

Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Meristeme in flüssigem Stickstoff

ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR, HEINZ-MARTIN SCHUMACHER und GUNDA MIX-WAGNER

Institut für Pflanzenbau

1 Einleitung

Der Erhalt pflanzengenetischer Ressourcen erfordert Lagerungsbedingungen, die garantieren, daß das Material in allen Eigenschaften über viele Jahrzehnte hinweg stabil bleibt. Schwieriger als die Aufbewahrung von Saatgut samenvermehrbarer Pflanzenarten ist die Erhaltung vegetativ vermehrter Arten, zu denen die Kulturformen der Kartoffel gehören. Kartoffelsorten werden traditionell in Form von Knollen und in zunehmendem Maße, wie im Institut für Pflanzenbau, als in vitro Sammlung erhalten (M i x - W a g n e r, 1990; M i x - W a g n e r und S e i d e w i t z, 1991). Obwohl die in vitro Kulturen bis zu zwei Jahre gelagert werden können, besteht immer noch die Gefahr, daß Sorten durch Sekundärinfektionen oder große Teile der Sammlung durch technische Defekte der Kultur- oder Lagerräume verloren gehen können. Da die Lagerung als in vitro Pflanzen trotz aller Vereinfachung noch sehr arbeitsintensiv ist, sucht man nach Alternativen.

Gerade für die Langzeitlagerung wäre eine Lagerung in flüssigem Stickstoff (Kryokonservierung) ideal. Einmal eingefroren wäre nur noch ein gelegentliches Auffüllen der Tanks mit flüssigem Stickstoff notwendig. Für eine breite Anwendung im Bereich Lagerung pflanzengenetischer Ressourcen von Kartoffeln war die Methode bisher jedoch noch nicht so weit entwickelt, daß sie routinemäßig angewendet werden könnte.

Bisherige Einfrierarbeiten an Kartoffeln wurden entweder mit einigen wenigen Sorten oder Genotypen durchgeführt oder es wurde versucht, eine Methode für die eine oder andere Sorte zu optimieren (B a j a j, 1978; 1981; B e n s o n et al, 1989; F a b r e und D e r e u d d r e, 1990; G r o u t und H e n s h a w, 1978; H a r d i n g et al., 1991; H e n s h a w et al., 1985; S c h n a b e l - P r e i k s t a s et al., 1992; T o w i l l, 1981a; 1983; 1990). Ein breiteres Spektrum an Sorten und Spezies wurde nur von T o w i l l (1981b; 1984) bearbeitet.

Im Rahmen eines gemeinsamen Projekts von Institut für Pflanzenbau (FAL) und DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH soll eine leicht handhabbare Methode ausgearbeitet werden, die routinemäßig angewendet werden kann. Dazu wurden bereits beschriebene Methoden getestet und eine Methode so weit modifiziert, daß sie für eine in vitro Sammlung alter Kartoffelsorten einsetzbar ist. In dieser Arbeit wird die Kryokonservierung von 62 Sorten aus der in vitro Sammlung des Institut für Pflanzenbau beschrieben.

2 Material und Methoden

2.1 Nährmedien

MS Medium: das Medium enthält die Makro- und Mikro-nährstoffe und Vitamine des M u r a s h i g e und S k o o g Medium (1962) und 30 g/l Saccharose. Der pH-Wert ist bei allen Medien 6,8.

MS(1) Medium: das Medium enthält die Makro- und Mikro-nährstoffe des MS Mediums, 20 g/l Saccharose und 8 g/l Agar.

MS(2) Medium: MS Medium (s. oben) mit zusätzlich 8 g/l Agar.

MSTo Medium: MS Medium (s. oben) mit den Phytohormonen nach T o w i l l (1983) Zeatinribosid 0,5 mg/l, Gibberellinsäure 3 (GA3) 0,2 mg/l und Indolessigsäure (IAA) 0,5 mg/l. Das Medium wird sterilfiltriert.

MSA Medium: MS Medium (s. oben) mit den Phytohormonen 6-Benzyladenin (BA) 1 mg/l und IAA 0,5 mg/l. Das Medium wird sterilfiltriert.

MSB Medium: MS Medium (s. oben) mit den Phytohormonen Zeatinribosid 0,5 mg/l und GA3 0,2 mg/l. Das Medium wird sterilfiltriert.

Agarose: 1 % Low Melting Agarose in MS Medium (s. oben).

Frostschutzmittel: 10 % DMSO (9 ml MSTo + 1 ml Dimethylsulfoxid). Die Lösung wird jeweils frisch angesetzt und sterilfiltriert.

2.2 Pflanzenmaterial

Pflanzen aus der in vitro Sammlung des Instituts für Pflanzenbau wurden in Phytokammern ausgepflanzt. Zum Zeitpunkt der Knollenbildung wurden aus Achselknospen von Stengelabschnitten neue in vitro Kulturen angelegt. Dazu wurden die Stengelabschnitte 10-20 min (je nach Dicke) in 2 % Calciumhypochloridlösung sterilisiert. Zur besseren Benetzung war der Lösung ein Tropfen Tween 80 zugesetzt worden. Die Stengelabschnitte wurden mit sterilem Wasser gewaschen. Gewebestücke, die Knospen enthielten, wurden herausgeschnitten und auf MS(1) Medium in Petrischalen gelegt. Sie wurden unter 12 h Licht bei 20-23°C kultiviert. Sobald sich Sprosse entwickelt hatten, wurden sie vom ursprünglichen Explantat abgetrennt und auf neue Petrischalen umgesetzt. In vitro Pflanzen, die frei von sichtbaren Kontaminationen waren, wurden über Nodiensegmente weiter vermehrt. 10-15 Nodiensegmente wurden in ein 12 cm hohes Twist off Glas mit MS(1) Medium gesetzt. Um guten Luftaus-



Abbildung 1: **Anzucht der in vitro Pflanzen für die Meristempräparation**

tausch zu gewährleisten, war in den Twist off Deckel ein etwa 1 cm großes Loch gebohrt worden, der mit einem Wattenstopfen verschlossen wurde (Abbildung 1).

2.3 Präparation der Meristeme

Wenn die Pflanzen eine Höhe von etwa 10 cm erreicht hatten, wurden die Spitzen abgeschnitten. Die Präparation wurde unter einem Stereomikroskop, das unter einer sterilen Werkbank stand, durchgeführt. Mit zwei sterilen Injektionsnadeln, auf die als Halter Spritzen gesteckt wurden, wurden die äußeren Blätter, die Basis und die Spitze des letzten Blattes entfernt, das den Vegetationskegel und die Blattanlagen umhüllt. Die Meristeme hatten eine Länge von 2-3 mm und eine Dicke von 0.5-1 mm. Die so präparierten Meristeme wurden in eine Petrischale auf Filterpapier gelegt, das mit MSTo angefeuchtet war (Abbildung 2). Für ein Routineexperiment wurden 100-200 Meristeme präpariert. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 23°C inkubiert.

2.4 Einfrieren

Am nächsten Morgen wurden die Meristeme auf Filterpapier überführt, das mit Frostschutzmittel angefeuchtet war. Nach 2 h Inkubation bei Zimmertemperatur oder 23°C wurden auf hitzesterilisierte Rechtecke (0.7 x 2 cm) von 0.03 mm starker Aluminiumfolie 2.5 µl große Tropfen Frostschutzmittel aufgetragen, 6 Tropfen pro Folie. Mit Hilfe von 2 Injektionsnadeln wurde in jeden Tropfen 1 Meristem gesetzt (Abbildung 3). Die Folienstücke wurden direkt in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten 200 ml Dewar überführt.

