

Der Einfluß verschiedener Zucker auf die Kallus- und Sproßbildung bei Zichorie (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*).

GUNDA MIX-WAGNER und OLIVER GAILING*

Institut für Pflanzenbau

Einleitung

Die Kulturform *Cichorium intybus* L. var. *sativum* geht auf die Wegwarte (*Cichorium intybus* L.) zurück. Die Zichorie ist eine potentielle neue Industriepflanze, deren Rübe zur Gewinnung von Inulin und Fruktose genutzt wird.

Kohlenhydrate sind als Energiequellen für die lebenden Zellen notwendig. Zur Kultivierung von Pflanzengewebe ist deshalb ein kontinuierliches Angebot von Kohlenhydraten im Nährboden von Wichtigkeit, da die photosynthetische Aktivität von *in vitro* wachsendem Gewebe reduziert ist. Diese Reduktion wird durch einen begrenzten Gasaustausch und hohe relative Luftfeuchtigkeit verursacht (Kozai, 1991).

Saccharose wird überwiegend bei In-Vitro-Kulturen als Kohlenhydratquelle eingesetzt, obwohl einige Berichte vorliegen, die von Erfolgen beim Einsatz von anderen Zuckern (z. B. Fruktose, Glukose, Laktose) berichteten. Glukose ist ein Zucker, der die Regeneration von *Alnus*-Species-Kulturen positiv beeinflussen konnte (Tremblay et al., 1984), wogegen *Morus alba*-Kulturen (Okamoto et al., 1986) eine bessere Wachstumsrate mit Fruktose im Nährboden zeigten. Bei der Regeneration von Topinambursprossen (*Helianthus tuberosus* L.) aus Knollenaugenexplantaten hatte sich eine Kombination von gleichen Teilen Saccharose, Fruktose und Glukose als erfolgreich durchgesetzt, wogegen bei der In-vitro-Lagerung der Sprosse sich ein saccharosehaltiger Nährboden positiv auf die Lagerungsdauer auswirkte (Mix und Schittenhelm, 1988).

Die vorliegende Arbeit beschreibt Ergebnisse wie durch den Zusatz unterschiedlicher Zucker zum Nährboden die Kallus- und die Sproßbildung beeinflusst werden konnte.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden Blattrippensegmente der Sorte "Cassel" auf Nährböden mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen gelegt. Die Blätter wurden Zichorienpflanzen, die im Gewächshaus herangezogen wurden, entnommen. Die Inkulturanahme erfolgte wie bei Mix (1985) beschrieben. Die Explantate unterschieden sich in ihrer Größe und wurden wie folgt eingeteilt:

I= 2/1,5 mm (Länge/Breite); II= 3/2 mm; III= 5/3 mm und IV= < 8/4 mm.

Der Murashige- und Skoog-Nährboden (1962) diente als Grundnährboden. Dem Nährboden wurden folgende Hormone: 0,26 mg/L⁻¹ 6-Benzylaminopurin (BAP) und 2,0 mg/L⁻¹ Indolylessigsäure (IES) zugesetzt. Die Nährböden enthielten 30 g/L⁻¹ eines der folgenden Kohlenhydrate: Fruktose, Galaktose, Glukose, Laktose, Maltose, Raffinose, Ribose, Rhamnose, Saccharose, Sorbose und Xylose.

Der pH-Wert der Nährlösung wurde auf 5,8 eingestellt und anschließend mit 3,4 g/L⁻¹ Gelrite aufgekocht. Die mit Nährboden gefüllten Kulturgefäße wurden bei 120°C und 1,1 bar für 10 min. autoklaviert.

Die Kultivierung der Blattrippen erfolgte bei 25° C in Dunkelheit oder im 14 h-Tag. Nach dem Erscheinen der ersten Sprosse fand eine Überführung der Kulturen in einen 14 h-Tag statt.

