

Einsatz der Kryokonservierung als Routinemethode für die Erhaltung alter Kartoffelsorten

ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR, ELLRUTH MÜLLER und GUNDA MIX-WAGNER

Institut für Pflanzenbau

1 Einleitung

Sammlungen pflanzengenetischer Ressourcen sind besonders von Mittelkürzungen betroffen, da sie bedingt durch die Routinearbeiten nur wenig Drittmittel erhalten. Weil sich die Einsparungen ganz besonders im Personalbereich bemerkbar machen, gibt es nur die Alternativen entweder die Sammlung zu verkleinern oder arbeitssparendere Methoden einzusetzen.

Eine Sammlung von vegetativ zu vermehrende Arten wie die Kartoffel ist sehr arbeitsintensiv, selbst wenn sie als In-vitro-Pflanzen mit reduziertem Wachstum gelagert werden, denn die Pflanzen müssen in bestimmten Abständen auf frisches Nährmedium umgesetzt werden. Gerade für die Sorten, die nur selten oder überhaupt nicht nachgefragt werden, ist es unumgänglich, kostengünstigere Lösungen für die Langzeitlagerung zu suchen. Eine Alternative könnte die Kryokonservierung sein.

In einem gemeinsamen Projekt vom Institut für Pflanzenbau und der DSMZ Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH wurde eine Einfriermethode entwickelt, die sich für den Routineeinsatz in einer Sammlung pflanzengenetischer Ressourcen eignen könnte (Schäfer-Menuhr et al., 1994). Mit dieser Methode sind inzwischen mehr als 200 alte Kartoffelsorten und Genotypen eingefroren worden und lagern in flüssigem Stickstoff. Die Erfahrungen, die mit dieser Methode im praktischen Einsatz gewonnen wurden, werden im Folgenden wiedergegeben.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Die Sorten und Genotypen, die für die Einfrierversuche verwendet wurden, stammen ausschließlich aus der "living collection" des Instituts für Pflanzenbau, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL).

2.2 Kryokonservierung

Die Einfriermethode ist im Detail beschrieben worden (Schäfer-Menuhr et al., 1994). Im Folgenden werden deshalb nur das Prinzip der Methode und die Routine beschrieben, mit der die Sorten in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert werden.

Der Einfriervorgang ist mit einer Einfrierrate von circa -2.400 grd/min vom Typ ultra-schnellem Einfrieren. Dazu werden die getrimmten Sproßspitzen in 2,5 µl große Tropfen Frostschutzmittel, die auf Aluminiumstreifen pipettiert wurden, gelegt. Die Streifen werden zum Einfrieren in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Verwendung von Aluminiumstreifen als Träger hat neben der

hohen Wärmeleitfähigkeit zwei weitere praktische Vorteile. Der erste Vorteil ist, daß die Sproßspitzen mit einer Rate von circa 3.000 grd/min ultra-schnell aufgetaut werden können, indem die Folien in flüssiges Medium geworfen werden. Der zweite Vorteil ist, daß die Folien zwecks Langzeitlagerung leicht in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt werden können.

Zum routinemäßigen Einfrieren werden 12-20 Sorten auf MS Medium auf eine Stärke von 100-200 In-vitro-Pflanzen/Sorte vermehrt. In jedem Einfrierversuch werden 100-150 Sproßspitzen/Sorte eingefroren und in Portionen von 12 Sproßspitzen/Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Von jedem Einfrierversuch wird eine Wachstumskontrolle durchgeführt, für die 12 Sproßspitzen aufgetaut und in dem bei To will (1983) beschriebenen Medium kultiviert werden. Für alle Sorten und Genotypen wird das gleiche Medium verwendet. Der Einfrierversuch wird für jede Sorte zweimal wiederholt. Insgesamt werden von einer Sorte etwa 30 Kryoröhrchen (= 360 Sproßspitzen) gelagert, die aus drei voneinander unabhängigen Einfrierversuchen stammen.

2.3 Temperaturmessung

Für Temperaturmessungen während des Einfriervorgangs und notwendigen Manipulationen bis die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert sind, wurde das Tasto Therm MP 1300 Memo Meßinstrument (Impac Electronic GmbH) mit dem Fühler BT 1301d verwendet. Für die Messungen wurde der Thermofühler in eine getrimmte Sproßspitze, die in Kryolösung vorinkubiert war, geschoben und der Einfriervorgang und die weiteren Arbeitsschritte simuliert. Die kälteste Temperatur, die in flüssigem Stickstoff gemessen werden konnte, lag zwischen -194,4 °C und -194,8 °C.

2.4 Überprüfung des Phänotyps

Von den 98 Sorten, die zur Überprüfung des Phänotyps und weiteren Analysen ausgepflanzt wurden, wurden die Wachstumskontrollen wöchentlich auf beginnende Pflanzenbildung überprüft. Sprosse oder Pflanzen wurden bei einer Länge von etwa 1 cm auf hormonfreies MS Medium in Petrischalen mit 6 cm Durchmesser umgesetzt. Bei einer Größe von 3 cm wurden sie in größere Gefäße umgepflanzt. Wenn sich die Pflanzen gut entwickelt hatten, wurden sie über Nodien vermehrt. Entsprechend wurden die Ausgangspflanzen, die nicht eingefroren waren, behandelt. Die Pflanzen aus den eingefrorenen Sproßspitzen und die Kontrollpflanzen wurden in 18 cm Töpfe ausgepflanzt und in Phytokammern bei 23 °C, 16 h Licht, kultiviert. Während der ersten 2 Wochen wurden sie mit durchsichtigen Plastikbechern vor dem Austrocknen geschützt. Während des Wachstums und

nach der Ernte wurden die regenerierten Pflanzen einer Sorte mit der entsprechenden Kontrollpflanze verglichen und zur Dokumentation fotografiert. Von 32 Sorten wurden die Knollen ein zweites Mal ausgelegt.

2.5 Durchflußcytometrische Bestimmungen

Bei 20 ausgepflanzten Sorten wurde der Ploidiegrad durch durchflußcytometrische Messungen der Zellkerne von Pflanzen im Stadium des beginnenden Knollenansatzes bestimmt. Zur Freisetzung der Zellkerne wurden, wie bei de Laat et al. (1987) beschrieben, Blätter von den entsprechenden Pflanzen in einer Petrischale in dem Isolations- und Färbepuffer (Partec) mit einer Rasierklinge zerhackt. Der Puffer enthält den Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Der Rohextrakt wurde zur Entfernung größerer Partikel durch Filter mit 100 µm Poren filtriert. Das Filtrat, das die Zellkerne enthält, wurde bis zur Messung in Eis gelagert. Die Proben wurden mit einem FAC Star-Plus Durchflußcytometer (Becton-Dickinson) im Institut für Kulturpflanzenforschung in Gatersleben analysiert. Das Gerät wurde für die Messung mit Testbeads geeicht und der Peakkanal für die Kontrollpflanze auf den Wert 200 eingestellt.

2.6 RFLP-Analyse

Die RFLP-Analysen wurden mit Blättern von denselben Pflanzen, von denen der Ploidiegrad bestimmt wurde und noch 3 weiteren Sorten, bei denen die Knollen ein zweites Mal ausgelegt waren, durchgeführt. Die Extraktion der DNA aus den Blättern wurde nach der Methode von Saghai-Maroo et al. (1984) mit den Modifikationen von Schweizer (1990) durchgeführt. Die gefrorenen Blätter (-196 °C) wurden in einem Mörser zerkleinert und mit vorgewärmtem CTAB-Puffer (2 % w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2 % 2-Mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) extrahiert. Nach 30 min Inkubation bei 60 °C in einem Schüttelwasserbad, wurde der Extrakt mit 1 Volumen Chloroform ausgeschüttelt und 10 min bei 10.000xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 0.6 Volumen kaltem Isopropanol gemischt. Die ausgefällten Nucleinsäuren wurden durch Zentrifugieren bei 10.000xg für 10 min gesammelt und zunächst mit 76 % Ethanol, der 10 mM Ammoniumacetat enthielt, gewaschen und danach mit 70 % Ethanol. Nach Trocknen im Luftstrom wurden die Nucleinsäuren in TE Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) gelöst.

