

## Untersuchungen zur Depothaltung eines Kartoffel-sortimentes in vitro

B. PETT und RAMONA THIEME

Institut für Kartoffelforschung der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften, 2551 Gross Lüsewitz, Deutsche Demokratische Republik

Abschluss des Manuskriptes: 24. November 1980

*Zusätzliche Stichworte:* In-vitro-Knollenbildung, Subkulturintervall, Wachstumsverlängerung

### Zusammenfassung

Um die Haltung grösserer In-vitro-Sortimente zu rationalisieren, wurden mehrere Methoden zur Verlängerung des Subkulturintervalls an In-vitro-Kulturen der Kartoffel getestet. Sowohl die Haltung unter suboptimalen Bedingungen als auch ein CCC (Cycocel)-Zusatz zum Nährboden führten zu unbefriedigenden Ergebnissen. Als annehmbare, wenig arbeitsintensive Methode wird die Erzeugung von In-vitro-Knollen empfohlen, die länger als ein Jahr ohne Passage bei +4 °C gelagert werden können. Die Knollenbildung in vitro wird bei 8-10 °C und einer Beleuchtungsdauer von <12 Std. je Tag stimuliert.

### Einleitung

Die Haltung von Kartoffelsortimenten im Freien und im Gewächshaus ist nicht unproblematisch, da sowohl wilde als auch Kulturkartoffeln während der Vegetation von zahlreichen Krankheiten, insbesondere Virose, befallen werden. Das betrifft in erster Linie die knollenvermehrbaren Formen, die im Laufe weniger Jahre so viruskrank werden können, dass die Samenbildung nicht mehr stattfindet.

Ein gangbarer Weg zur Überwindung dieser Schwachstelle ist die Haltung ganzer Sortimente oder zumindestens besonders anfälliger Muster in vitro. Dadurch wird es möglich, den jeweiligen Gesundheitszustand der Explantate entweder zu erhalten oder durch Vorschaltung von Meristemkultur zu verbessern. Neben diesen zu erwartenden Vorteilen bietet die sterile In-vitro-Haltung von Sorten und Mustern weitere Vorzüge:

- einmal virusfrei gemachte Sorten sind zeitlich unbegrenzt in vitro vermehrbar;
- jahreszeitliche Unabhängigkeit;
- Haltung umfangreicher Sortimente auf kleinstem Raum bei verhältnismässig geringem Arbeitsaufwand;
- Nutzung der In-vitro-Kulturen als Objekte in der Phytopathologie ohne Gefährdung der Quarantänebestimmungen;
- erleichteter internationaler Sortenaustausch (vgl. Roca et al., 1978).

Die Haltung virusfreier Testsortimente spielt bei Resistenzprüfungen eine zunehmende Rolle und wird im Institut Gross Lüsewitz mit der Kultur des Phytophthora-Testsortimentes in vitro bereits erfolgreich durchgeführt (Kleinhempel & Götz, 1980). Andererseits dürfte auch die Haltung definierter Kartoffelvirosen an In-vitro-Pflanzen mehr und mehr an Bedeutung gewinnen (Trofimec et al., 1976).

Um die Haltung eines In-vitro-Kartoffelsortimentes so effektiv wie möglich zu gestalten, ist eine Verlängerung der Subkulturintervalle erforderlich. Das ist auf folgenden Wegen möglich:

- Kultivierung unter suboptimalen Bedingungen, d.h. verdünnter Nährboden und/oder niedrige Temperaturen (vgl. Radatz & Standke, 1978);
- Einsatz von Wachstumsretardanzien, wie CCC (Cycocel) u.ä. zum Nährboden (vgl. Trofimec et al., 1976; Radatz & Standke, 1978);
- Gefrierkonservierung von Pflanzenteile (Sandke, 1978);
- Erzeugung von Überdauerungsorganen (Knollen) in vitro.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden verschiedene Verfahren zur Anlage und Haltung eines Kartoffeldepots in vitro auf ihre Eignung getestet. Dabei lag der Schwerpunkt der Versuche auf der Verlängerung der Subkulturintervalle.

### Material und Methoden

Es wurde von Stengelschnittlingen aus Meristemkulturen verschiedener Sorten ausgegangen, deren Gewinnung nach einem Verfahren von Pett et al. (1980) erfolgte. Als Nährboden für die Subkulturen diente ein Medium nach Murashige & Skoog (1962) mit 2 % Saccharose ohne Vitamin- und Wachstoffsstoffzusatz. Die Beleuchtungsintensität betrug 3–4000 lux. Beleuchtungsdauer und Kultivierungstemperatur wurden je nach Versuchsbedingungen 8–16 Stunden je Tag bzw. 5–22 °C variiert. Als Lichtquellen dienten Leuchtstoffröhren mit Tageslichteffekt. Bei den Untersuchungen mit Wachstumsretardanzien wurde je Liter Nährboden 1 ml des CCC-Präparates 'Cycocel' zugesetzt, was einer Konzentration von 0,4 g CCC je Liter Nährboden entspricht.