2.5 Lagerung

Zur Lagerung wurden die Aluminiumstreifen in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Dazu wurden die Röhrchen mit Name der Sorte, BGRC Nummer und Einfrierdatum beschriftet. Zur

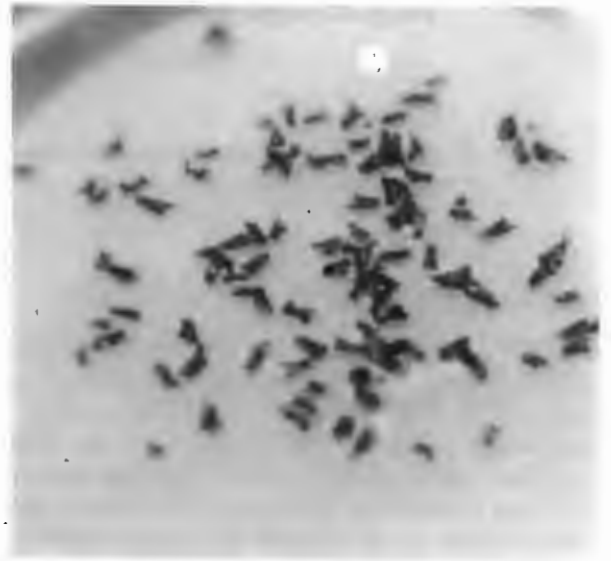


Abbildung 2: **Vorinkubation der Meristeme**

übersichtlichen Lagerung wurden die Röhrchen noch zusätzlich auf dem Deckel mit Farbmarkierungen versehen. Die Kryoröhrchen wurden in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Dazu geeignet sind z.B. Styroporbehälter von der Firma Scotlab. Unter einer sterilen Werkbank wurden die Deckel abgeschraubt und auf einer sterilen Fläche abgelegt. Der Inhalt des Dewars wurde in ein steriles 250 ml Becherglas ausgegossen. Mit Hilfe einer Pinzette wurden je 2 Folien in ein vorgekühltes Röhrchen gegeben. Dieser Arbeitsschritt muß sehr schnell erfolgen, damit sich die eingefrorenen Proben nicht erwärmen. Die Deckel wurden wieder aufgeschraubt, jedoch nicht zu fest, damit flüssiger Stickstoff in die Röhrchen eindringen kann. Zur Lagerung wurde ein Kryobehälter mit Schubladensystem verwendet, das eine übersichtliche Lagerung erlaubt. Zur Dokumentation wurde Name der Sorte, BGRC Nummer,



Abbildung 3: **Meristeme in 2.5µl Tropfen DMSO Lösung auf Aluminiumfolie**



Abbildung 4: **Kultur der aufgetauten Meristeme in Agaroestetropfen**

Farbmarkierung, Einfrierdatum und die Position im Kryobehälter in Listen eingetragen. Die Röhren sollten entweder direkt in flüssigem Stickstoff oder in der kältesten Gasphase lagern.

2.6 Kultur der eingefrorenen Meristeme

Zum Auftauen wurde etwa 20 ml MS Medium in ein steriles Becherglas gegeben. Ein Kryoröhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff genommen und geöffnet. Die Aluminiumstreifen wurden mit einer vorgekühlten Pinzette in das Medium überführt. Die Meristeme tauen sofort auf. Agarose wurde geschmolzen und auf ca 40°C abgekühlt. Mit einer Pasteurpipette wurde je ein Tropfen in eine 3 cm Petrischale gegeben. In



Abbildung 5: **Inkubation der Petrischalen in Klarsichtdosen**



Abbildung 6: **Regenerierte Pflanze aus einem eingefrorenen Meristem**

die Tropfen wurde je ein aufgetautes Meristem transferiert (Abbildung 4). Nach etwa 30 min wurde 1,5-2 ml MSTo zugegeben. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation erfolgte in durchsichtigen Kunststoffbehältern, in denen zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit 2 Petrischalen mit Wasser gesetzt worden waren (Abbildung 5). Der Kulturschrank hatte 23°C und 12 h Licht.

Nach zwei Wochen und in jeder darauffolgenden Woche wurden die Meristeme auf Wachstum überprüft. Sprosse oder Pflanzen wurden bei einer Länge von etwa 1 cm auf MS(2) Medium in 6 cm Petrischalen umgesetzt (Abbildung 6). Bei einer Größe von 3 cm wurden sie in größere Gefäße umgepflanzt (Abbildung 7). Wenn sich die Pflanzen gut entwickelt hatten, wurden sie über Nodien vermehrt. Die Pflänzchen aus eingefrorenen Meristemen und nicht eingefrorene Kontrollen wurden in 18 cm Töpfe ausgepflanzt. Während der ersten 2 Wochen wurden sie mit durchsichtigen Plastikbechern vor dem Austrocknen geschützt. Während des Wachstums und nach der Ernte wurden zur Dokumentation Fotos gemacht. Von einigen Sorten wurden die Knollen ein zweites Mal ausgepflanzt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Strategie für die Entwicklung einer routinemäßig anwendbaren Einfriermethode

Wie in der Einleitung bereits angeführt, sind in einigen Laboratorien verschiedene Kartoffelgenotypen in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit mehr oder weniger großem Erfolg nach dem Auftauen wieder zu Pflanzen regeneriert worden. Eine optimale Methode gibt es bisher noch nicht, wobei unter optimal eine Pflanzenregenerationsrate bei allen Genotypen von mindestens 80 % verstanden wird.

Wenn man eine Methode für eine Sammlung pflanzengenetischer Ressourcen einsetzen will, muß die Methode einfach sein und einen hohen Probendurchsatz haben. Es sind andere Schwerpunkte zu setzen als bei Laboratorien, die Grundlagenforschung betreiben. Von der Grundlagenforschung her würde der klassische Lösungsweg so aussehen, daß eine Methode für eine Sorte oder Genotyp entwickelt wird und dann optimiert wird. Danach wird die Methode für weitere Genotypen eingesetzt. Diese Vorgehensweise ist charakteristisch für die vorne zitierte Literatur über Einfrierversuche von Kartoffeln. Nur in zwei Arbeiten von *Towill* (1981b; 1984) wurde eine Methode auf eine Vielzahl von Genotypen angewendet, die zwar unterschiedlich auf die Methode reagierten, bei einigen Genotypen aber den erwünschten Erfolg erzielten. Letztere Vorgehensweise ist für Arbeiten mit einer Sammlung wahrscheinlich die geeignetere Strategie. Dies wird deutlich, wenn man den Faktor Zeit einkalkuliert. Um eine Methode für einen Genotyp zu optimieren, kann ohne weiteres ein Jahr benötigt werden. Die erforderliche Zeit für die nächsten Genotypen wird sich sicher sukzessiv verkürzen. Bei einem Projekt von 3 Jahren Laufzeit - die einzige Möglichkeit, zusätzliche Arbeitskräfte zu bekommen, da bei den parallel laufenden Routearbeiten noch keine Arbeitskräfte eingespart werden können - wären 5-10 Sorten eingefroren, die jedoch möglicherweise eine gute Anwachsrate nach dem Einfrieren haben würden.

Auch bei der Screeningstrategie wird es nicht möglich sein, innerhalb von 3 Jahren eine Kartoffelsammlung von 800 Mustern wie bei diesem Projekt einzufrieren. Es könnte jedoch möglich sein, einen so hohen Anteil der Sammlung einzufrieren, daß sich die Routearbeiten für die konventionelle Lagerung merklich reduzieren. Dazu sind zwei Voraussetzungen notwendig:

1. daß man die Methode so ausgewählt oder modifiziert, daß sie befriedigend gute Ergebnisse für ein breites Sortenspektrum liefert,
2. daß man auch suboptimale Regenerationsraten akzeptiert.

Die Frage ist, wie hoch die Regenerationsrate überhaupt sein muß. Wenn es sich bei den einzufrierenden Mustern um Populationen handelt, ist eine hohe Wiederanwachsrate erforderlich, um die Eigenschaften aller Genotypen sicher zu erhalten. Bei der Sammlung alter Kartoffelsorten liegt der Fall jedoch anders. Das Ausgangsmaterial ist geklontes Material, das über die Jahre kontinuierlich durch einige wenige Knollen oder *in vitro* Pflanzen vermehrt wurde. Bei diesem Material ist es auf jeden Fall ausreichend, wenn einige Meristeme pro eingefrorenem Röhrchen Pflanzen regenerieren, solange diese Pflanzen genetisch identisch sind.