Für den Restriktionsverdau wurde in einem 30 µl Ansatz 20 µg DNA mit 10 U Dra I (Boehringer) in Puffer M (Boehringer), der 4 mM Spermidin enthielt, über Nacht bei 37 °C verdaut. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 µl Stoppmix beendet und wurde bis zur elektrophoretischen Trennung bei -20 °C gelagert.

Die Fragmente wurden auf 0.9 %igen Agarosegelen in NEB-Puffer (100 mM Tris, 12.5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8.1) getrennt. Nach dem Lauf erfolgte eine Depurinisierung der DNA im Agarosegel mit 0.25 N HCl. Die Denaturierung wurde in 0.5 M NaOH, die 1.5 M NaCl enthielt, durchgeführt. Nach einer Neutralisierung in 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0, mit 0.5 M NaCl wurde die DNA auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond N, Amersham) mit einer Vakuumblotapparatur (VacuGene, Pharmacia)

übertragen. Der Transferlösung war 1 M Ammoniumacetat. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung für 2 sec bei 302 nm fixiert.

Die Hybridisierung wurde mit den digoxigen-markierten Oligonucleotide GATA4 und GACA4 nach dem vom Hersteller Fresenius-Diagnostik (1993) angegebenen Protokoll durchgeführt. Der Nachweis der Banden auf der Membran erfolgte durch Enzym-Immunoassay und Nachweis der Chemolumineszenz mit dem Dig-Luminescent-Detection Kit (Boehringer) oder einer Enzym-katalysierten Farbreaktion mit dem Dig-Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer). Die Nachweise wurden nach den den Kits beiliegenden Protokollen durchgeführt.

Von einigen Membranen wurden die Sonden abgewaschen (strippen) und mit einem zweiten Oligonucleotid hybridisiert. Dazu wurde die Membran zweimal für 15 min in 0.4 M NaOH bei 40 °C inkubiert, anschließend zweimal für 15 min bei 45 °C in 0.1 x SSC, 0.1 % SDS, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5 und danach 30 min bei Raumtemperatur in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 % SDS, pH 7.5-8.0. Die daran anschließende Hybridisierung wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt.

2.7 Abkürzungen

CTAB: Cetyl-trimethylammoniumbromid; DAPI: 4'-6'-Diamidino-2-Phenyl-Indol; DNA: Desoxyribonucleinsäure; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; GACA4: Polynucleotid, in dem die Sequenz der Basen Guanin, Adenin, Cytosin und Adenin viermal wiederholt ist; GATA4: entsprechendes Polynucleotid mit der Basensequenz Guanin, Adenin, Thymin und Adenin; HCl: Salzsäure; MS-Medium: Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962); NaCl: Natriumchlorid; NaOH: Natronlauge; RFLP: Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus; SDS: Natriumlaurylsulfat; SSC: 25 mM Natriumcitratpuffer, pH 7.0, der 0.15 M NaCl enthält; Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Anforderungen an eine Einfriermethode in einer Genbankroutine liegen auf der Hand:

1. Die eingefrorenen Gewebeteile müssen nach dem Auftauen wieder Pflanzen regenerieren.
2. Die Sorteneigenschaften müssen erhalten bleiben (genetische Stabilität).
3. Die Methode muß so einfach sein, daß technisches Personal sie nach kurzer Anleitung ausführen kann.
4. Der Probendurchsatz muß hoch genug sein, damit genügend viele Sorten eingefroren werden können, um eine Einsparung an Personal bei der konventionellen Lagerung (In-vitro-Kultur) zu ermöglichen.
5. Das Lagerungssystem muß so beschaffen sein, daß auch noch in weiter Zukunft die Röhrchen für eine bestimmte Sorte gefunden werden.
6. Letztlich entscheidend ist der Kostenfaktor.

3.1 Erfahrungen mit der Einfriermethode im Routineeinsatz

- 3.1.1 Auswertung der Wachstumskontrollen von 150 Sorten
Mit der ultra-schnellen Einfriermethode wurden inzwischen

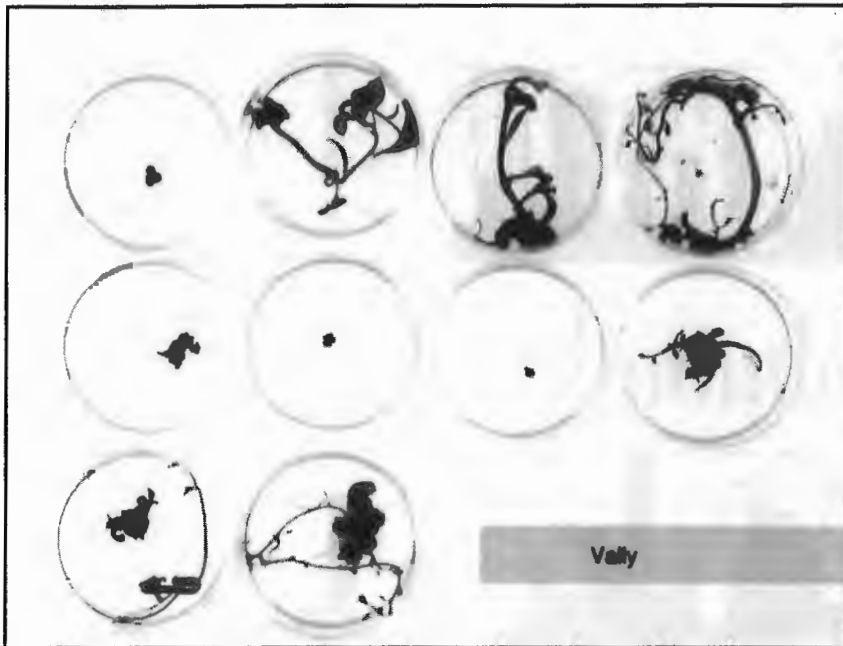


Abbildung 1: Wachstumskontrolle der Sorte Vally
3 Monate nach dem Auftauen

mehr als 200 Sorten eingefroren und gelagert. Das sind mehr als 50.000 Sproßspitzen. Da bei den Wachstumskontrollen besonders im Hinblick auf die Pflanzenregeneration erst nach einigen Wochen die entgültigen Zahlen vorliegen, werden im Folgenden nur die Zahlen von den ersten 150 eingefrorenen Sorten und Genotypen berücksichtigt.

Abbildung 1 zeigt eine Wachstumskontrolle der Sorte Vally. Die Aufnahme wurde 3 Monate nach dem Auftauen angefertigt. Alle 10 aufgetauten Sproßspitzen haben überlebt. Die 3 Pflanzen in der oberen Reihe wurden innerhalb des ersten Monats gebildet. Die übrigen 3 Pflanzen regenerierten zu einem späteren Zeitpunkt und sind zarter. Nach unseren Erfahrungen würden sich auch diese Sprosse zu kräftigen Pflanzen entwickeln, wenn sie in frisches Nährmedium umgesetzt würden. Für eine praktische Anwendung würde man die drei kräftigen Sprosse (oberste Reihe) frühzeitig auf Nähragar setzen und vermehren. So würden in einer verhältnismäßig kurzen Zeit kräftige, gesunde Pflanzen erhalten.