In einigen Subkultur-Varianten wurde vergleichsweise als Nährbodenersatz sterilisierte Komposterde in Kulturröhrchen eingesetzt, wobei ca. 5 g Erde mit 1 ml WOPIL-Lösung, einem handelsüblichen Volldünger, in ein Röhrchen abgefüllt wurde. Das Wachstum der Explantate auf Komposterde war zufriedenstellend, und es wurde eine kräftige Wurzelentwicklung beobachtet.

### Ergebnisse und Diskussion

#### *Wachstumsverlängerung in vitro*

Bei allen Varianten, die unter suboptimalen Temperaturen (<12 °C) und 16 stündiger

Tabelle 1. Durchschnittliche Vegetationsdauer (in Tagen) je Röhrchen (n = 20) in Abhängigkeit von Temperatur und CCC-Zusatz; Ermittlung der Lebensdauer bei einer Absterberate von >50 % der in-vitro-Pflanzen.

Sorte	Kulturvariante							
	22 °C <sup>1</sup>		10 °C <sup>2</sup>		22 °C + CCC <sup>1</sup>		10 °C + CCC <sup>2</sup>	
	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
Arkula	91	100	91	100	112	123	85	93
Xenia	96	100	98	102	122	127	91	95
Kardia	104	100	112	108	140	135	112	108

<sup>1</sup> 16 Std. Beleuchtung; <sup>2</sup> 12 Std. Beleuchtung.

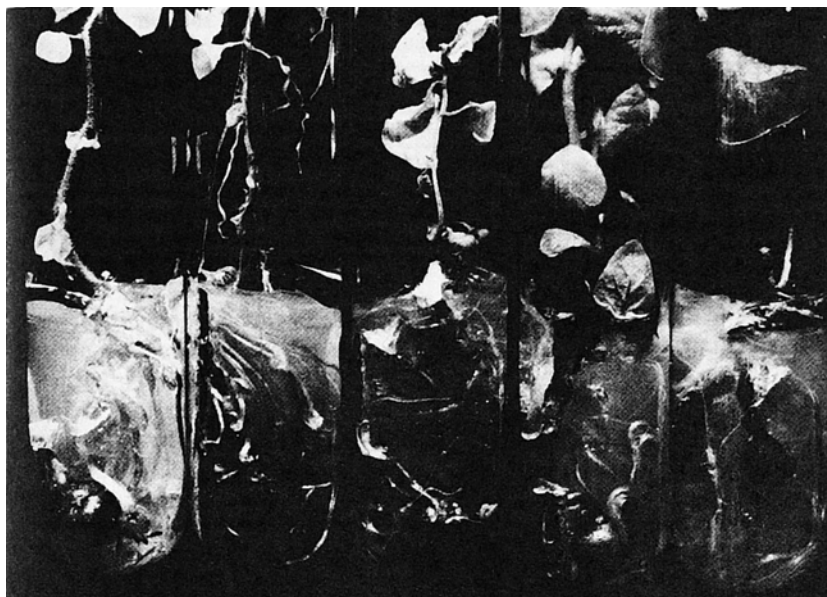


Abb. 1. Sterile In-vitro-Knollen der Sorten 'Adretta', 'Auralia', 'Libelle', 'Astilla' und 'Salut' (von links nach rechts), die sich nach ca. 3 Monaten unter Bedingungen von 8-10 °C und 12 Std. Beleuchtung je Tag entwickelten.

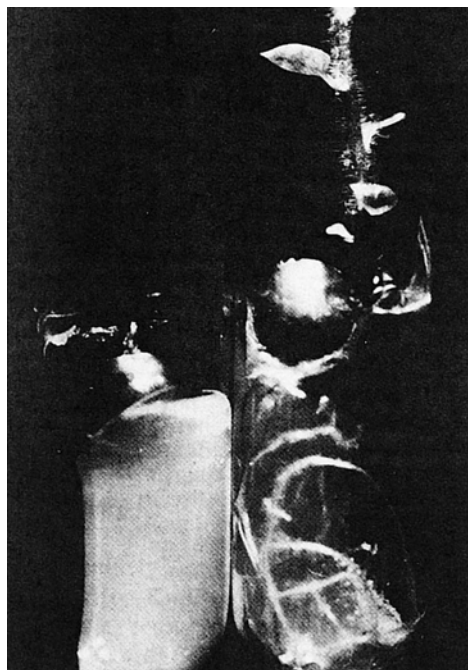


Abb. 2. Ausgekeimte In-vitro-Knollen der Sorte 'Arkula' (3 Monate unter Bedingungen der Knollenbildung und anschließender 3monatiger Lagerung bei 22 °C, in den letzten 3 Monaten 16 Std. beleuchtet).