Eine weitere Frage ist der Probenumfang, der für jede Sorte eingefroren werden sollte. Er ist abhängig von der zu erwartenden Entnahmehäufigkeit und der Regenerationsrate. Wenn Sorten sehr häufig nachgefragt werden, empfiehlt es sich, zusätzlich Knollen oder *in vitro* Pflanzen vorrätig zu halten und die eingefrorenen Proben als Sicherheitsdepot zu nutzen. Auch bei Sorten, die eine Pflanzenregenerationsrate von 10 %



Abbildung 7: **Kultur der regenerierten Pflanzen**

und weniger haben, sollte die Kryolagerung nur eine zusätzliche Sicherheitsmaßnahme sein. Bei allen anderen Sorten dürfte ein Probenumfang von 250-500 Meristemen ausreichend sein. Sie sollten zur Sicherheit in zwei separaten Containern gelagert werden.

3.2 In der Literatur beschriebene Methoden zum Einfrieren von Kartoffelmeristemen

Es gibt prinzipiell zwei Faktoren, die die Zellen beim Einfrieren schädigen und zwar die Dehydratation der Zellen und die Eiskristallbildung. Eine Entwässerung der Zellen tritt beim langsamen Einfrieren auf, wenn sich zuerst Eis im umgebenden Medium und in den Zellzwischenräumen bildet und durch diese Änderung der osmotischen Verhältnisse Wasser aus den Zellen entzogen wird. Im anderen Fall, beim schnellen Einfrieren, wird die Schädigung durch Eiskristalle verursacht, die sich in den Zellen bilden. Die verschiedenen Einfriertechniken versuchen, die Schädigungen so weit auszugleichen, daß wenigstens ein Teil der Zellen überlebt. Je größer die einzufrierenden Gewebeteile sind, desto ausgefeilter müssen die Einfriermethoden sein.

Zur Erhaltung der Sorten, werden bei Kartoffeln Meristeme eingefroren, da sich Meristeme ohne genetische Veränderungen wieder zu Pflanzen regenerieren lassen. Die Scheitelzellen in den Meristemen sind zudem klein und kompakt und deshalb theoretisch unproblematisch beim Einfrieren. Ein Nachteil ist die begrenzte Anzahl an Meristemen pro Pflanze, was systematische Untersuchungen erschwert.

Bei den für Kartoffeln beschriebenen Methoden werden bei den meisten Autoren die Meristeme nach der Präparation für ein oder zwei Tage vorkultiviert. Dieser Schritt ist empirisch begründet und soll es dem Gewebe erlauben, sich nach dem Schneiden zu regenerieren.

Um die Zellschäden zu verkleinern, wird in den meisten Fällen ein Frostschutzmittel zugesetzt, das in die Zellen eintritt. Für Kartoffelmeristeme wird bei vielen Arbeitsgruppen Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu einer Konzentration von 10 % eingesetzt. Die Inkubationszeit für das Frostschutzmittel variiert von 30 min bis 1 h, meistens bei Zimmertemperatur, manchmal in Eis.

Für Kartoffelmeristeme werden die unterschiedlichsten Einfriermethoden verwendet.

- Kontrolliertes langsames Einfrieren bis -30° oder -40°C , danach Einfrieren der Röhrchen in flüssigem Stickstoff. Die Eisbildung erfolgt erst im externen Medium und entwässert die Zellen so weit, daß sich beim Einfrieren in flüssigem Stickstoff in den Zellen keine Eiskristalle bilden. Diese Methode ist günstig für pflanzliche Zellkulturen, die große vakuolisierte Zellen haben. Sie wurde von Benson et al. (1989), Harding et al. (1991), Henshaw et al. (1985) und Towill (1981a; 1983) für Kartoffelmeristeme eingesetzt.
- Schnelles Einfrieren, indem die Proben direkt in flüssigen Stickstoff getaucht werden. Es bilden sich sehr kleine Eiskristalle, die in vielen Fällen die Zellstrukturen nicht zerstören. Der limitierende Faktor ist die Größe der Probe. Schnell oder ultraschnell wurden Kartoffelmeristeme bei Bajaj (1978; 1981), Benson et al. (1989), Grouet und Henshaw (1978) und Harding et al. (1991) eingefroren.
- Beim Vitrifizieren wird das Gewebe mit Lösungen getränkt, die bei tiefen Temperaturen so viskos werden, daß sie zu einem metastabilen Glas erstarren ohne Eiskristalle zu bilden. Ein Nachteil ist die Toxizität von einigen der Vitrifizierungskomponenten. Mit dem Vitrifizierungsverfahren wurden von Schnabel-Preikstas et al. (1992) Kartoffelmeristeme eingefroren.
- Bei einer anderen Methode wird das Gewebe in Alginatkugeln eingebettet, die nach Inkubation in hochmolarer Zuckerlösung durch Trocknen teilweise entwässert und dann schnell oder langsam eingefroren werden. Fabre und Deredre (1990) haben mit dieser Methode Kartoffelmeristeme eingefroren.

Das Anwachsmittel nach dem Auftauen war meistens ein MS Medium mit niedriger oder moderaten Konzentration an Phytohormonen. Die Kultur erfolgte bei Standardbedingungen.

3.3 Auswahl einer Basismethode

Um eine Entscheidung fällen zu können, welche von den beschriebenen Methoden sich am besten für eine Routinemethode eignet, wurden die Methoden in Ansätzen getestet. Wichtigste Kriterien waren neben der Pflanzenregeneration nach dem Auftauen, der hohe Probendurchsatz und die Fehleranfälligkeit. Die Versuche wurden mit mehreren Sorten durchgeführt.

Beim kontrollierten Einfrieren waren in diesem Labor sowohl unter den in der Literatur beschriebenen Bedingun-

gen und auch bei Modifikationen die Überlebensraten zu niedrig. Der Probendurchsatz ist bei dieser Technik sehr hoch. Bedingt durch einen Tag Vorinkubation kann bei einer Fünftageweche an 4 Tagen eingefroren werden. Die Fehleranfälligkeit ist klein, da die Meristeme in den Kryoröhrchen eingefroren werden und die Medien und Lösungen aus dem gleichen Grundmedium hergestellt werden. Ein Nachteil ist der verhältnismäßig hohe Preis des Einfriergeräts.

Beim ultraschnellen Einfrieren wurden bei Benson et al. (1989) und Grouet und Henshaw (1978) die Meristeme auf Spitzen von Injektionsnadeln direkt in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Meristeme können so auch ultraschnell in flüssigem Medium aufgetaut werden. Für Vorversuche ist die Methode leicht durchzuführen und führte bei einigen Sorten zu hoher Pflanzenregeneration nach dem Auftauen. Für eine routinemäßige Anwendung eignet sich die Methode nicht, da es für die Vielzahl der Injektionsnadeln kein übersichtliches Lagerungssystem gibt. Eine Modifikation ist die in dieser Arbeit vorgestellte Tröpfchenmethode. Um die Proben später übersichtlich lagern zu können, werden die Meristeme in 2.5 µl große Tröpfchen Frostschutzmittel auf Aluminiumfolie (Karrha et al., 1982) direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Folien können in vorgekühlten Kryoröhrchen übersichtlich gelagert werden. Die Pflanzenregenerationsrate war bei einigen Sorten hoch und bei vielen Sorten ausreichend. Der Probendurchsatz ist sehr hoch. Auch bei dieser Methode kann an 4 Tagen der Woche eingefroren werden. Die Fehleranfälligkeit ist klein, wenn man nur Meristeme einer Sorte gleichzeitig einfriert. Die Lösungen sind einfach herzustellen. Das Überführen der Meristeme in die Tröpfchen erfordert etwas Geschick.

Die Vitrifizierungsmethode nach Schnabel-Preikstas et al. (1992) erfordert einen weiteren Tag Vorinkubation in Saccharoselösung. Die Pflanzenregenerationsraten waren bei einigen Sorten hoch. Bei schlechter reagierenden Sorten lagen die Werte niedriger als die, die mit der Tröpfchenmethode erzielt wurden. Der Probendurchsatz ist geringer. Es kann nur an 3 Tagen der Woche eingefroren werden. Die Fehleranfälligkeit ist größer. Da die Vitrifizierungslösung nur 20 min einwirken soll, sind bei einer großen Anzahl einzufrierender Meristeme mehrere Inkubationsansätze nötig. Die Vitrifizierungslösung ist nicht so einfach herzustellen wie die DMSO Lösung.