Aus den Wachstumskontrollen wurde berechnet, wie hoch die Überlebens- und Pflanzenbildungsraten der einzelnen Sorten sind. Da für die Wachstumskontrollen nur 10-12 Sproßspitzen aufgetaut werden, sind die ausgerechneten Prozentzahlen eher als Näherung und nicht als statistisch abgesicherte Werte zu betrachten. Die Prozentzahlen sowohl für die Überlebensrate (hellgrau) als auch für die Pflanzenbildung (dunkel) sind in Abbildung 2 graphisch dargestellt. Die Prozentzahlen repräsentieren den Mittelwert aus den drei unabhängig durchgeführten Einfrierversuchen. Die Überlebensrate ist bei den meisten Sorten sehr hoch. Die Durchschnittswerte von 150 Sorten ergaben, daß durchschnittlich 82 % der Sproßspitzen das Einfrieren und Auftauen überleben (Tabelle 1). Wichtiger als die Überlebensrate ist für die praktische Anwendung die Pflanzenregeneration. Selbst wenn man ein und dasselbe Regenerationsmedium, das für einige Sorten nicht optimal ist, einsetzt, wurden von allen Sorten wieder Pflanzen erhal-

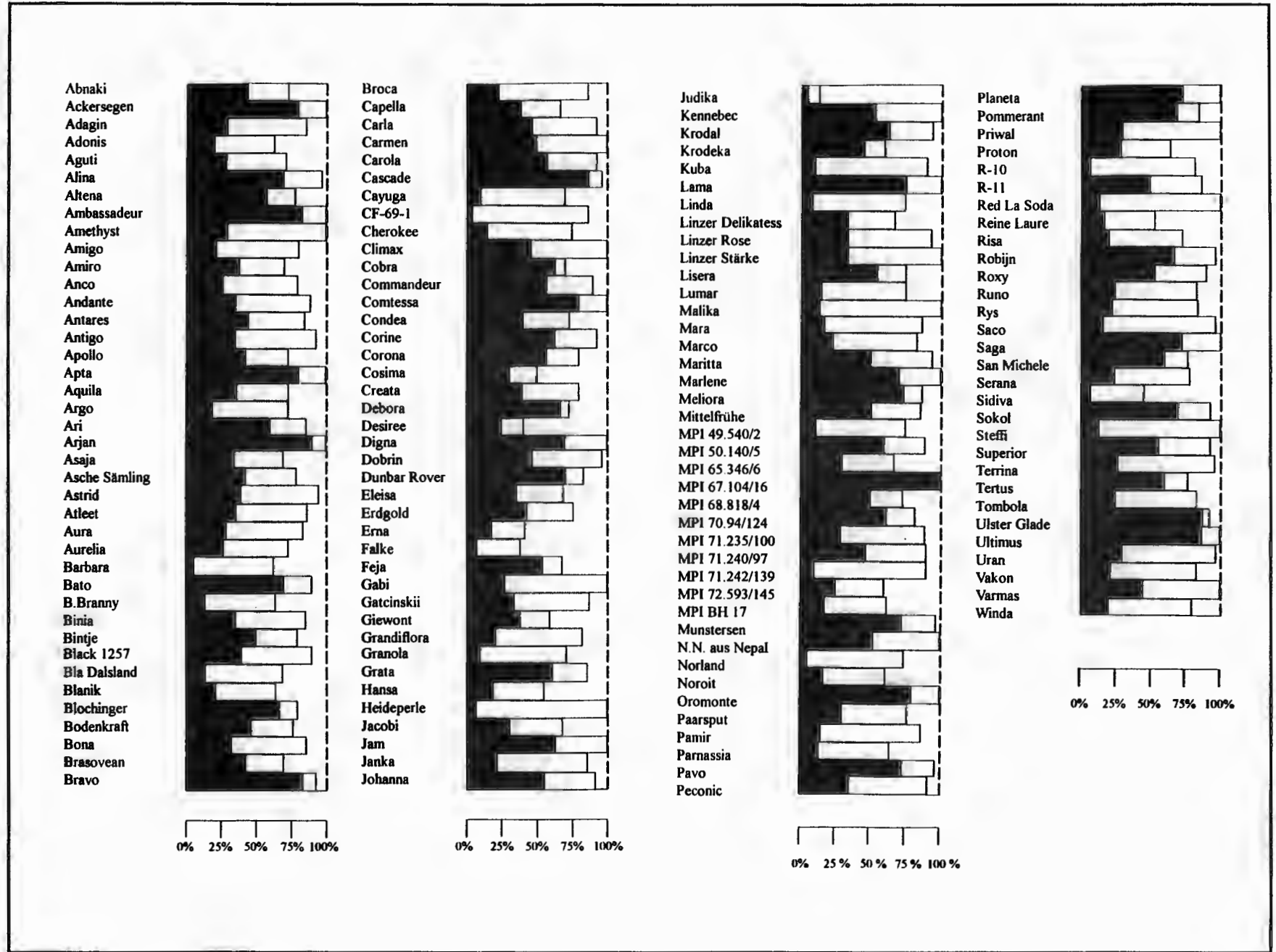
ten. Im Durchschnitt liegt die Pflanzenregenerationsrate bei fast 41 % (Tabelle 1). Bei Sorten, die auf diesem Medium schlecht Pflanzen regenerieren, kann die Pflanzenregeneration durch andere Medien mit unterschiedlicher Konzentration und/oder Kombination an Phytohormonen gesteigert werden (Schäfer-Menuhr et al., 1994). Ein einfacherer und billigerer Weg ist es jedoch, bei solchen Sorten Sproßspitzen aus mehreren Kryoröhrchen aufzutauen. So würde man auf jeden Fall kräftige Pflanzen erhalten.

Bei der Einführung einer alternativen Methode für die Langzeitlagerung muß zu irgendeinem Zeitpunkt die Entscheidung gefällt werden, ab wann die Zweigleisigkeit (In-vitro-Kultur und Kryokonservierung) zu Gunsten der einen oder anderen Methode aufgegeben werden kann. Bei dieser Überlegung ist zu bedenken, daß es sich bei dem Ausgangsmaterial um geklontes Material handelt, das über Jahre über einige wenige Knollen oder In-vitro-Pflanzen vermehrt worden ist. Für dieses Material erscheint es

ausreichend, wenn einige Pflanzen von den eingefrorenen Proben regeneriert werden, solange der Sortenerhalt gewährleistet ist und die Pflanzen genetisch identisch sind. In Abbildung 3 ist die Anzahl der Sorten dargestellt, die in bestimmten Prozentbereichen Pflanzen regenerieren. Die Auswertung wurde so angelegt, daß eine Sorte mit einer Pflanzenregenerationsrate von 59,96 % in dem Bereich 50-60 % registriert wurde und in dem Bereich 60-70 % wenn rein rechnerisch der Wert 60,00 ermittelt wurde, obwohl praktisch gesehen kein Unterschied besteht. Man kann davon ausgehen, daß eine Pflanzenregenerationsrate von 30% nicht nur ausreichend für den Erhalt der Sorte, sondern auch ausreichend für eine eventuelle Abgabe sind, da die Pflanzen innerhalb kurzer Zeit in vitro vermehrt werden können. Wie Abbildung 3 klar zeigt ist das für 94 der 150 ausgewerteten Sorten der Fall. Von den 56 Sorten, die Pflanzenregenerationsraten unter 30 % haben, können, wie schon oben beschrieben, die Sproßspitzen von mehreren Röhrchen aufgetaut werden.

Wie Abbildung 2 zu entnehmen ist, ist die Pflanzenregeneration stark sortenabhängig (Schäfer-Menuhr et al., 1994). Dieses Phänomen ist in der Gewebekultur seit langem bekannt. Schon zu dem Zeitpunkt, als die alten Sorten in die "living collection" überführt wurden, wurden Sortenunterschiede bei der Zeitspanne, die die Sorten in vitro lagern können, beobachtet (Mix, 1984). Es erschien interessant zu überprüfen, ob eventuell eine Korrelation zwischen Regenerationsfreudigkeit und der Länge der Zeit besteht, die die Sorten als In-vitro-Kulturen erhalten wurden. Anhand der BGRC-Nummern (Mix-Wagner und Seidewitz) wurden 2 Gruppen gebildet (Tabelle 1). In der ersten Gruppe, sind die Durchschnittswerte von den Sorten gemittelt, die mit der BGRC-Nummer 03... beginnen. Mit diesen Sorten ist die In-vitro-Sammlung vor etwa 20 Jahren begonnen worden. Die zweite Gruppe umfaßt die Sorten, die mit der BGRC-Nummer 06... beginnen. Diese Sorten sind weniger als 10 Jahre in der In-

Abbildung 2: Überlebens- und Pflanzenregenerationsraten von 150 Sorten
Überlebensraten hell, Pflanzenbildung dunkel



		Überleben	Pflanzen
Gesamt	(150)	82,3 %	40,7 %
BGRC 03....	(73)	82,1 %	43,1 %
BGRC 06....	(49)	80,4 %	39,5 %
MPI-Stämme	(11)	79,7 %	40,3 %

Anzahl der ausgewerteten Sorten in Klammern

vitro-Sammlung. Als dritte Gruppe wurden die Daten von den MPI-Stämmen ausgewertet. Diese Stämme sind Züchtungen vom Max-Planck-Institut in Köln und enthalten im Pedigree ein breites Spektrum der verschiedensten Vorfahren wie Wildformen und Haploide.