Ergebnisse und Diskussion

Kallusbildung konnte nicht auf allen Nährböden, die jeweils mit einem Kohlenhydrat versetzt waren, induziert werden (Tabelle 1). Die Blattsegmente, die auf Nährböden kultiviert wurden, die Galaktose, Sorbose, Ribose und Xylose enthielten, zeigten weder

Zucker	Kultivierte Explantate	Kallusbildung in %	Anzahl gebildeter Sprosse
Fruktose	140	75	6
Galaktose	130	0	0
Glukose	145	79	17
Laktose	120	72	20
Maltose	110	60	22
Raffinose	145	69	0
Ribose	122	0	0
Rhamnose	145	61	11
Saccharose	170	73	14
Sorbose	125	0	0
Xylose	160	0	0

Tabelle 1: Einfluß verschiedener Zucker auf die Kallus- und Sproßbildung nach 8-wöchiger Kultur

in Licht noch in Dunkelheit eine Kallus- und/oder Sproßbildung. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch nach 16wöchiger Kulturdauer. Mit einer Kallusbildung reagierten mit unterschiedlicher Intensität viele Segmente, die auf Nährböden mit Laktose, Saccharose, Maltose, Fruktose, Glukose, Rhamnose und Raffinose kultiviert wurden. Auf glukosehaltigem Nährboden konnte die beste (79 %) und auf maltosehaltigen Nährböden die geringste Kallusbildung (60 %) an den aufgelegten Segmenten beobachtet werden. Die Kallusbildung bei Laktose, Saccharose und Fruktose lag zwischen 72 und 75 %. Auf rhamnosehaltigen Nährböden lag die Kallusbildung (61 %) ähnlich wie bei Maltose.

* Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Studienaufenthaltes angefertigt.



Abbildung 1: Sproßbildung auf maltosehaltigem Nährboden nach 16-wöchiger Kulturdauer

Auf dem raffinosehaltigen Nährboden bildeten 69 % der Segmente Kallus, doch fand keine Sproßregeneration statt.

Auf dem fruktosehaltigen Nährboden hatten zwar 75 % der Segmente Kallus gebildet, aber nur 6 Sprosse regenerierten. Im Vergleich dazu lag die Kallusbildung auf maltosehaltigem Nährboden nur bei 60 %, aber 22 Sprosse entwickelten sich aus diesem Kallus (Abbildung 1). Laktose und Saccharose zeigten fast die gleichen Kallusbildungsraten 72 bzw. 73 %, doch regenerierten die Kalli auf laktosehaltigem Nährboden 20 und auf saccharosehaltigem Nährboden 14 Sprosse. Diese Ergebnisse stimmen in der Tendenz mit dem Bericht von Asano und Mitarbeitern (1994) überein, die ebenfalls einen positiven Effekt von Laktose und Maltose auf die Regeneration von Sprossen bei *Agrostis palustris* und Japonicareis aufzeigen konnten. Bei den beiden Arten lag die Sproßausbeute auf saccharosehaltigem Nährboden bedeutend niedriger als bei Zichorie.

Die geringe Sproßbildung (6, Tabelle 1) auf fruktosehaltigem Nährboden wird auch von Romano und Mitarbeitern (1995) bei *Quercus suber* L. beschrieben. Sie konnten ebenfalls mit ihren Ergebnissen eine gute Sproßbildungsrate auf glukosehaltigem Nährboden bestätigen. So kamen die Autoren zu dem Schluß, daß Saccharose und Glukose die geeigneten Zucker für eine gute Sproß- und Wurzelbildung sind. Die Ergebnisse bei Zichorie deuten daraufhin, daß Maltose und Laktose gefolgt von Glukose einen positiven Einfluß auf die Sproßbildung ausüben können.

Die Versuche wurden in Licht und Dunkelheit durchgeführt. Die Reaktion der Blattrippensegmente auf die zugesetzten Zucker im Nährboden war im Licht und Dunkelheit gleich, jedoch war in Dunkelheit das Auftreten des ersten Kallus um 2-3 Wochen verzögert und damit auch die Sproßbildung.

Das Auftreten des ersten Kallus, definiert durch die Anzahl der Tage seit dem

Auflegen der Explantate, hing einmal von der Größe der Explantate und dem Zucker, der dem Nährboden zugesetzt wurde, ab. Durch Vorversuche mit Saccharose (Ergebnisse werden nicht dargestellt) konnte immer wieder bestätigt werden, daß je kleiner das Explantat desto länger die Kallusinduktionsphase. Tabelle 2 zeigt aber sehr überzeugend, daß dieses Ergebnis nicht auf alle Zucker übertragen werden kann. Der Zusatz von Fruktose und Raffinose zum Nährboden führte bei kleinen Explantaten (I) zu einer schnelleren Kallusbildung (in 9 bzw. 7 Tagen), jedoch wurden 13 Tage benötigt, um auf großen Explantaten (IV) Kallusbildung erkennen zu lassen. Im Gegensatz dazu verhielten sich Laktose, Maltose, Glukose und Rhamnose wie Saccharose, wobei für das erste Erscheinen eines Kallus auf glukosehaltigem 18 und auf laktosehaltigem Nährboden nur 10 Tage benötigt wurden. Bei den Nährböden mit den restlichen Kohlenhydraten lag die Zeit bis zum Erscheinen des Kallus zwischen 11 und 14 Tagen.