Die Alginatmethode wird inzwischen erfolgreich für verschiedene Pflanzenarten eingesetzt. Für Kartoffeln haben sie Fabre und Deredre (1990) angewendet. Obwohl in diesem Labor mehrere Sorten getestet wurden, konnten nach dem Auftauen keine Pflanzen erhalten werden. Um zu positiven Ergebnissen zu kommen, müßten noch grundsätzliche methodische Arbeiten durchgeführt werden, so zum Beispiel zum Trocknen der Perlen. Der Probendurchsatz kann hoch sein. Da es bei der 7tägigen Inkubation in einigen Fällen Kontaminationen gab, reduzierte sich der Probendurchsatz. Im Prinzip kann an 4 Tagen der Woche eingefroren werden, jedoch jeweils um eine Woche verschoben. Bei Urlaub,



Abbildung 8: **Einfluß der Anzuchtbedingungen auf die Wuchsform**

Krankheit und Feiertagen entsteht so immer eine Lücke. Durch die Verschiebung des Einfrierens auf die folgende Woche können leicht Fehler entstehen, zum Beispiel, daß eine Probe am falschen Wochentag getrocknet wird. Das Ansetzen der Lösungen ist arbeitsintensiver als bei den anderen Verfahren.

Von den ersten Vorversuchen her und auch im Hinblick auf routinemäßiges Arbeiten, erschien es am effektivsten, die Tröpfchenmethode als Basis für die Einfriermethode zu nehmen. In alle anderen Methoden hätte zunächst noch viel Grundlagenforschung investiert werden müssen, um vergleichsweise hohe Erfolgsraten zu erhalten.

3.4 Optimierung der Basismethode

3.4.1 Standardisierung der Anzucht des Pflanzenmaterials

Als mit den Einfrierarbeiten begonnen wurde, stellte sich zunächst einmal die Frage, wie die Pflanzen angezogen werden sollen, um optimale Ergebnisse zu liefern, welche Meristeme geeignet sind und wieviel Restmaterial am Meristem bei der Präparation verbleiben kann oder soll.

In Vorversuchen wurde überprüft, wie sich die *in vitro* Pflanzen unter bestimmten Anzuchtbedingungen entwickelten. In Abbildung 8 ist ein Vergleich von 4 verschiedenen Varianten dargestellt. Verglichen wurde Agarmedium mit einem Plastikdeckel als Verschluss, Agarmedium mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen, Steinwolle mit flüssigem Medium und Plastikdeckel als Verschluss und mit Schaumstoffstopfen als Verschluss. Es ist offensichtlich, daß die Pflanzen je nach Behandlung einen anderen Wuchshabitus entwickelten. In den mit Plastikdeckeln verschlossenen Gläsern waren die Sproßblätter klein, die Spitze leicht gekrümmt, während die Pflanzen in den mit Schaumstoffstopfen verschlossenen Gläsern mehr die Morphologie einer Kartoffelpflanze zeigten. Die Unterschiede zwischen flüssigem und festem Medium sind nicht so gravierend. Vom arbeitstechnischen Standpunkt

aus, erfordert die Präparation der Gläser und das Umsetzen der Pflanzen bei beiden Medien etwa gleich viel Zeit, auch die Kosten sind vergleichbar, so daß aus gesundheitlichen Gründen das Agarmedium der Steinwolle vorgezogen wird.

Das ultraschnelle Einfrieren ist am effektivsten, wenn die Gewebestücke sehr klein sind. Die Spitzen in den dicht verschlossenen Gläsern hatten sehr viel kleinere Zellen als die in den gut belüfteten Gläsern. In Einfrierversuchen zeigte sich jedoch, daß die kleinen gekrümmten Spitzen nur eine geringe Überlebensrate hatten.

Für die unter guter Belüftung gewachsenen *in vitro* Pflanzen wurde die Größe ermittelt, bei der eine gute Überlebens-

rate nach dem Einfrieren gewährleistet ist. Sehr kleine Meristeme, wie sie zum Freimachen von Virus präpariert werden, wuchsen auch schon ohne den Einfriervorgang schlecht an. Auch bei größeren Meristemen, die nur den Vegetationskegel und 2-3 Blattprimordien enthielten, gab es schon bei den nicht eingefrorenen Kontrollen Wachstumsprobleme. Eine schnelle Weiterentwicklung der Kontrollmeristeme wurde erreicht, wenn ein Teil des basalen Endes und Teile der umhüllenden Blätter am Explantat belassen wurden (wie in Abbildung 2 gezeigt). Auch beim Einfrieren hatten die größeren Meristeme eine bessere Überlebensrate als sehr kleine. Diese Tatsache vereinfachte die Präparation erheblich, da die Präparation der sehr kleinen Meristeme sehr arbeitsintensiv ist. Von einer eingearbeiteten Kraft können in einer Stunde durchschnittlich 75 Meristeme präpariert werden. Auch die weiteren Arbeitsschritte werden durch die größeren Meristeme erheblich vereinfacht.

Die in Abbildung 8 dargestellten Gläser waren für routinemäßiges Arbeiten zu klein und wurden durch größere Gläser ersetzt, die zum besseren Gasaustausch einen durchbohrten Deckel mit Wattestopfen hatten (Abbildung 1). Vom Durchmesser des Glases her können bis zu 15 Pflänzchen angezogen werden. Es wurde überprüft, ob die Pflanzendichte einen Einfluß auf die Überlebensrate nach dem Auftauen hat.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse von 5 Versuchen mit der Sorte 'Ulster Glade' dargestellt. Wenn 10 Pflanzen pro Glas angezogen wurden, ist die Schwankung von Versuch zu Versuch geringer, als wenn 5 Pflanzen pro Glas angezogen wurden. Die Durchschnittswerte für Überlebensrate und Pflanzenentwicklung stimmen für die 5 Versuche gerechnet jedoch überein. Starke Schwankungen von Versuch zu Versuch wurden zu Beginn der Einfrierverfahren häufig beobachtet. Es könnte sein, daß unterschiedliche Größen und Entwicklungszustände der Sproßspitzen dafür verantwortlich sind. Durch die dichtere Pflanzung in den Gläsern, wird der Habitus der Pflanzen einheitlicher. Seit in den Gläsern 10-15

Versuchsnummer	5 Pflanzen/Gefäß		10 Pflanzen/Gefäß	
	Gesamt %	Pflanzen %	Gesamt %	Pflanzen %
1	60	40	65	57
2	91	87	40	34
3	10	10	49	44
4	35	25	40	40
5	87	53	87	47
Durchschnitt	57	43	56	44
Gesamt %: % Callus + Pflanzenbildung; Pflanzen %: % Pflanzenbildung				

Tabelle 1: **Einfluß der Pflanzendichte auf die Überlebensrate von *S. tuberosum*, Sorte 'Ulster Glade'**

	Spitzen	Nodien	Faktor
Amigo	25 %	6 %	4
Hansa	20 %	4 %	5
Pommerant	60 %	8 %	8
U. Glade	94 %	18 %	5

Tabelle 2: **Vergleich der Pflanzenregeneration von Meristemem aus Sproßspitzen und Nodien nach dem Einfrieren**

Pflanzen herangezogen werden, sind starke Schwankungen von Versuch zu Versuch nicht mehr aufgetreten.

	10 min	1h	2h	3h	4h	17h
Adagin	0	30	70	70	n.b.	n.b.
Aura	n.b.	n.b.	97	n.b.	n.b.	30
Gatcinskii	n.b.	100	100	100	n.b.	n.b.
MPI 50.140/5	n.b.	100	92	100	n.b.	n.b.
R-10	10	90	70	80	90	10
Rys	10	70	80	100	n.b.	n.b.
Durchschnitt	7	78	85	90	(90)	20
Angegeben ist die Überlebensrate = Callus + Pflanzenbildung in %; n.b. = nicht bestimmt						

Tabelle 3: **Einfluß der Länge der DMSO Behandlung auf die Überlebensrate**

Auch wenn in einem Glas bis zu 15 Pflanzen wachsen können, kann die Größe des Kulturraums ein limitierender Faktor sein. Je nach Sorte brauchen die Pflanzen 3-7 Wochen bis sie die Höhe von 10 cm erreicht haben. Wenn routinemäßig eingefroren wird, werden pro Woche mindestens 40 Gläser benötigt. Es muß also mindestens eine gut beleuchtete Fläche von 1.5 m² vorhanden sein, sicherer wäre die doppelte Fläche. Obwohl die Kulturfläche bei den hier dargestellten Versuchen nicht der limitierende Faktor ist, wurde überprüft, ob die Methode auch für Meristeme aus Nodien einsetzbar ist, denn bei der Höhe der Pflanzen könnten aus einer Pflanze bis zu 5 nodale Meristeme präpariert werden.