Die Prozentzahlen in Tabelle 1 zeigen ganz klar, daß es für die Pflanzenregeneration nach dem Einfrieren keine Rolle spielt, wie lange die Sorten in der "living collection" waren. Dieses Ergebnis ist ein guter Hinweis dafür, daß das verwendete In-vitro-System sowohl die Vitalität als auch die sortentypischen Eigenschaften länger als 20 Jahre erhält. Die Ergebnisse, die mit den MPI-Stämmen erhalten wurden, zeigen, daß die Methode nicht nur für Sorten, sondern auch für Zuchtstämme geeignet ist, in die Wildtypen eingekreuzt wurden.

3.1.2 Lagerungsdauer

Die Experimente laufen noch nicht lange genug, um vorhersagen zu können, wie lange man die Sorten in flüssigem Stickstoff lagern kann. Wir haben Sproßspitzen von verschiedenen Sorten wieder aufgetaut, die unterschiedlich lange in flüssigem Stickstoff gelagert waren. Nach 3 Jahren Lagerung waren die Überlebensraten und die Pflanzenregeneration vergleichbar mit den Ergebnissen, die von den Wachstumskontrollen direkt nach dem Einfrieren erhalten wurden.

Prozent	Sorten mit Pflanzenbildung	
00 - 10		10
10 - 20		20
20 - 30		26
30 - 40		23
40 - 50		17
50 - 60		17
60 - 70		14
70 - 80		12
80 - 90		10
90 - 100		1
		150

Abbildung 3: Aufschlüsselung der Sorten nach ihrer Pflanzenregeneration in Prozentbereichen

3.1.3 Einige praxisrelevante Ergebnisse

Obwohl diese Methode einen hohen Probendurchsatz hat, zeigen sich im Routineeinsatz ganz klar Grenzen. Wenn eine Person den ganzen Arbeitsaufwand inklusive Vermehrung der In-vitro-Pflanzen bewältigen muß, kann diese Arbeitskraft im Jahr 50 Sorten einfrieren, umgerechnet auf 500 Sorten wären das 10 Jahre. Bei zwei Personen, die nicht gleichzeitig Urlaub machen, ist die Bilanz schon wesentlich günstiger. 150 Sorten ist eine durchaus realistische Zahl, wodurch der Zeitaufwand für das Einfrieren von 500 Sorten auf 3-4 Jahre reduziert werden würde.

Im Verlauf der Einfrierarbeiten wurden Erfahrungen bei der Einlagerung der Proben in flüssigem Stickstoff gemacht. Die Lagerung der eingefrorenen Proben muß so erfolgen, daß auch nach langer Lagerungszeit die eingefrorenen Proben problemlos gefunden werden. Wie früher beschrieben (Schäfer-Menuhr et al., 1994) werden die auf Aluminiumfolie eingefrorenen Spitzen in Kryoröhrchen überführt, die sorgfältig mit dem Namen der Sorte, BGRC Nummer und Einfrierdatum beschriftet werden. Während des Umfüllens der Folien in die Kryoröhrchen und Einsortierens in den Lagertank muß gewährleistet sein, daß weder die einzusortierenden Röhrchen, noch die Schublade, in die einsortiert wird, noch die übrigen 7 Schubladen in der Halterung des Lagertanks einer kritischen Temperatur ausgesetzt werden. Als kritisch ist eine Temperatur von -130 °C und höher anzusehen, da es ab dieser Temperatur zur Umlagerung von Eiskristallen kommen kann, die die Zellstrukturen irreversibel zerstören können.

Diese beiden Überführungsschritte, bei denen die eingefrorenen Proben der Luft ausgesetzt werden, wurden mit einem Temperaturfühler untersucht. Für die Messungen wurde der Thermofühler in eine getrimmte Sproßspitze, die in Kryolösung vorinkubiert war, geschoben und die weiteren Arbeitsschritte simuliert. Weil der Thermofühler bei den Manipulationen hinderlich war, dauerten die Arbeitsgänge etwas länger als gewöhnlich. Bei der Verteilung der Aluminiumstreifen auf die vorgekühlten Kryoröhrchen wurde bei 15 voneinander unabhängige Versuchen die jeweils höchste Temperatur aufgezeichnet. Sie lag im Durchschnitt bei -190.1 °C, wobei -181.9 °C der wärmste gemessene Wert war.

Der zweite kritische Schritt ist das Einräumen der Röhrchen in die Lagertanks. Die Röhrchen lagern in der flüssigen Stickstoffphase. Wenn Röhrchen entnommen oder eingelagert werden, wird die Halterung mit den Schubladen aus dem Tank gehoben, die Schublade entnommen, in einen Styroporbehälter mit flüssigem Stickstoff gesetzt und die Halterung sofort wieder in den Lagertank zurückgestellt. Bei diesem Vorgang besteht keine Gefahr, daß sich die Proben erwärmen könnten, da sowohl die Schubladen als auch die Röhrchen flüssigen Stickstoff enthalten. Daß es auch bei dem Einsortieren der Röhrchen nicht zu unerwünschter Erwärmung kommt, wurde mit dem Thermofühler nachgewiesen. Selbst nach 5 min Standzeit war die Temperatur in dem Styroporbehälter nicht höher als -194 °C angestiegen. Da in der Regel dieser Arbeitsschritt schneller ausgeführt wird, besteht keine Gefahr einer Erwärmung.

In diesem Zusammenhang ist auch ein anderes äußerst wichtiges Detail zu nennen und zwar daß die Röhrchen in die vorher für sie bestimmten und dokumentierten Positionen eingesetzt werden.

Ein nachträgliches Umräumen, wie es bei Sammlungen von Samen durchaus möglich ist, ist praktisch nicht durchführbar, da alle Manipulationen in flüssigem Stickstoff durchgeführt werden müssen.

3.2 Überprüfung der genetischen Stabilität

Eine wichtige Entscheidungsgrundlage, ob die Kryokonservierungsmethode für die Langzeiterhaltung von Kartoffelsorten geeignet ist, ist die genetische Stabilität. Es ist eine Definitionssache wie eng oder wie weit man den Begriff genetische Stabilität faßt. Wird er sehr eng definiert, in dem Sinn 100 %ige genetische Identität, müßte die gesamte DNA sequenziert werden, was weder praktikabel noch sinnvoll ist. Vom Anwendungskonzept her sollte man den Begriff weiter fassen, indem man fordert, daß die Erhaltung der Sorte für einen eventuell späteren Einsatz in der Züchtung garantiert werden soll.

Wenn man eine neue Methode für die Langzeitlagerung einsetzt, werden von Kritikern leicht strengere Maßstäbe angesetzt als für die ursprünglich verwendeten Methoden. Ein Schlagwort ist die "somaclonale Variation" (Larkin und Scrowcroft, 1980), bei der mit einer größeren Häufigkeit anormale Kartoffelpflanzen gefunden worden sind, die aus Protoplasten regeneriert worden waren. In den meisten Fällen waren sie außerhalb der Petrischale nicht überlebensfähig. Die, die man auspflanzen konnte, unterschieden sich häufig nur wenig von der Mutterpflanze, sodaß es sich auch um klonale Varianten handeln könnte, die schon seit der Jahrhundertwende beschrieben wurden und mit dem Auftreten der "somaclonalen Varianten" weitgehend aus der Literatur verschwunden sind (Sanford et al., 1983).

