

Genetic diversity of the genus *Curcuma* in Bangladesh and further biotechnological approaches for *in vitro* regeneration and long-term conservation of *C. longa* germplasm

**The thesis accepted by the
The Department of Biology, University of Hannover
for the degree of
Doctor of Natural Sciences
Dr. rer. nat.**

**Accomplished by
M. Sc. Md. Aminul Islam
Born in 01 March 1970
Place of Birth: Dhaka, Bangladesh**

SUMMARY

The genus *Curcuma* is well known for its multivarious uses as spices, medicines, cosmetics, dyes, flavourings, starch, and ornamentals. Species that belong to the genus are currently being threatened due to high anthropogenic interference and habitat destruction. In this study, substantial research on genetic diversity, 2C DNA and genome size, chromosome analysis, *in vitro* regeneration and cryopreservation were conducted.

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to determine inter- and intra-specific genetic diversity. Estimated Shannon's Index values of genetic diversity were ranged from 0.018 ± 0.028 to 0.335 ± 0.117 , which inferred that considerable amounts of genetic diversity still exist in some species while the rest of the species presented low genetic variability. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed significant partitioning (Φ_{CT} value 0.265, $P < 0.003$) between the wild and cultivated species. A large cluster in the presented dendrogram contained morphologically similar species that were found to be triploid ($2n=63$).

In case of *C. zedoaria*, high intrapopulational genetic diversity (0.717 ± 0.090) and low interpopulational diversity (0.283 ± 0.089) were estimated. The highest genetic variability was observed in the hilly population (Chittagong; 0.349 ± 0.128) and the lowest in the plateau lands (Birganj; 0.149 ± 1.04). Diversity values of the populations were positively correlated to the mean 2C DNA values. AMOVA results inferred that the zedoary populations are moderately partitioned into regional (Φ_{CT} value 0.153, $P < 0.001$) and edaphic (Φ_{CT} value 0.142, $P < 0.001$) levels.

Cytology and flow cytometry analyses presented various significant results that were not reported so far. Chromosomal investigations revealed that the basic chromosome number $n = 21$ is more frequent in the genus *Curcuma* with $2n = 42, 63$ and 84 . Flow cytometry data illustrated that *Curcuma* species covered a range of 2C DNA values and genome sizes ranged from 2.10 ± 0.018 – 5.30 ± 0.025 pg. These values were corresponding to different ploidy levels of diploid, triploid, and tetraploid.

Furthermore, a high frequency *in vitro* regeneration for *C. longa* was achieved. On an average 6.73 ± 0.48 shoots with 5.13 ± 0.31 roots were obtained within four weeks from a single explant of axillary buds. Almost 100% of the transferred plantlets survived and grew up to maturity. RAPD analyses of *in vitro* plants revealed that the *C. longa* var. Surma is likely to be genetically unstable. A proficient protocol for microrhizome induction was also established. A mean number of 8.3 ± 0.32 microrhizomes were obtained from a single culture that can be transferred to the soil directly without acclimatisation.

Finally, an efficient cryopreservation system for *C. longa* was established for the first time through vitrification procedure. Under optimum freezing conditions about 80% of the meristems were found to be capable to recover and develop intact plants. The presented cryopreservation protocol seems to be promising for long-term conservation of *Curcuma* germplasm.

Keywords: *Curcuma* species, genetic diversity, RAPD, cytology, flow cytometry, *in vitro* regeneration and cryopreservation

ZUSAMMENFASSUNG

Die Gattung *Curcuma* ist aufgrund ihrer vielfältigen Verwendung als Gewürz, Arznei, Kosmetikum, Färbemittel, Aromastoff, Stärke und Zierpflanze sehr bekannt. Die Arten dieser Gattung sind jedoch in neuerer Zeit immer stärker durch den Eingriff des Menschen und die Zerstörung ihres natürlichen Lebensraumes bedroht. In der vorliegenden Studie wurden umfangreiche Untersuchungen zur genetischen Diversität, 2C DNA, Genomgröße, Chromosomenzusammensetzung, *in vitro* Regeneration und Kryo-konservierung durchgeführt.