Wie Tabelle 2 zeigt, ist die Methode zwar auch auf nodale Meristeme anwendbar, jedoch ist die Pflanzenregenerationsrate niedriger als bei apikalen Meristemen. Der Faktor zeigt ganz klar, daß es unwirtschaftlich ist, mit dieser Methode nodale Meristeme einzufrieren, da pro Pflanze weniger nodale Meristeme das Einfrieren überleben, als wenn von vornherein apikale Meristeme eingefroren werden.

3.4.2 Bestimmung der optimalen Einwirkungszeit für die Frostschuttlösung

Als zu Beginn der Experimente starke Schwankungen von Versuch zu Versuch auftraten, die sich auch in dem in Tabelle 1 dargestellten Versuch mit der Sorte 'Ulster Glade' reproduzieren ließen, lag die Vermutung nahe, daß die Einwirkungszeit für die DMSO-Lösung nicht für alle Meristemgrößen optimal ist. Es gibt in der Literatur keine Hinweise, wie schnell das DMSO in das Zellsystem eindringt und in welchem Stadium der Frostschutz optimal ist. In der Literatur variiert die Inkubationszeit zwischen 30 min und 1 h. Towill (1981a) schreibt, daß eine 1-3stündige Inkubation bei Zimmertemperatur nicht toxisch ist und 1983, daß schon 10 sec Einwirkungszeit für eine hohe Überlebensrate ausreichend war. Mikroskopische Arbeiten von Towill (1981b) und Grount und Henshaw (1980) zeigten, daß im Meristem nur einige wenige Zellen das Einfrieren überlebten. Da die meisten Arbeitsgruppen kleinere Meristeme als hier beschrieben verwendeten, wurden unter sonst beibehaltenen Standardbedingungen verschiedene Inkubationszeiten bei verschiedenen Sorten getestet.

In Tabelle 3 sind die Überlebensraten der Meristeme, die unterschiedlich lange Zeiten mit 10 %

iger DMSO Lösung behandelt worden waren, nach dem Einfrieren dargestellt. Tabelle 3 zeigt klar, daß kurze Inkubationszeiten (10 min) nicht ausreichend sind und eine Inkubation über Nacht (17 h) zu lang ist. Die Werte für 1-3 h - bis auf eine Ausnahme - bzw. auch der Wert für 4 h bei einem Versuch sind bei allen Versuchen vergleichbar hoch und liegen innerhalb der üblichen Schwankungsbreite. Ob bei der Sorte 'Adagin' der Wert für 1 h Inkubation ein Ausreißer ist, wurde nicht weiter untersucht. Durch diese Experimente mit verschiedenen Sorten wird klar, daß es für die DMSO Behandlung ein breites Optimum gibt. Als Folgerung daraus ist es gerechtfertigt, 100-200 Meristeme nach einer Inkubationszeit von 2 h portionsweise einzufrieren, wofür je nach Sorte 20 bis 45 min erforderlich sind.

3.4.3 Versuche, die Pflanzenregeneration zu optimieren

Bis jetzt gelingt es noch nicht, die Meristeme so einzufrieren, daß sie nach dem Auftauen wie die uneingefrorenen Meristeme weiterwachsen. Wenn es stimmt, daß nur wenige Zellen innerhalb des Vegetationskegels das Einfrieren überleben, ist es notwendig, daß diese überlebenden Zellen durch Phytohormone zur Zellteilung und Sproßbildung angeregt werden müssen. Diese Stimulation sollte schnell und gezielt erfolgen, weil verhindert werden muß, daß sich die Zellen durch zu lange Kulturdauer verändern.

Das hier verwendete MSTo Medium liefert für einige Sorten gute Pflanzenregenerationsraten, ist aber für einige Sorten nicht optimal. Darüber hinaus hat das MSTo Medium eine Konzentration und Kombination von Phytohormonen, die die Callusbildung fördert. Dieser Callus tritt bei den meisten Sorten nur als Primärcallus auf, d.h. er wächst im Laufe der Kultur nicht weiter. Es besteht aber trotzdem die Gefahr, daß genetische Veränderungen durch somaklonale Variation auftreten können.

Henshaw et al. (1985) verwendeten ein Medium mit sehr geringer Konzentration an Phytohormonen (0.001 mg/l Naphthylthylsäure, 0,01 mg/l BA, 5 mg/l GA₃), während das MSTo eine sehr viel höhere Konzentration an Auxinen und Cytokinen enthält. In mehreren Experimenten wurden die beiden Medien verglichen.

Auf dem Medium von Henshaw et al. (1985) entwickelten sich die Sprosse ohne Primärcallusbildung, jedoch war die Regenerationsrate sehr niedrig. Auch mit dem MSTo Medium entwickelten sich Pflanzen ohne Callusbildung, in der Regel jedoch zuerst Callus. Die Anzahl der spontan gebildeten Sprosse war auf beiden Medien etwa gleich hoch. Zusätzlich zu den sofort regenerierten Pflanzen entwickelten sich auf dem MSTo Pflanzen aus den Primärcalli. Die Eigenschaft, aus einem einmal angelegten Callus eine Pflanze zu regenerieren, war sortenabhängig. Calli, die Anthocyane produzierten, wurden nach kurzer Zeit braun und differenzierten sich nicht weiter. Das Braunwerden von Calli kann manchmal durch einen Zusatz von Aktivkohle zum Medium verhindert werden. Allerdings ist dabei zu beachten, daß Aktivkohle Vitamine und Phytohormone binden kann.

In einer Serie von Versuchen wurde die Aktivkohle nur der Agarose zugesetzt, in der die Meristeme eingebettet waren. Das umgebende Medium enthielt keine Aktivkohle, so daß noch Nährstoffe und Phytohormone verfügbar waren. In diesen Versuchen wurde in einem Teil des Versuchsansatzes das MSTo Medium durch MSA Medium ersetzt, das 1 mg/l BA und 0,5 mg/l IAA enthielt. Die Ergebnisse sind nicht tabellarisch dargestellt, denn es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den 4 Varianten festgestellt, weder bei den Überlebensraten, noch bei der Pflanzenbildung oder dem Phänotyp der regenerierten Pflanzen. Sorten, bei denen sich mit dem MSTo Medium keine oder nur schlecht Pflanzen bildeten, wurden nicht durch den Aktivkohlezusatz und/oder das andere Medium positiv beeinflusst.

Sorte	Überlebensrate	Pflanzenbildung			
		AK	fr. MSTo	fr. MSB	MSTo
CF-69-1	100	0	0	10	0
MPI BH 17	83	0	0	38	0
Paarsput	85	0	22	63	25
Peconic	88	0	0	29	14
Rys	91	0	14	57	42
U. Glade	75	13	38	86	86
Varmas	100	10	30	70	50

Die Werte sind in % angegeben.
 Behandlungsstufen: AK = Aktivkohlemedium; fr. MSTo = frisches MSTo Medium; fr. MSB = frisches MSB Medium; MSTo = bleibt unverändert.

Der Versuchsansatz wurde abgeändert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Meristeme wurden nach dem üblichen Protokoll eingefroren und nach dem Auftauen in MSTo kultiviert. Nach 2 Wochen wurde die Überlebensrate (Callus + Pflanzen) bestimmt. Die Calli wurden auf 4 Versuchsglieder aufgeteilt. Bis zu diesem Zeitpunkt schon gebildete Pflanzen wurden nicht weiterkultiviert. Ein Viertel der Calli wurde auf Aktivkohlemedium umgesetzt. Dazu wurde der Boden von 3 cm Petrischalen mit 1,5 ml Agarose, der 2 % Aktivkohle zugesetzt war, ausgegossen. Die Calli wurden auf die Agarose gesetzt. Auf die Agarose wurde MSTo Medium pipettiert.