Die Meristemkultur ist für die schnelle Vermehrung und Viruseliminierung bei Kartoffeln eine generell akzeptierte In-vitro-Technik (Hu und Wang, 1983). Da auch bei der hier beschriebenen Kryokonservierungsmethode Meristeme eingefroren und nach dem Auftauen kultiviert werden, ist der Regenerationsprozeß ein anderer als bei der Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten, bei denen verstärkt "somaclonale Varianten" gefunden wurden. Varianten clonaler oder somaclonaler Art können jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die Entwicklung von Pflanzen aus wieder aufgetauten Sproßspitzen dauert in den meisten Fällen länger als wenn nichteingefrorene Spitzen kultiviert werden. Bei den aufgetauten Sproßspitzen verdicken sich die das Meristem umhüllenden Blattreste im frühen Stadium der Kultur. Abhängig vom Genotyp kann sich aus den verdickten Blattresten innerhalb weniger Tage Callus entwickeln, wodurch es schwierig wird, die weitere Entwicklung des Meristems zu beobachten. Der Beginn der Sproßentwicklung ist gewöhnlich nicht zu sehen. Trotz wiederholter durchgeführter mikroskopischer Untersuchungen konnte nicht analysiert werden, aus welchen Gewebeteilen der Sproß regeneriert wurde. Mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit spielen somatische Embryonen bei der Pflanzenregeneration keine Rolle, da nie ein somatischer Embryo entdeckt wurde und die Kulturdauer für die Bildung somatischer Embryonen zu kurz war. Die Entwicklung eines einmal induzierten Sprosses erfolgt sehr schnell. Häufig findet eine spontane Bewurzelung statt. Vielfachsproßbildung wurde häufiger beobachtet als bei nichtein-

gefroren Kontrollen. Selbst Pflanzen, die nach langer Kulturzeit gebildet wurden, entwickelten sich in den meisten Fällen gut, wenn sie auf frisches Nährmedium umgesetzt wurden. In-vitro-Pflanzen, die stark von der Norm abwichen, wie Albinopflanzen, wurden nicht gefunden.

Eine nähere Untersuchung der In-vitro-Pflanzen reicht nicht aus, um sicherzustellen, daß die sortentypischen Eigenschaften bei der Kryokonservierung erhalten bleiben. Der beste Nachweis, gerade mit Hinblick auf eine spätere Verwendung der Sorten in der Züchtung, wird erhalten, wenn die In-vitro-Pflanzen getopft und in ihrer Entwicklung bis zur Knollenernte verfolgt werden. Da es bei diesen Untersuchungen nicht darum geht, Sorten zu identifizieren, kann dabei auf eine aufwendige Bonitur verzichtet werden.

3.2.1 Phänotyp

Zunächst einmal wurde der Phänotyp von wiederangewachsenen Pflanzen von 98 Sorten mit den entsprechenden Kontrollpflanzen verglichen. Von 32 Sorten wurden die Knollen ein zweites Mal ausgelegt. Es gab nur sehr wenige In-vitro-Pflanzen, bei denen das Wurzelsystem so schwach entwickelt war, daß sie das Austopfen und die routinemäßige Aufzucht nicht überlebten. Fünf Pflanzen wuchsen kümmerlich und hatten entweder keine Knollen oder sehr wenige kleine Knollen. Eine Pflanze war möglicherweise polyploid. Alle anderen Pflanzen entsprachen weitgehend im Phänotyp den Kontrollpflanzen.

Die Auspflanzversuche zeigen ganz klar, daß die sortentypischen Eigenschaften durch den Einfriervorgang nicht verloren gehen. Auch wenn ein sehr geringer Anteil an regenerierten Pflanzen nicht die notwendige Vitalität hatten, bedeutet es in keinem Fall, daß diese Pflanzen an Züchter abgegeben worden wären, denn die verminderte Vitalität war schon im In-vitro-Stadium erkennbar. Diese Pflanzen waren nur kultiviert worden, um Versuchsmaterial zu erhalten.

Zwar ist die Evaluierung des Phänotyps eine allgemein akzeptierte Methode, Varianten bei Kartoffelsorten zu identifizieren und eliminieren, dennoch besteht die Möglichkeit, daß unter den "normal" erscheinenden Regeneraten verdeckte Varianten sein könnten. Dazu wurde in 20 Sorten der Ploidiegrad durch durchflußcytometrische Untersuchungen bestimmt und von 23 Sorten DNA-fingerprints mit denen der Kontrollpflanzen verglichen.

3.2.2 Ploidiegrad

Die genaueste Methode, den Ploidiegrad zu bestimmen, ist das Zählen der Chromosomen in Wurzelspitzen. Weniger genau, aber im allgemeinen ausreichend kann der Ploidiegrad durch Vergleich der Stomatalängen oder Zahl der Chloroplasten in den Schließzellen bestimmt werden. Eine relativ neue Methode, den Ploidiegrad zu bestimmen, ist die Durchflußcytometrie. Die Messungen werden an isolierten Zellkernen vorgenommen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt werden. Die gebundene Farbstoffmenge ist linear proportional zur Fluoreszenzintensität, die von dem Detektor gemessen wird. Zellkerne mit verschiedenen DNA-Gehalten können so unterschieden werden und damit auch gleichzeitig der Ploidiegrad bestimmt werden.

Von de Laat et al. (1987) ist eine einfache Methode beschrieben worden, bei der frische Blätter in der Färbelösung mit einer Rasierklinge zerkleinert werden. Die so freigesetzten Zellkerne werden durch Absieben von größeren Blattresten gereinigt und können sofort gemessen werden. Das Durchflußcytometer wird für den verwendeten Farbstoff DAPI kalibriert. Der Peakkanal wird auf einen willkürlich festgesetzten Wert eingestellt, so daß die zu erwartenden Meßwerte in einem gut auswertbaren Meßbereich liegen. Die Meßwerte sind somit Relativwerte. Der relative DNA-Gehalt entspricht dem DNA-Gehalt einer tetraploiden Kartoffelzelle. Da eine tetraploide Pflanze sowohl Zellkerne in der G0/G1-Phase (4C) enthält als auch je nach Gewebetyp Zellkerne in der G2/M-Phase (8C), werden gewöhnlich 2 Peaks erhalten, wobei der zweite in einem doppelt so hohen Peakkanal gemessen wird. Für Blattmaterial ist charakteristisch, daß der zweite Peak etwa 5-10 % des ersten Peaks beträgt. Wenn höhere Ploidiegehalte vorhanden sind, ist der 2. Peak größer und zusätzlich tritt ein dritter Peak in einem doppelt so hohen Peakkanal auf. Bei Peaks, die in Kanälen außerhalb einer geometrischen Reihe registriert werden, ist mit aneuploiden Zellkernen zu rechnen.

Für die durchflußcytometrischen Untersuchungen von den regenerierten Pflanzen aus eingefrorenen Sproßspitzen wurden Blätter von ausgewachsenen Pflanzen verwendet, die zum Zeitpunkt des Knollenansatzes abgeschnitten wurden. Von denselben Individuen wurden die DNA-fingerprints angefertigt. Die Pflanzen wurden bis zur Reife weiter kultiviert, die Knollen geerntet und mit denen der Kontrollpflanzen verglichen. Insgesamt wurden die Blätter von 194 Proben untersucht.

Schon bei den ersten Messungen wurde klar, daß sich die Methode, die an sich für die Analyse von Sämlingen und Jungpflanzen (de Laat et al., 1987) beschrieben wird, nicht für Blätter von ausgewachsenen Pflanzen eignet. Die Ursache dafür

könnte in einer schlechteren Anfärbbarkeit der physiologisch älteren Zellkerne mit DAPI liegen oder durch eine andere Fluoreszenzverteilung in vergrößerten Zellkernen verursacht werden (Keller, persönliche Mitteilung).