Zur Bestimmung der inter- und intraspezifischen genetischen Diversität wurde die Methode der Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) verwendet. Der berechnete Shannon-Index der genetischen Diversität reicht von $0,335 \pm 0,117$ bis $0,018 \pm 0,028$. Dies zeigt, dass in einigen Spezies eine beträchtliche genetische Diversität, in wenigen anderen aber auch nur eine sehr geringe genetische Variabilität besteht. Die Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) ergab, dass die kultivierten Spezies und der Wildtyp signifikant voneinander getrennt sind (Φ_{CT} Wert 0,265, $P < 0,003$). Ein großes Cluster im vorgestellte Dendrogramm umfasst morphologisch ähnliche Spezies, die alle triploid sind ($2n=63$).

Im Fall von *C. zedoria* wurde eine hohe genetische Diversität innerhalb der Population ($0,717 \pm 0,090$) und eine vergleichsweise geringe zwischen den Populationen ($0,283 \pm 0,089$) gemessen. Die höchste genetische Variabilität wurde für die Hügel-Population (Chittagong; $0,349 \pm 0,128$), die niedrigste für die Population der Hochebenen (Birganj; $0,149 \pm 1,04$) bestimmt. Es hat sich gezeigt, dass die Werte der Diversität der Populationen positiv mit dem mittleren 2C DNA-Wert korreliert sind. Die AMOVA-Ergebnisse zeigten für die *Zedora*-Population eine mäßige Trennung in regionale (Φ_{CT} Wert 0,153, $P < 0,001$) und edaphische Level (Φ_{CT} Wert 0,142, $P < 0,001$).

Zytologische und durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben verschiedene wichtige Ergebnisse, die bisher noch nicht beschrieben sind. Chromosomale Analysen zeigten, dass die Gattung oft ein Vielfaches des haploiden Satzes ($n = 21$) aufweist $2n = 42, 63$ und 84 . Durchflusszytometrische Daten wiederum ergaben eine Überdeckung eines 2C DNA-Bereichs verschiedener *Curcuma*-Spezies und eine Schwankung der Genomgröße von $2,10 \pm 0,018$ bis $5,30 \pm 0,025$ pg. Diese Werte entsprechen den verschiedenen ploidie-Ebenen von diploid, triploid und tetraploid.

Darüber hinaus wurde bei *in vitro*-Regenerationsversuchen von *C. longa* eine hohe Regenerationszahl erreicht. Aus dem Explantat eines Achselsprosses konnten im Durchschnitt $6,73 \pm 0,48$ Sprosse und $5,13 \pm 0,31$ Wurzeln gezogen werden. Fast 100 % der Pflänzchen überlebten und wuchsen bis zu ganzen Pflanzen. RAPD-Analysen der *in vitro*-Pflanzen ergaben jedoch, dass die Varietät *C. longa* var. *Surma* wahrscheinlich genetisch instabil ist. Auch wurde ein geeignetes Protokoll zur Induktion von Mikrorhizomen etabliert. Im Mittel konnten mit dieser Methode $8,3 \pm 0,32$ Mikrorhizome aus einer einzelnen Kultur erhalten werden, die ohne Akklimatisierung direkt in Erde gepflanzt werden konnten.

Schließlich wurde für *C. longa* zum ersten Mal ein effizientes Kryokonservierungs-System mit Hilfe der Vitrifikations-Methode etabliert. Unter optimalen Gefrierbedingungen sind 80 % der Meristeme nach der Konservierung in der Lage sich wieder zu erholen und intakte Pflanzen zu bilden. Daher bietet dieses vorgestellte Protokoll eine viel versprechende Möglichkeit zur Langzeit-Konservierung von *Curcuma* Germplasmen.

Stichwörter: *Curcuma*-Spezies, genetische Diversität, RAPD, Zytologie, Durchflusszytometrie, *in vitro*-Regeneration und Kryokonservierung.