Tabelle 4: Einfluß eines Medienwechsels nach 14 Tagen Kulturdauer auf die Pflanzenbildungsrate von eingefrorenen Meristemen

Bei dem zweiten Versuchsglied wurde das MSTo Medium gegen 1 ml frisches MSTo Medium ausgetauscht. Beim 3. Versuchsglied wurde das MSTo Medium gegen 1 ml MSB Medium ausgetauscht. Das MSB Medium ist wie das MSTo Medium zusammengesetzt, enthält aber kein IAA. Das vierte Versuchsglied blieb unverändert.

Die Überlebensrate nach 14 Tagen Kulturdauer ist bei allen getesteten Sorten hoch. Vereinzelt trat nach 2 Wochen Kulturdauer Pflanzenbildung auf. Wenn die Calli auf Aktivkohlemedium umgesetzt wurden, bildete sich nur bei den Sorten 'Ulster Glade' und 'Varmas' eine Pflanze. Wurde das MSTo Medium gegen frisches MSTo Medium ausgetauscht, war die Pflanzenbildungsrate etwas höher als auf dem Aktivkohlemedium, jedoch geringer, als wenn das Medium nicht ausgetauscht worden war (4. Versuchsglied). Bei Sorten, die eine niedrige Pflanzenbildungsrate auf dem MSTo Medium haben, konnten mehr Pflanzen erhalten werden, wenn das Medium nach 2 Wochen gegen ein Medium ohne Auxine ausgetauscht wurde (3. Versuchsglied). Bei 'CF-69-1' wurde so zum 1. Mal eine Pflanze regeneriert. Bei der Sorte 'Paarsput' wurde eine signifikante Steigerung erhalten. Bei Sorten, die auf dem MSTo Medium gut Pflanzen regenerieren, wird keine Steigerung erzielt, wenn das Medium gegen auxinfreies Medium ausgetauscht wird. Entsprechende Versuche mit anderen Hormonzusammensetzungen werden zur Zeit durchgeführt.

Vom arbeitstechnischen Standpunkt aus gesehen ist es - bis ein optimaleres Medium gefunden wurde - für Routinearbeiten günstiger, die Anzucht nach dem Auftauen zunächst auf dem MSTo Medium durchzuführen. In Fällen, wenn keine Pflanzen oder erst sehr spät Pflanzen gebildet werden, kann man versuchen, Pflanzen zu bekommen, indem man das Medium nach 2 Wochen gegen ein auxinfreies Medium austauscht.

3.5 Einfrierversuche mit 62 Sorten

In Abbildung 9 sind die Sorten aufgelistet, die bis jetzt mit der Tröpfchenmethode eingefroren wurden. Die Versuche wurden nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt. Die Sorten wurden zwar zufällig ausgewählt, jedoch wurden nur gesunde Pflanzen für die Meristemengewinnung in Kultur genommen und nur solche weitervermehrt, die in vitro gut wuchsen. Für das Einfrieren wurden nur die Meristeme verwendet, die nach der Vorinkubation nicht vollständig braun waren. Wenn nur die Schnittstelle braun war, was bei manchen Sorten häufiger vorkam, wurden sie dennoch eingefroren. Wenn die Meristeme in der Größe variierten, wurden sie gleichmäßig auf die Folien verteilt. Nach dem Auftauen wurden die Meristeme kultiviert und lediglich beobachtet. Das Medium wurde nicht ausgetauscht, auch dann nicht, wenn Petrischalen aus welchen Gründen auch immer austrockneten. Pflanzen, die ausgepflanzt wurden, unterlagen der üblichen Gewächshausroutine. Die angegebenen Werte sind in der Regel Durchschnittswerte aus 3 Versuchen. Bei lediglich 5 Sorten wurde der Durchschnitt aus 2 Versuchen ermittelt.

Wie Abbildung 9 zeigt, ist die Überlebensrate (Callus + Pflanzenbildung) nach dem Einfrieren mit der Tröpfchenmethode hoch. Von den 62 Sorten haben 37 Sorten eine Überlebensrate von mindestens 75 % und insgesamt 58 Sorten eine Überlebensrate von mindestens 50 %. 3 Sorten liegen über 40 %. Nur eine Sorte ('Judika') hat eine sehr niedrige Überlebensrate von 13 %.

Die Regeneration von Pflanzen nach dem Einfrieren ist geringer. Von den 62 Sorten haben 13 Sorten eine Pflanzenbildungsrate von durchschnittlich 50 %. Weitere 24 Sorten bilden durchschnittlich mindestens zu 25 % Pflanzen (Bereich 25-50 %). Weitere 18 Sorten regenerieren mindestens 1 Pflanze pro aufgetautem Kryoröhrchen (Bereich 10-25 %). Nur 7 Sorten haben eine sehr geringe Pflanzenregenerationsrate.

Bei der Kryokonservierung spielen zwei Faktoren eine wesentliche Rolle, das ist einmal der Einfriervorgang selbst und zum anderen der sich daran anschließende Regenerationsvorgang. Von der Seite des Einfrierens her ermöglicht die verwendete Methode, bis auf die Ausnahme 'Judika', das Überleben von wenigstens einigen Zellen oder Zellverbänden von einem breiten Spektrum verschiedener Kartoffelsorten, wie durch die hohen Überlebensraten dokumentiert ist. Der zweite Schritt, die Regeneration, ist dagegen sortenabhängiger. Es ist ohne Zweifel möglich, bei vielen Sorten die Pflanzenregenerationsrate allein dadurch zu steigern, daß man in fast ausgetrocknete Petrischalen wieder Medium nachfüllt. Dies ist aber nur eine mehr rechnerische Prozenzterhöhung. In der Praxis wird es eher so ablaufen, daß man die ersten Pflanzen vermehrt und weiter verwendet und nicht abwartet bis sich auch aus den letzten Calli Pflanzen entwickeln. Von Sorten mit geringer Pflanzenregenerationsrate auf dem MSTo Medium kann man eventuell mehr Pflanzen erhalten, wenn man entweder Medien mit anderen Phytohormonkombinationen und -konzentrationen einsetzt oder indem man nach einer Kulturdauer von zwei Wochen das Medium gegen ein Medium mit weniger Auxinen austauscht (s. Punkt 3.4.3).

Vom praktischen Standpunkt aus gesehen hat sich im Verlauf der Versuche folgende Routine entwickelt. 15-20 Sorten werden auf eine Stärke von 150-200 in vitro Pflanzen vermehrt. Von den Sorten werden in 3 Ansätzen Meristeme präpariert, d.h. ca. 30 Röhrchen mit 12 Meristemen. Von jedem Ansatz wird ein Röhrchen kultiviert, so daß man bei der nächsten Präparation schon eine Vorstellung davon hat, wie gut die Sorte das Einfrieren überlebt, wie hoch in etwa die zu erwartende Pflanzenregeneration ist und ob es sich vielleicht um problematische Sorten handelt, die z.B. Anthocyane bilden. Bei Sorten, die verhältnismäßig schnell Pflanzen bilden, wird der Vorgang noch 2mal wiederholt, bei Sorten, die nicht gut regenerieren 4mal. So ist gewährleistet, daß von den Sorten Pflanzen nach dem Auftauen erhalten werden.