Die Problematik wird deutlich, wenn man die Diagramme für zwei der Kontrollpflanze in Abbildung 4 vergleicht. Die Diagramme in der oberen Reihe stammen von ein und derselben Kontrollpflanze der Sorte Linzer Stärke. Für das linke Diagramm wurde ein junges, aber schon entfaltetes Blatt analysiert. Der erste Peak wurde im Peakkanal 211 registriert. Beim doppelt so hohen Peakkanal liegt der zweite kleinere Peak, der relativ breit ist. Das rechte Diagramm stammt von einem älteren, aber noch nicht gelben Blatt von derselben Pflanze. Der "erste Peak" wurde im Peakkanal 136 registriert. Davor ist ein fast gleich hoher Peak zu sehen, der wie mikroskopisch nachgewiesen wurde, aus fluoreszierenden Bruchstücken bestand. Der kleinere Peak im doppelt so hohen Peakkanal des "ersten Peaks" enthält wahrscheinlich die Zellkerne in der G2/M-Phase. Ein dritter Peak, der höhere Ploidien anzeigen würde, wurde nicht registriert.

Die Meßwerte für eine andere Kontrollpflanze (Sorte Uran) sind in der unteren Reihe von Abbildung 4 dargestellt, links von der getopften Pflanze, rechts von der In-vitro-Pflanze. Beide Diagramme zeigen klare scharfe Peaks für die Zellkerne in der G0/G1-Phase und einen zweiten kleineren Peak in dem doppelt so hohen Peakkanal. Vergleicht man die Mediane der ersten Peaks, so liegt der Median mit 277 für die In-vitro-Pflanze höher als der mit 200 berechnete Median für die ausgetopfte Pflanze. Diese Art der Verschiebung wurde auch bei anderen Kontrollpflanzen gefunden und entspricht den Beobachtungen von Keller (persönliche Mitteilung) für Allium.

Der oben genannte Effekt trat genauso bei den Messungen der aus eingefrorenen Spitzen regenerierten Pflanzen auf. Auch wenn es meßtechnisch nicht möglich war, mit Hilfe des Peakkanals aneuploide Pflanzen zu identifizieren, erlauben die Messungen jedoch den Schluß, daß keine polyploiden Pflanzen unter den gemessenen Proben waren. Wäre das der Fall, wäre der 2. Peak erhöht und noch ein dritter Peak in einem doppelt so hohen Peakkanal wäre zu sehen.

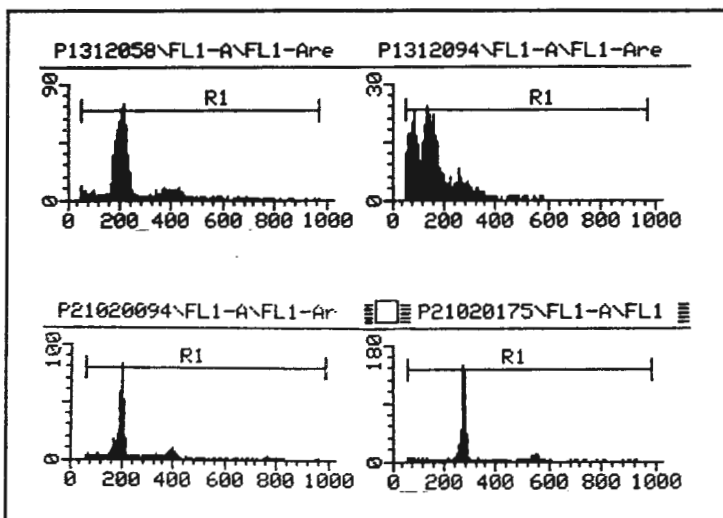


Abbildung 4: Durchflußcytometrische Messungen von Kontrollpflanzen

Obere Reihe: Kontrollpflanze der Sorte Linzer Stärke, junges Blatt (links), älteres Blatt (rechts); untere Reihe: Kontrollpflanze der Sorte Uran, ausgetopfte Pflanze (links), In-vitro-Pflanze (rechts)

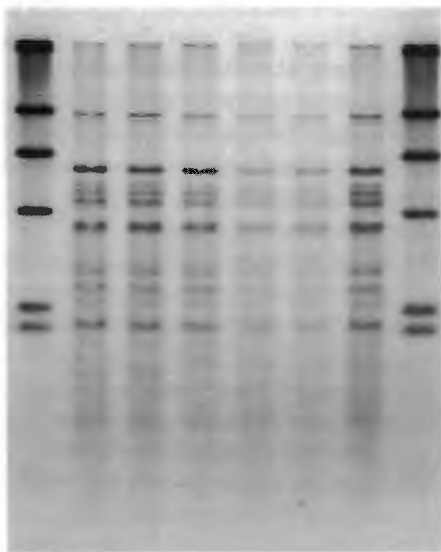
3.2.3 RFLP-Analyse

Wie eingangs erwähnt würde nur eine totale Sequenzierung der DNA "somaclonale Varianten" aufdecken können, wenn sie sich nicht durch phänotypische Veränderungen bemerkbar machen. Eine nicht so aufwendige Methode ist das DNA-fingerprinting. Diese Technik ist durch die Medien hinreichend bekannt, so zum Beispiel durch Vaterschaftstests, aus der Gerichtsmedizin und durch Evolutionsanalysen.

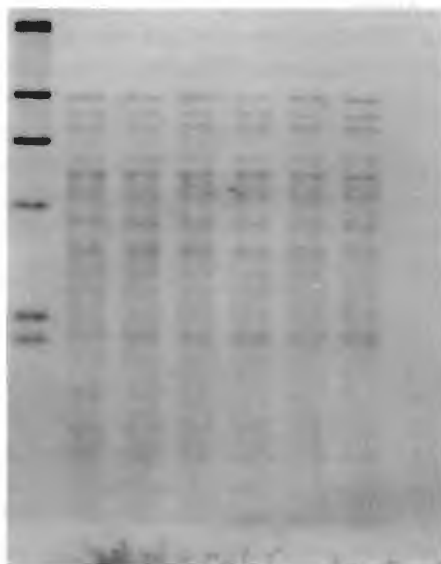
Eine weit verbreitete Technik für das DNA-fingerprinting ist die RFLP-Analyse. Wie die ausgeschriebene Schreibweise Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus ausdrückt, beruht die Analyse auf dem Nachweis von DNA-Bruchstücken, die durch Enzyme (Restriktionsenzyme) hergestellt werden, die bei einer bestimmten Nukleotidsequenz schneiden. Die nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente werden mit einer Sonde hybridisiert

und so nur die Fragmente sichtbar gemacht, die die komplementäre Nukleotidsequenz der Sonde enthält.

Bei Kartoffeln gibt es RFLP-Kartierungen, die durch die Kombination von verschiedenen Restriktionsenzymen und DNA-Sonden erstellt wurden (Gerhardt et al., 1989). Aufgrund der unterschiedlichen Bandenmuster kann bei einer großen Anzahl von Kartoffelsorten, Zuchtlinien und Arten eine Sorte exakt definiert und von anderen nah verwandten Sorten unterschieden werden. Ein Nachteil für die Ausnutzung dieser schon vorhandenen Informationen ist, daß DNA-Sonden verwendet wurden, die nicht kommerziell erhältlich sind. Darüber hinaus geht es bei dem



a



b

Abbildung 5: RFLP-Analyse von Regeneraten aus eingefrorenen Sproßspitzen

a: Sorte Linzer Stärke mit GATA4 hybridisiert

b: Sorte Lisera mit GACA4 hybridisiert.

Die rechte und linke Spur in 5a und die linke Spur in 5b sind Molekulargewichtslängenmarker. Die Kontrollpflanze ist jeweils die 2. Spur von links. Alle anderen Spuren stammen von Pflanzen aus eingefrorenen Sproßspitzen

Nachweis der genetischen Stabilität von kryokonservierten Pflanzen nicht primär um eine Identifizierung der Sorte. Inzwischen gibt es käufliche DNA-Sonden, Polynukleotide wie GATA₄ und GACA₄, die bei vielen Pflanzenarten spezifische RFLP-Muster ergeben (Eppelen, 1992). Mit diesen Sonden können auch nahe verwandte Kartoffelsorten unterschieden werden, selbst wenn nur das Restriktionsenzym Dra I verwendet wird (Camos, persönliche Mitteilung).