Tabelle 2. Durchschnittliche Knollenzahl je Röhrchen ( $n = 20$ ) in Abhängigkeit von Temperatur und CCC-Zusatz (Beleuchtungsdauer wie in Tabelle 1).

Sorte	Kulturvariante			
	22 °C	10 °C	22 °C + CCC	10 °C + CCC
Arkula	0,6	2,5	1,1	1,3
Xenia	0,1	2,6	0,7	1,8
Kardia	0,2	1,7	1,0	1,9

Beleuchtung durchgeführt wurden, zeigten sich Wachstumsdepressionen. Es setzte zwar ein Längenwachstum der Achselknospen am überpflanzten Internodium ein, jedoch blieb die Wurzelbildung aus, und in der weiteren Folge kam es zu rötlichen Verdickungen im oberen Sprosssteil. Dieser Effekt entspricht wahrscheinlich der Bildung eines Ersatzspeicherorgans. Temperaturen unter 8 °C führten bald zu Chlorophylldefekten und nach 6–8 Wochen zum völligen Absterben der Explantate.

Um die Wurzelbildung zu stimulieren, wurden die frischen Explantate bei 22 °C und 16 stündiger Beleuchtung 1 bis 4 Wochen vorkultiviert. Nach Überführung dieser Kulturen unter Bedingungen von 8–10 °C zeigten die Explantate ein verlangsamtes, aber normales Wachstum. Bei 5 °C traten jedoch nach 4 wöchiger Kultur Vergilbungserscheinungen auf. Es zeigte sich, dass bei allen eingesetzten Sorten bereits eine einwöchige Vorkultivierung unter optimalen Bedingungen zur Wurzel- und Sprossentwicklung ausreichte.

Wie die Versuchsauswertung ergab, konnte keine wesentliche Verlängerung der Vegetationsdauer *in vitro* bei 8–10 °C erreicht werden (Tabelle 1). Lediglich bei 'Kardia', einer späten Sorte, wurde eine Vegetationsverlängerung von ca. 10 % erzielt.

Nach einem Zusatz von 0,4 g CCC je Liter Nährboden wurde eine Verlängerung der Vegetation nur bei Temperaturen von 22 °C erreicht, während die Kombination CCC

Tabelle 3. Durchschnittliche Knollenzahl je Röhrchen ( $n = 20$ ) bei 10 °C und 12stündiger täglicher Beleuchtung; Ermittlung der Bildungsdauer bei einem Knollenansatz von >50 % der *In-vitro*-Pflanzen.

Sorte	Knollenbildung in Tagen	Knollenzahl je Röhrchen
Astilla	61	1,8
Arkula	61	2,1
Salut	62	2,0
Adretta	63	1,7
Auralia	68	2,0
Xenia	69	2,6
Libelle	69	1,4
Galina	71	1,5
Mariella	76	2,2
Zuchtstamm 112 N	78	1,2
Kardia	85	1,7
		$\bar{x}$ 1,8

und 10 °C bei den Sorte 'Arkula' (Reifegruppe 1) und 'Xenia' (Reifegruppe 3) sogar eine leichte Verkürzung der Vegetation ergab. Andere CCC-Konzentrationen kamen nicht zum Einsatz. Die CCC-exponierten Pflanzen wiesen *in vitro* einen gedrungenen Wuchs auf, der sich nach Subkultur wieder normalisierte.

Diese erhaltenen Werte stehen in gewissem Gegensatz zu den Resultaten von Radatz & Standke (1978), die durch Kultivierung von Stengelschnittlingen bei suboptimalen Temperaturen erheblich grössere Subkulturintervalle erhielten. Es sei aber erwähnt, dass beide Autoren von etwas anderen Versuchsbedingungen und anderen Sorten ausgingen.

Ein Wuchsstoffzusatz von 1 mg Kinetin und 1 mg Indolessigsäure pro Liter ergab im Vergleich zur wuchsstofffreien Variante keine Wachstumsunterschiede.

Die auf steriler Komposterde gewachsenen Subkulturen wiesen den gleichen Habitus auf wie auf normalem Nährboden.