In Tabelle 1 wurde dargestellt wieviel Explantate nach 8 Wochen Kallus gebildet hatten. Diese Zahlen sagen nichts über die gebildeten Kallusmengen, die sich auf den Nährböden versetzt mit unterschiedlichen Kohlenhydraten in einer Zeiteinheit (8 Wochen) gebildet hatten, aus. Die verschiedenen Kohlenhydrate übten einen nicht unerheblichen Einfluß auf die gebildete Kallusmenge aus. Auf saccharose-, glukose- und raffinosehaltigem Nährboden war eine starke Kallusbildung auf den einzelnen Explantaten zu beobachten (Abbildung 2 a), wogegen zwar 75% der Explantate auf fruktosehaltigem Nährboden Kallus bildeten, jedoch die entwickelte Kallusmenge sehr gering war (Abbildung 2 b). Der laktosehaltige Nährboden induzierte an 72 % der Segmente nur wenig Kallus, aber sehr schnell Sprosse (Abbildung 2 c).

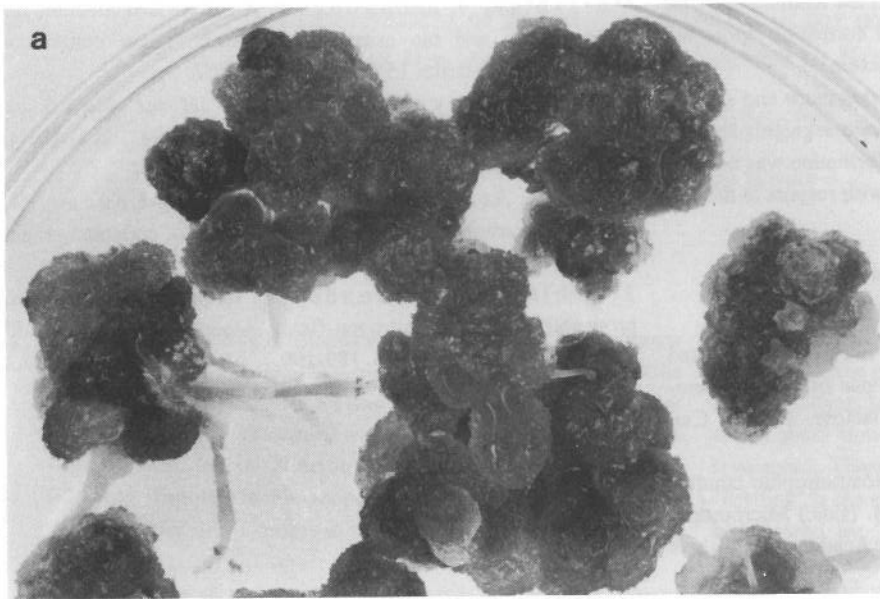
Zusammenfassung

Zichorienblattrippensegmente der Sorte "Cassel" wurden auf Nährböden, versetzt mit unterschiedlichen Zuckern, aufgelegt, wobei der Grundnährboden, ein MS-Nährboden versetzt mit 0,26 mg/L⁻¹ 6-Benzylaminopurin und 2,0 mg/L⁻¹ Indolessigsäure, bei allen Versuchen der Gleiche war. Die Nährböden enthielten 30 g/L⁻¹ eines der folgenden Zucker: Fructose, Galaktose, Glukose, Laktose, Maltose, Raffinose, Ribose, Rhamnose, Saccharose, Sorbose und Xylose.