Bei der für diese Studie durchgeführten RFLP-Analyse wurden die Banden von 161 regenerierten Pflanzen aus eingefrorenen Proben (23 Sorten) mit denen der entsprechenden nichteingefrorenen Kontrollpflanzen verglichen. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Dra I, das die Sequenz TTT↓AAA erkennt, geschnitten, die Fragmente aufgetrennt und mit den Polynukleotiden GATA₄ und GACA₄ hybridisiert. In Abbildung 5 sind als Beispiele die Bandenmuster der Sorten Linzer Stärke und Lisera dargestellt. Für alle 23 untersuchten Sorten wurden verschiedenen charakteristische Bandenmuster erhalten. Es wäre sogar schon ausreichend gewesen, nur mit der Sonde GATA₄ zu hybridisieren. GACA₄ zeigt unter gleichen Bedingung etwas schwächere Signale.

Wie die Hybridisierungsmuster in Abbildung 5 zeigen, die zweite Spur von links ist jeweils die der Kontrollpflanze, haben die aus eingefrorenen Spitzen regenerierten Pflanzen das gleiche Bandenmuster wie die jeweiligen Kontrollpflanzen. Aus diesem Ergebnis ist der Schluß zu ziehen, daß das Einfrieren und Auftauen keine wesentlichen Veränderungen der DNA bewirkt, was sich wahrscheinlich auch in einer Veränderung des Phänotyps ausgewirkt hätte. Das System ist aber nicht geeignet, "somaclonale Varianten" aufzudecken, wenn es sich nicht zufälligerweise um eine Punktmutation in der Erkennungsregion des Enzyms gehandelt hätte.

Auf der anderen Seite muß es sich nicht unbedingt um "somaclonale Varianten" handeln, wenn Unterschiede im Bandenmuster von Versuchs- und Kontrollpflanzen gefunden werden. Die Ursache kann in Verunreinigungen der DNA-Probe liegen, die sich so an der DNA anlagern, daß die Schnittstelle für das Enzym nicht zugänglich ist. Als Folge davon wird ein DNA-Fragment durch ein größeres Fragment ersetzt, wodurch ein anderes Bandenmuster entsteht. Diese Artefakte, von Nürnberg und Eppelen (1989) "hidden partials" genannt, geben gelegentlich Anlaß zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse und werden leicht voreilig als "somaclonale Varianten" angesehen. Ganz kritisch kann daher auch nicht die Arbeit von Harding (1991) gesehen werden, in der er bei zwei von 16 analysierten Pflanzen aus der In-vitro-Langzeitlagerung Veränderungen im Bandenmuster beschreibt.

Zusammenfassend können aus den Versuchen zur Untersuchung der genetischen Stabilität folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Das Austopfen der Pflanzen ist die einfachste und zweckmäßigste Methode, um den Erhalt der sortentypischen Eigenschaften nachzuweisen.
2. Durchflußcytometrische Messungen geben mit der hier verwendeten einfachen Methodik nur an physiologisch vergleichbarem Material aussagekräftige Ergebnisse.
3. Die RFLP-Analyse ist als teures und aufwendiges Verfahren

ungeeignet, Varianten sicher zu erkennen. Sie gibt jedoch eindeutige Ergebnisse bei der Identifizierung der Sorte.

3.3 Kostenabschätzung

Nicht weniger wichtig für eine Entscheidung für oder gegen den Einsatz dieser Kryokonservierungsmethode in einer Sammlung pflanzengenetischer Ressourcen sind die Kosten. Für die Abschätzung der Kosten wurden die Preise und Gehälter von 1994 zugrunde gelegt. Für diese Methode wird vorausgesetzt, daß sie in einem In-vitro-Labor durchgeführt wird. Zusätzliche Investitionen beschränken sich daher auf die Gerätschaften für das Einfrieren. Zur Anschaffung der Lagertanks (für ca. 300 Sorten), Transporttanks und Laborzubehör werden etwa DM 22000 benötigt. Für das Einfrieren einer Sorte (Anzucht der Pflanzen, 3 unabhängige Einfrierversuche inklusive Wachstumskontrolle) wurden die Kosten auf DM 1250 berechnet. Von diesen Kosten entfallen 91% auf anteilige Gehaltskosten. Verglichen mit allen anderen Kryokonservierungsmethoden, die für Kartoffeln publiziert worden sind, ist diese Methode am kostengünstigsten, weil sie weniger arbeitsintensiv ist. Wenn die Proben erst einmal eingefroren sind, ist die eigentliche Lagerung sehr viel kostengünstiger als alle anderen Langzeitlagerungsmaßnahmen wie In-situ- oder In-vitro-Konservierung, die neben Personalkosten auch Energie für die Kultur- und Lagerkammern verbraucht. Bei der Kryolagerung beschränken sich die laufenden Kosten im wesentlichen auf den flüssigen Stickstoff, der in gewissen Abständen nachgefüllt werden muß. Der Preis für flüssigen Stickstoff lag 1994 zwischen DM 0.51/l und DM 1.65/l, je nach dem, wieviel und woher der Stickstoff bezogen wird.

4 Schlußfolgerung

Die Anwendung der Einfriermethode im Routineeinsatz hat gezeigt, daß die Methode einfach und schnell erlernbar ist. Größter Kostenfaktor ist die Arbeitszeit. Die Zeitspanne, die erforderlich ist, eine In-vitro-Sammlung in flüssigem Stickstoff einzulagern, ist abhängig von der Anzahl an Arbeitskräften. Die sortentypischen Eigenschaften bleiben ebenso gut erhalten wie bei einer In-vitro-Sammlung. Solange regelmäßig Stickstoff nachgefüllt wird, ist die Gefahr gering, daß Sorten verloren gehen. Wie lange man beide Formen der Langzeitlagerung parallel laufen läßt, hängt nicht nur von der Nachfrage ab, sondern auch von dem Vertrauen, das man einer neuartigen Methode entgegen bringt. Letzteres kann und soll nicht beeinflußt werden. Lagert man die Sorten in flüssigem Stickstoff, sollte man bedenken, daß die Pflanzen nicht so schnell zur Verfügung stehen wie bei einer In-vitro-Sammlung. Es ist davon abzuraten, eingefrorene Proben zu verschicken, da es nicht nur immens teuer ist, Proben in flüssigem Stickstoff zu verschicken (Trockeneis ist nicht kalt genug) sondern auch eine Überforderung des Züchters oder Anforderers darstellt. Am einfachsten sind die Sorten als In-vitro-Pflanzen zu verschicken. Es sind 3 bis 4 Monate erforderlich, bis aus den aufgetauten und kultivierten Spitzen verschickungsfähige kräftige In-vitro-Pflanzen zur Verfügung stehen. Eine noch längere Zeit ist notwendig, wenn man ganz sicher gehen will, daß alle Sorteneigenschaften erhalten sind. Dazu sollte man einen Clon ausplan-

zen und nach den Sortenmerkmalen bonitieren. Werden bestimmte Sorten häufig nachgefragt, ist eine parallele Lagerung als In-vitro-Pflanzen empfehlenswert.

5 Zusammenfassung

Mit der Methode, die für die Kryokonservierung alter Kartoffelsorten entwickelt worden ist (Schäfer-Meuh r et al., 1994), wurden mehr als 200 Sorten und Genotypen eingefroren und in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zum Einfrieren werden 12-20 Sorten auf eine Stärke von 100-200 In-vitro-Pflanzen pro Sorte vermehrt. In jedem Einfrierversuch werden 100-150 Sproßspitzen/Sorte eingefroren und in Portionen von 12 Sproßspitzen/Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Von jedem Einfrierversuch wird eine Wachstumskontrolle durchgeführt, bei der 10-12 Sproßspitzen aufgetaut und in dem bei To w i l l (1983) beschriebenen Medium kultiviert werden. Für alle Sorten und Genotypen wird das gleiche Medium verwendet. Der Einfrierversuch wird für jede Sorte zweimal wiederholt. Insgesamt werden von einer Sorte etwa 30 Kryoröhrchen (=360 Sproßspitzen) gelagert, die aus 3 voneinander unabhängigen Einfrierversuchen stammen.

