

Achtung: Berühren Sie während der Arbeit nicht die Spitze Ihrer Arbeitsgeräte mit den Händen, lassen Sie Türen und Fenster verschlossen und sprechen Sie nicht. Nur so wird eine keimfreie Umgebung gewährleistet.

Legen Sie die Pflanze in die Petrischale und schneiden Sie sie jeweils kurz über und unter den ersten Blättern ab.



Öffnen Sie eine Flasche Nährmedium neben dem Bunsenbrenner (OE1, OE2 oder OE3) und flammen Sie sowohl Flaschenhals als auch den Deckel kurz ab. Mit der Pinzette stechen Sie eine kleine Mulde in die gelartige Oberfläche des Nährmediums und setzen den Schnitt Ihres Sprösslings in diese Mulde – ähnlich wie bei der Vereinzelung von Keimlingen. Dann flammen Sie erneut vorsichtig Flaschenhals und Deckel ab und legen den Deckel auf die Flasche auf. Wichtig ist, Ihrem Sprössling noch Luftzufuhr zu gewährleisten und zugleich das Eindringen von Keimen zu verhindern.

Wiederholen Sie diese Vorgehensweise mit allen drei Medien. Anschließend stellen sie die Flaschen hell, jedoch nicht in direktes Sonnenlicht, um nicht zu riskieren dass die Pflanze verbrennt. Im Winter – der Periode der kurzen Tage – sollten Sie die Flaschen mit Tageslichtlampen zusätzlich bestrahlen.

## 7 Auswertung

Nach 4-6 Wochen wird sich die Nelkenpflanze in Medium OE1 vermehren, in Medium OE2 erfolgt die Knotenbildung und in Medium OE3 bildet sich Wurzelwerk. Die gewurzelten Pflanzen können zurück in Erde gepflanzt werden. Dazu sollte man kleine Torfgefäße verwenden, die mit Anzuchterde befüllt werden. Anschließend stellt man die Pflanzen für 14 Tage zur Akklimatisierung in ein Gewächshaus. Für die Anpassung an das Freiland sollte man der Pflanze weiter 21 Tage Zeit lassen und u. U. ein Insektizid oder Fungizid verwenden.

### **Ablauf des gesamten Experiment**

Keimung der Nelkensamen - ca. 60 Tage

Herstellung der Kulturmedien – 1 Tag

*In vitro* Kultur der Sprösslinge anlegen – 1 Tag

Beobachtungsdauer der *in vitro* Kultur – nach Bedarf 4-6 Wochen