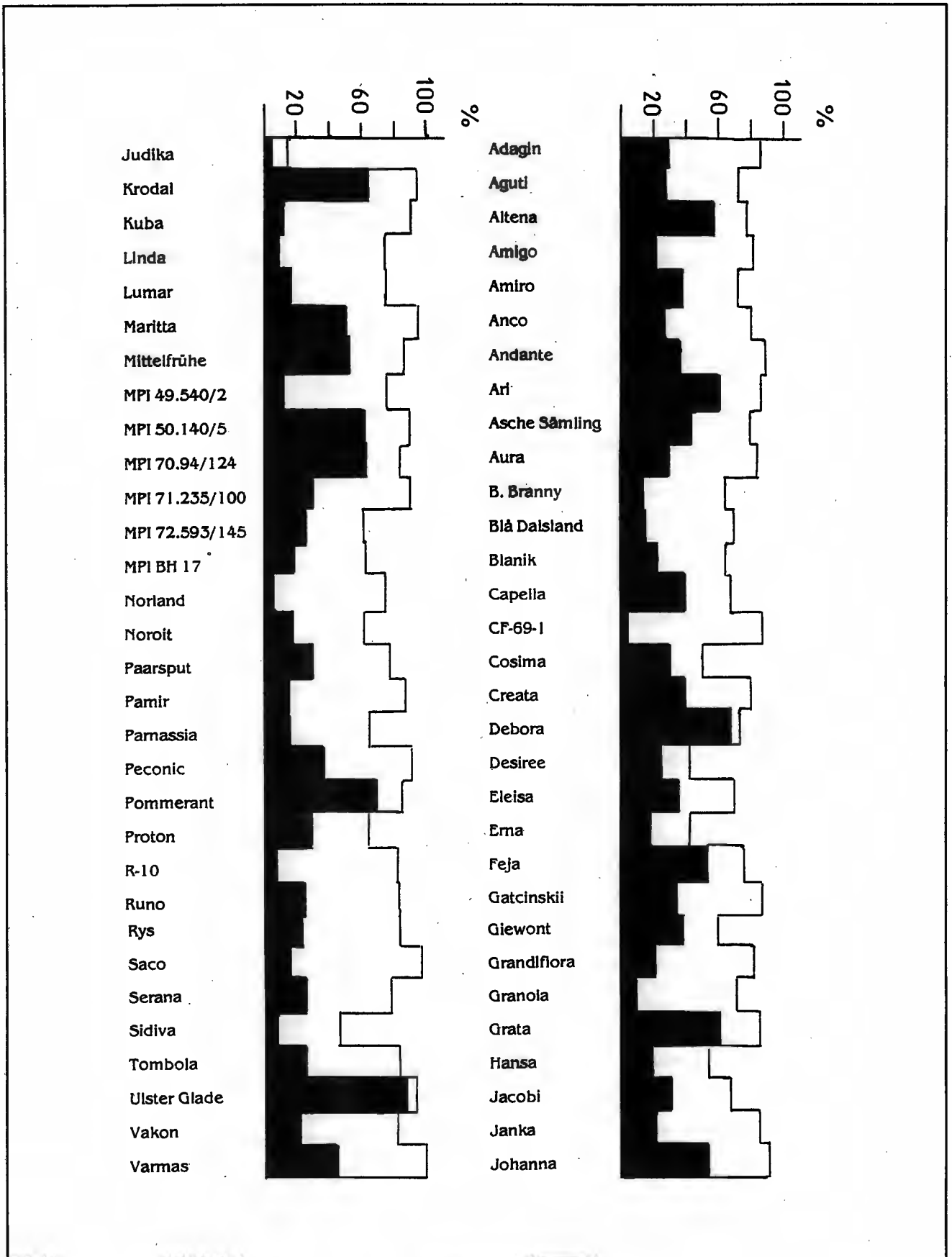


Abbildung 9: Vergleich der Überlebensrate von 62 Kartoffelsorten
 Überlebensrate (Callus + Pflanzenbildung) weiß, Pflanzenbildung schwarz

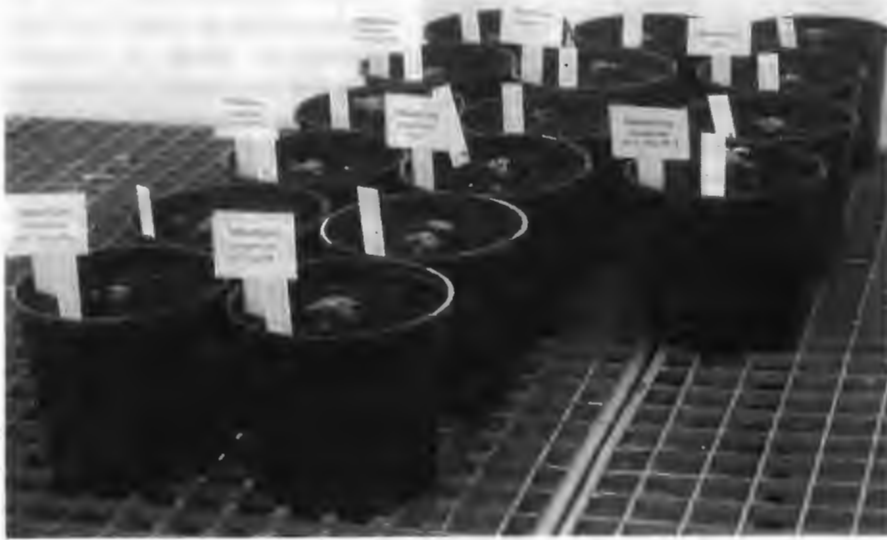


Abbildung 10 a: Überprüfung des Phänotyps des eingefrorenen Materials: Beispiel Sorte 'Mittelfrühe'/direkt nach dem Austopfen



Abbildung 10 b: Überprüfung des Phänotyps des eingefrorenen Materials: Beispiel Sorte 'Mittelfrühe'/adulte Pflanzen

3.6 Überprüfung des Phänotyps des eingefrorenen Materials

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie die aus eingefrorenen Meristemen regenerierten Pflanzen aussehen, wurden sie in Töpfe ausgepflanzt und mit *in vitro* Pflanzen, die nicht eingefroren waren, verglichen. Von den 62 Sorten wurden inzwischen 57 Sorten ausgepflanzt. Zur Dokumentation wurden Fotos von verschiedenen Entwicklungsstadien gemacht. Als Beispiel ist die Sorte 'Mittelfrühe' in Abbildung

10 dargestellt. Von den inzwischen schon geernteten 47 Sorten wurden die Knollen von 26 Sorten ein zweites Mal ausgepflanzt und geerntet.

Generell kann gesagt werden, daß Unterschiede im Phänotyp bei ausgetopften Pflanzen nur äußerst selten zu beobachten waren. Auf der Stufe von *in vitro* Pflanzen wurden einige Pflanzen erhalten, die sich nicht richtig weiterentwickelten und deshalb nicht ausgetopft wurden. Von den Sorten 'Ulster Glade', 'Pommerant', 'Asche Sämling' und 'Ari' überlebten jeweils die Klone einer regenerierten Pflanze die Überführung in Erde nicht. Lediglich bei 'Granola' hatte eine Pflanze den Phänotyp einer polyploiden Pflanze. Einzig bei der Sorte 'Rys' treten bei zwei Pflanzen Unterschiede zum Habitus der Kontrollpflanze auf. Sowohl bei 'Granola' als auch bei 'Rys' handelte es sich um Pflanzen, die erst sehr spät nach langer Kulturdauer regenerierten. Die Änderungen im Phänotyp waren 3-4 Wochen nach dem Auspflanzen zu sehen.

Um sicher zu gehen, daß nur unveränderte Sorten abgegeben werden, sollte man nach dem Auftauen nur die Pflanzen weitervermehrten, die sich nach kurzer Kulturdauer entwickeln. Bei allen Ansätzen wurde ohne Ausnahme beobachtet, daß diese Pflanzen gut wachsen und auch beim Austopfen ohne Probleme anwachsen.

Zwar sind die beobachteten phänotypischen Abweichungen sehr selten aber dadurch, daß sie auftreten und weil damit zu rechnen ist, daß sie auftreten, ist es notwendig, die genetische Stabilität auf molekularer Ebene zu überprüfen. Parallel

dazu soll der Ploidiegrad durch cytophotometrische Messungen bestimmt werden.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen eines gemeinsamen Projekts von Institut für Pflanzenbau (FAL) und DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH soll überprüft werden, ob die Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten, die als *in vitro* Sammlung erhalten werden, in flüssigem Stickstoff möglich ist. Geeignetes Material zum Einfrieren sind Meristeme, da sie