Eine Kallusbildung konnte nicht auf allen Nährböden induziert werden. Galaktose, Sorbose, Ribose und Xylose im Nährboden führte weder zur Kallus- noch zur Sproßbildung. Auf glukosehaltigem Nährboden konnte die beste (79 %) und auf maltosehaltigem Nährboden die geringste Kallusbildung (60 %) an den aufgelegten Segmenten beobachtet werden. Die Kalli auf maltose- und laktosehaltigem Nährboden bildeten innerhalb von 8 Wochen die meisten Sprosse (22 bzw. 20 Sprosse). Das Auftreten des ersten Kallus hing einmal von der Größe der Explantate und dem ange-

Explantatgröße	Zeit (d) bis zum ersten auftreten eines Kallus						
	Fruktose	Glukose	Laktose	Maltose	Raffinose	Rhamnose	Saccharose
I	9	18	10	14	7	11	13
II	9	16	10	10	8	10	7
III	12	10	8	7	13	8	6
IV	13	9	8	5	13	7	4

Tabelle 2.: Einfluß der Explantatgröße auf die Kallusinduktionszeit



botenen Zucker ab. Der Zusatz von Fruktose und Raffinose zum Nährboden führte bei kleinen Explantaten zu einer schnelleren Kallusbildung (9 bzw. 7 Tage) als bei großen Explantaten (13 Tage). Im Gegensatz dazu bildete sich auf laktose-, maltose-, glukose-, rhamnose- sowie saccharosehaltigen Nährboden schneller auf den großen Explantaten Kallus (4-9 Tage). Die Kallusbildung korrelierte nicht mit der gebildeten Kallusmenge auf die einzelnen Zucker bezogen.

The influence of different carbon sources on callus formation and shoot proliferation of chicory (*Cichorium intybus* L. var. sativum).

The genus *Cichorium*, a member of the economically important Asteraceae family, is divided into two species, *Cichorium intybus* L. and *Cichorium endivia* L..

Cichorium intybus L. var. sativum is a potential new industrial crop for the production of inulin and fructose from its roots.

Chicory leaf vein segments of the cultivar "Cassel" were plated on a Murashige and Skoog medium supplemented with $0,26 \text{ mg/L}^{-1}$ 6 - benzylamino-purine and $2,0 \text{ mg/L}^{-1}$ indoleacetic acid. All of the culture media contained one of the following carbohydrates: fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, raffinose, ribose, rhamnose, saccharose, sorbose and xylose.

Callus formation could not be induced on all culture media. Galactose, sorbose, ribose and xylose in the culture medium led neither to callus formation nor to shoot proliferation. On a glucose containing medium 79 % and on a maltose containing medium 60 % of the leaf vein segments showed callus formation. The calli induced on maltose and lactose containing media developed after 8 weeks 22 and 20 shoots.

The appearance of the first callus depended on the size of the explant and the applied carbohydrate in the medium.

Abbildung 2: Kallus- und Sproßbildung auf Nährböden, die Raffinose (a), Fruktose (b) und Laktose (c) enthalten

The supplement of fructose and raffinose to the medium led after 9 and 7 days on small explants to callus formation while big explants needed 13 days for the callus induction.

Contrarily, on lactose, maltose, glucose, rhamnose and saccharose containing media the large sized leaf vein segments showed callus formation after 4-9 days. The callus formation was not correlated to the amount of callus production with respect to the different applied carbohydrates.

Literatur

Asano, Y., Ito, Y.; Ohara, M.; Sugiura, K. und Fujie, A.: Improved regeneration response of reeping bentgrass and japonica rice by maltose and lactose. *Plant + Cell Reports* 39 (1994), S. 101-103.

Kozai, T.: Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh, P. C., Zimmerman, R. H. (Eds.) *Micropropagation: Technology and Application*; Kluwer Academic Publishers (1991), S. 447-469.

Mix, G.: Regeneration von in vitro Pflanzen aus Blattrippensegmenten der Zichorie (*Cichorium intybus* L.). - *Landbauforschung Völkenrode* 35 (1985), S. 59-62.

Mix, G. und Schittenhelm, S.: Langzeitlagerung von Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.). - *Landbauforschung Völkenrode* 38 (1988), S. 173-177.

Murashige, T. und Skoog, F. A.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. - *Physiologia Plantarum* 15 (1962), S. 473-497.

Oka, S. und Ohya, K.: Mulberry (*Morus alba* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees I*, Springer Verlag Berlin (1986), S. 384-392.

Romano, A.; Noronha, C. und Martins-Loucao, M. A.: Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40 (1995), S. 159-167.

Tremblay, F. und Lalonde, M.: Requirements for in vitro propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 3 (1984), S. 189-199.

Verfasser: Mix-Wagner, Gunda, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Komm. Leiter: Dir. u. Prof. Dr. F. Weißbach;

Gailing, Oliver, Dipl.-Biol., Marktstraße 118 a, 44803 Bochum.