#### *Knollenbildung in vitro*

Um die Knollenbildung *in vitro* anzuregen, wurden die Beleuchtungszeiten verkürzt. Es zeigte sich, dass eine 10–12 stündige Beleuchtung die Knollenbildung förderte. Dieser Effekt wird verstärkt, wenn die Pflanzen Temperaturen von 8–10 °C ausgesetzt werden (Abb. 1 und 2). CCC-Zusatz zum Nährboden führte zwar bei höheren Temperaturen, verglichen mit der gleichen Temperaturvariante ohne CCC, zu einer Stimulierung der Knollenbildung, bei 8–10 °C jedoch zu einer teilweisen Hemmung (vgl. Tabelle 2). In den CCC-Varianten wurden die Knollen in der Regel über dem Nährboden angelegt. Die Knollenzahl war auf wuchsstofffreiem Nährboden am höchsten.

Knollenbildung und -ertrag *in vitro* ist sortenabhängig (Tabelle 3). Die beiden sehr frühen Sorten 'Astilla' und 'Arkula' haben nach 61 Tagen Subkultur an 50 % der Explantate Knollen gebildet. Bei der späten Sorte 'Kardia' wurde dieser Wert erst nach 85 Tagen erreicht. Nach weiteren 4–6 Wochen wiesen alle Wiederholungen Knollenbildung auf, wobei zu diesem Zeitpunkt der Nährboden gewöhnlich verbraucht war und die Blätter vergilbten.

Wurden diese Knollen im Röhrchen höheren Temperaturen ausgesetzt, begannen sie nach 2–4 Wochen auszukeimen. Es bildeten sich normale, subkultivierbare Triebe aus. Um die Auskeimung der *In-vitro*-Knollen zu unterdrücken, wurden die Röhrchen unmittelbar nach dem Vergilben der Pflänzchen in einem Kühlschrank bei +4 °C gelagert. Nach vorliegenden Erfahrungen können die *In-vitro*-Knollen auf diese Weise mindestens 1 Jahr lagern. Die Sorte 'Arkula' war nach dieser Zeit bereits gekeimt, und die Keime konnten bei entsprechender Beleuchtung subkultiviert werden. Auch bei der Sorte 'Kardia' wurden nach dieser Zeit vereinzelt Keime festgestellt. Legt man eine Knollenbildungszeit von maximal 4 Monaten zugrunde und addiert die bisher erzielte Lagerung 1 Jahr (bei 4 °C) dazu, beträgt das gesamte erreichte Subkulturintervall 16 Monate.

Um die Sicherheit der Sterilität während der Langzeitlagerung zu erhöhen, wurden die einzelnen Versuchsmuster in Polyäthylentüten eingeschweisst. Die Überlagerung der *In-vitro*-Knollen im Kühlschrank ist relativ unproblematisch. Da die Kulturen bei der Auslagerung noch steril sind, können sofort Subkulturen angelegt werden. Es ist aber auch möglich, diese Knollen in Töpfe auszupflanzen. Smyglja & Klenjaev (1979)

erzeugten ebenfalls virusfreie In-vitro-Knollen und pflanzten sie ins Freiland unter Folie aus.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden bisher nur mit Kulturkartoffeln durchgeführt. Dabei scheinen, relativ gesehen, die einzelnen Sorten in bezug auf ihre Vegetationslänge mit den Beobachtungen in vivo in der Tendenz übereinzustimmen. Die Versuche werden an knollentragenden wilden und kultivierten Kartoffelspecies fortgesetzt.

## Literatur

- Kleinhempel, D. & E. Götz, 1980. Zur Prüfung der Rassen von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary nach einem in-vitro-Verfahren. *Arch. Phytopath. PflSchutz* 16: 103-109.
- Murashige, T. & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Pl.* 15: 473-497.
- Pett, B., R. Thieme & G. Schenk, 1978. Virusfreimachung von Kartoffeln durch Wärmebehandlung an In-vitro-Pflanzen. *Arch. Phytopath. PflSchutz* (im Druck). 17-1951
- Radatz, W. & K.-H. C. Standke, 1978. Untersuchungen zum 'Minimalwachstum' von Kartoffeln in vitro. *Landbauforsch. Völkenrode* 28: 75-78.
- Roca, W. M., N. O. Espinoza, M. R. Roca & J. E. Bryan, 1978. A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. *Am. Potato J.* 55: 691-701.
- Smyglja, V. A. & G. V. Klenjaev, 1979. Uskorennoe razmnozenie ischodnogo materiala. *Kartofel'i ovosci*, Heft 7: 12.
- Standke, K.-H., 1978. Tiefgefrierung nodaler Segmente von Kartoffelpflanzen mittels flüssigem Stickstoff. *Landbauforsch. Völkenrode* 28: 77-78.
- Trofimec, L. N., P. A. Chiznjak & A. P. Kucumov, 1976. Metody lecenija kartofelja zarazennogo virusnymi boleznyami. Moskau, Vniiteisch, Obzorn. inform.; 62 S.