Die ausgewerteten Wachstumskontrollen von 150 eingefrorenen Sorten und Genotypen ergaben, daß durchschnittlich 82 % der Sproßspitzen das Einfrieren und Auftauen überleben. Wichtiger als die Überlebensrate ist für die praktische Anwendung die Pflanzenregeneration. Selbst wenn ein und dasselbe Regenerationsmedium, das für einige Sorten nicht optimal ist, eingesetzt wurde, wurden von allen Sorten wieder Pflanzen erhalten. Im Durchschnitt liegt die Pflanzenregenerationsrate bei fast 41 %.

Zur Zeit ist es noch nicht möglich vorherzusagen, wie lange die Sorten in flüssigem Stickstoff gelagert werden können. Sproßspitzen, die 3 Jahre in flüssigem Stickstoff gelagert waren, hatten vergleichbare Überlebens- und Pflanzenregenerationsraten wie die Wachstumskontrollen, die direkt nach dem Einfrieren erhalten wurden.

Die genetische Stabilität wurde überprüft, indem wiederangewachsene Pflanzen von 98 Sorten ausgetopft und der Phänotyp mit dem der entsprechenden Kontrollpflanze verglichen wurde. Von 32 Sorten wurden die Knollen ein zweites Mal ausgelegt. Es gab nur sehr wenige In-vitro-Pflanzen, die das Austopfen nicht überlebten. Eine Pflanze war möglicherweise polyploid. Alle anderen Pflanzen entsprachen weitgehend im Phänotyp den Kontrollpflanzen. Zusätzlich wurde bei 161 Proben der Ploidiegrad bestimmt und DNA-fingerprints angefertigt. Es wurden weder polyploide Pflanzen noch unnormale Bandenmuster gefunden. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß durch einen Einsatz dieser Kryokonservierungsmethode die genetische Identität erhalten bleibt.

Die Methode ist kostengünstiger als alle anderen Kryokonservierungsmethoden, die für Kartoffeln publiziert worden sind. Die Kosten für das Einfrieren von einer Sorte beliefen sich 1994 auf DM 1250, wobei die Arbeitskosten (Lohn) 91% ausmachten. Die eigentliche Lagerung ist kostengünstiger und sicherer als alle anderen Langzeitlagerungsmaßnahmen wie In-situ- oder In-vitro-Konservierung.

Diese Methode kann für die Langzeitlagerung von Kartoffelsorten und Zuchtmaterial empfohlen werden.

The Use of Cryopreservation as Routine Method for the Preservation of Old Potato Varieties

A method for the cryopreservation of old potato varieties which had been designed for the routine application in genebank work was used to freeze more than 200 varieties and genotypes and store them in liquid nitrogen.

For the freezing 12-20 varieties are propagated to 150-200 in vitro plants each. In each experiment 100-150 shoot-tips/variety are frozen and stored in liquid nitrogen in portions of 12 shoot-tips/cryo vial. As a control for regrowth the shoot-tips of one vial of each experiment are thawed and cultured in the medium described by To will (1993). The same regeneration medium is used for all varieties and genotypes. For each variety the freezing experiment is repeated two times. In total up to about 30 cryovials (=360 shoot-tips) are stored of each variety which are the result of three independent freezing experiments.

Calculated on the basis of the regrowth experiments of 150 frozen varieties and genotypes a survival rate of approximately 82 % has been obtained. More important for a genebank, however, is the rate of plant regeneration. Using the same regeneration medium for all genotypes a total mean value of nearly 41% has been achieved and what is also important, no variety has been found so far that did not regenerate plants after freezing.

It is not yet possible to give a prognosis about the length of time the samples can be stored in liquid nitrogen. For shoot-tips having been stored for 3 years in liquid nitrogen the results for survival and plant regeneration were the same as those when they were initially frozen.

The genetic stability has been tested by planting out regrown plants of 98 varieties and comparing the phenotype with the ones of the respective control plants. Tubers of 32 varieties have been planted out a second time. The number of plants not being able to survive the normal greenhouse routine was very low. In general, the regrown plants were very uniform in habitus and the tubers matched those of the unfrozen stock plants. One plant was found so far which was most likely polyploid. In addition to the evaluation of the phenotype 161 samples of regrown plants were checked by flow cytometric measurements and RFLP-analysis. Neither polyploid nor abnormal banding patterns have been found. It therefore seems to be safe to conclude that the employment of this cryopreservation technique maintains the genetic identity.

Compared to all other methods published for the cryopreservation of potato the procedure is relatively low in costs. Calculated for the year 1994 the costs were DM 1250 per variety. The highest part of the costs were the labor costs which accounted for 91% of the total costs. Once the samples are frozen the costs for storage are low compared to other storage systems like field genebank conservation or in vitro slow growth.

The technique can be recommended for the long-term storage of potato varieties and for the safety deposit of working stocks.

Danksagung

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministers für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung über das International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) gefördert. Wir danken Herrn Dr. Meister, Institut für Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, für die Durchführung der durchflußcytometrischen Messungen und Frau Veronica Campos, Universität Tübingen, für die wertvollen Hinweise bei der Durchführung der DNA-fingerprints.

Literatur

- De Laat, A. M. M., Göhde, W. and Vogelzang, M. J. D. C.: Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. - *Plant Breeding* 99, S. 303-307.
- Epplen, J. T.: The methodology of multilocus DNA fingerprinting using radioactive or nonradioactive oligonucleotide probes specific for simple repeat motifs. - *Advances in electrophoresis* 5 (1992), S. 62-112.
- Fresenius Diagnostik: DNA-Fingerprinting mit radioaktiv-markierten Oligonucleotiden - Nichtradioaktives DNA-Fingerprinting mit Digoxigenin-markierten Oligonucleotiden. 1993.
- Gebhardt, C., Ritter, E., Debener, T., Schachtschabel, U., Walkemeier, H., Uhrig, H. and Salamini, T.: RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. - *Theor. Appl. Genet.* 78 (1989), S. 65-75.
- Harding, K.: Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. - *Euphytica* 55 (1991), S. 141-146.
- Hu, C. Y. and Wang, P. J.: Meristem, shoot tip, and bud cultures. - *Handbook of Plant Cell Culture* (Hrg. Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P.V., Yamada, Y.) 1 (1983), S. 177-227.
- Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R.: Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. - *Theor. Appl. Genet.* 71 (1985), S. 500-505.
- Mix, G.: Long-term storage in vitro of potato gene material. - *Plant Research and Development* 19 (1984), S. 122-127.
- Mix-Wagner, G. und Seidewitz, L.: Evaluierungsdaten "Old Potato Varieties" - Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der FAL (1991).
- Murashige, T. and Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - *Physiologia plantarum* 15 (1962), S. 473-497.
- Nürnberg, P. and Epplen, J. T.: "Hidden partials" - A cautionary note. - *Fingerprint News* 1 (1989), S. 11-12.
- Saghai-Marouf, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. and Allard, R. W.: Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance chromosomal location and population dynamics. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984), S. 8014-8018.
- Sanford, J. C., Weeden, N. F. and Chyi, Y. S.: Regarding the novelty and breeding value of protoplast-derived variants of Russet Burbank (*Solanum tuberosum* L.). - *Euphytica* 33 (1984), S. 709-715.

Schäfer-Menuhr, A., H.-M. Schumacher und G. Mix-Wagner: Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Meristeme in flüssigem Stickstoff. - Landbauforschung Völkenrode 44 (1994), S. 301-313.

Schweizer, G.: Charakterisierung und RFLP-Analyse spezifischer Genomkomponenten bei Solanum und ihr Einsatz zur Identifikation somatischer Hybride von *S. tuberosum*-Zuchtlinien. - Doktorarbeit, Universität Tübingen, 1990.

To will, L. E.: Improved survival after cryogenic exposure of shoot tips derived from in vitro plantlet cultures of potato. - Cryobiology 20 (1983), S. 567-573.

Verfasser: Schäfer-Menuhr, Angelika, Dr. agr., DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; Müller, Ellruth; Mix-Wagner, Gunda, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Komm. Leiter: Prof. Dr. agr. habil. Friedrich Weißbach.