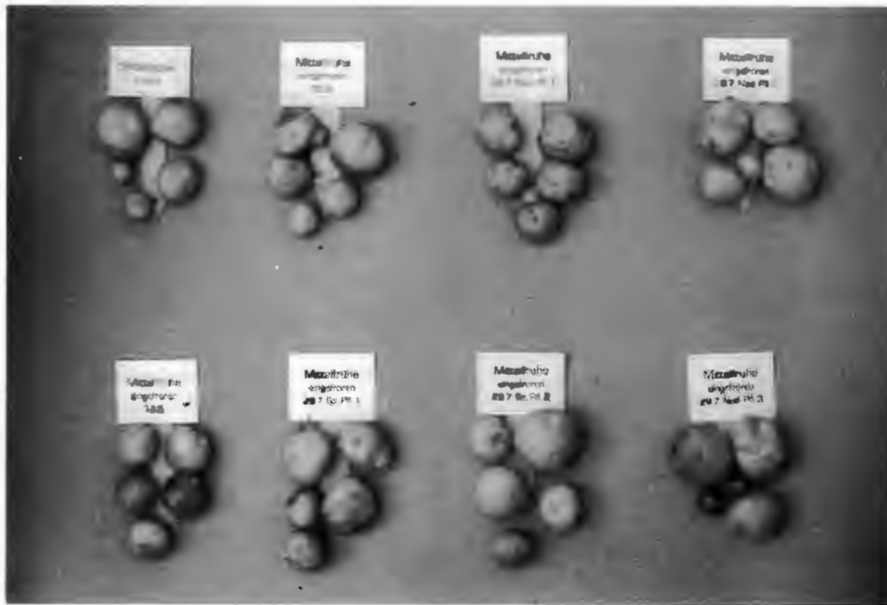


Abbildung 10 c: Überprüfung des Phänotyps des eingefrorenen Materials: Beispiel Sorte 'Mittelfrühe'/1. Ernte

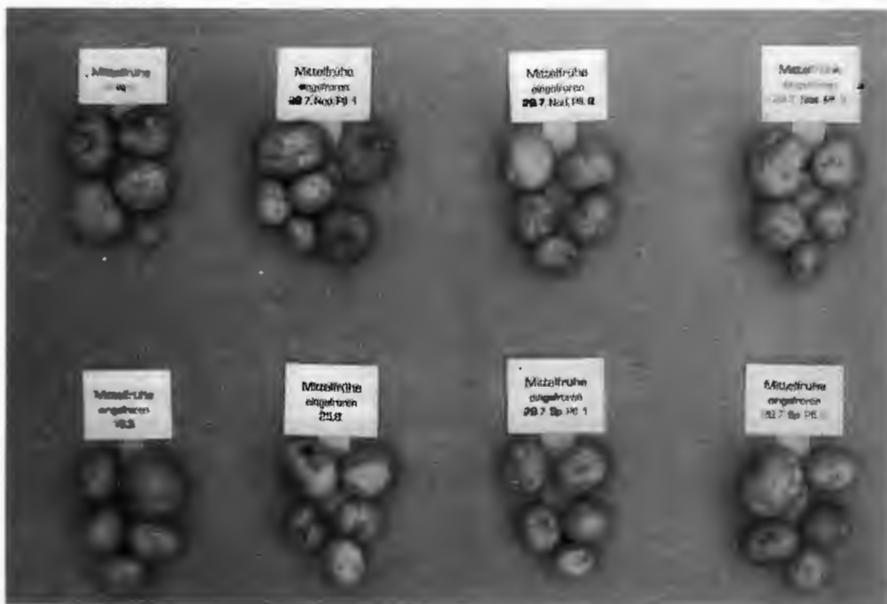


Abbildung 10 d: Überprüfung des Phänotyps des eingefrorenen Materials: Beispiel Sorte 'Mittelfrühe'/2. Ernte

leicht zu identischen Pflanzen regenerieren und von der kryo-technischen Seite her das Einfrieren und Auftauen besser überleben als vakuolisiertes Gewebe.

Bei einem Vergleich verschiedener in der Literatur beschriebenen Methoden zeigte es sich, daß die Meristeme bei sehr schnellem Einfrieren in flüssigem Stickstoff am besten überlebten. Die "Tröpfchenmethode" von K a r t h a et al. (1982) wurde für die Anwendung in einer Sammlung pflanzen-genetischer Ressourcen modifiziert. Bei dieser Methode

werden apikale Meristeme in kleinen Tropfen Frostschutzmittel (10 % Dimethylsulfoxid in Medium) auf Aluminiumfolie direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur übersichtlichen Lagerung werden die Streifen in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt, die in Stickstofftanks gelagert werden. Die Methode ist einfach, kostengünstig und hat einen verhältnismäßig hohen Probendurchsatz.

Inzwischen wurde ein Spektrum von 62 Sorten eingefroren. Die Überlebensrate (Callus + Pflanzenbildung) der Meristeme nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff ist hoch. 37 Sorten haben eine Überlebensrate von mindestens 75 % und insgesamt 58 Sorten eine Überlebensrate von mindestens 50 %. Die Regeneration von Pflanzen nach dem Einfrieren ist zwar geringer, liegt aber bei 13 Sorten bei mindestens 50 % und bei weiteren 24 Sorten im Bereich 25 - 50 %. Weitere 18 Sorten regenerieren mindestens 1 Pflanze pro aufgetautem Kryoröhrchen. Nur 7 Sorten haben eine sehr geringe Regenerationsrate. Die Ausbeute an Pflanzen könnte durch andere Regenerationsmedien erhöht werden.

Von den 62 Sorten wurden 57 Sorten ausgepflanzt, von denen 40 Sorten inzwischen geerntet wurden. Von 26 Sorten wurden die Knollen ein zweites Mal geerntet. Unterschiede im Phänotyp im Vergleich zu nicht eingefrorenen Kontrollpflanzen wurden nur äußerst selten beobachtet.

Long-term Storage of Old Potato Varieties by Cryopreservation of Meristems in Liquid Nitrogen

In the frame of a joint research project of the Institute of Crop Science (FAL) and DSM-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures it is investigated whether the long-term storage of old potato varieties kept as an *in vitro* collection is possible in liquid nitrogen. Suitable material for freezing are meristems, because they readily regenerate into identical plants. From a cryogenic point of view they survive better freezing and thawing than vacuolated tissue.

A comparison of different methods published showed that the meristems survive best by ultra rapid freezing in liquid ni-

trogen. The 'droplet' method of K a r t h a et al. (1982) was modified for an application in a collection of plant genetic resources. With this method apical meristems are placed in small droplets of cryoprotectant (10 % dimethylsulfoxide in medium) supported by an aluminium foil. The foils are plunged directly in liquid nitrogen. For a clearly arranged storage system the foils are transferred to precooled cryo vials which are stored in liquid nitrogen containers. The method is simple, does not require expensive equipment and has a fairly high passage of samples.

In the meantime a spectrum of 62 varieties has been frozen. The survival rate (callus + plant production) of meristems is high after freezing in liquid nitrogen. 37 varieties have a survival rate of at least 75 % and all together 58 varieties have a survival rate of at least 50 %. The regeneration of plants after freezing is lower, but still 13 varieties have a rate of at least 50 % and further 24 varieties are in the range 25-50 %. Further 18 varieties regenerate at least 1 plant per thawed cryo vial. Only 7 varieties have a much too low regeneration rate. The yield of plants could possibly be raised by using other regeneration media.

57 varieties have been planted out. 40 of them have been harvested in the meantime. Tubers of 22 varieties have been harvested a second time. Differences of the phenotype when compared to control plants were extremely rare.

Danksagung

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministers für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung über den International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) gefördert. Wir danken Dr. E.E. Benson für wertvolle Hinweise bei der Entwicklung der Tröpfchenmethode. Besonderer Dank gilt Frau Ellruth Müller für ihre exzellente technische Assistenz.

Literatur

B a j a j, Y.P.S.: Tuberization in potato plants regenerated from freeze-preserved meristems. - Crop Improvement 5 (1978), S. 137.

B a j a j, Y.P.S.: Regeneration of plants from potato meristems freeze-preserved for 24 months. - Euphytica 30 (1981), S. 141-145.

B e n s o n, E.E.; H a r d i n g, K. and S m i t h, H.: Variation in recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre- and post-freeze light regimes. - Cryoletters 10 (1989), S. 323-344.

F a b r e, J. and D e r e u d d r e, J.: Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. - Cryoletters 11 (1990), S. 413-426.

G r o u t, B.W. and H e n s h a w, G.G.: Freeze-preservation of potato shoot-tip cultures. - Annals of Botany 42 (1978), S. 1227-1229.

G r o u t, B.W. and H e n s h a w, G.G.: Structural observations on the growth of potato shoot-tips cultures after thawing from liquid nitrogen. - Annals of Botany 46 (1980), S. 243-248.

H a r d i n g, K.; B e n s o n, E.E. and S m i t h, H.: The effects of pre-freeze in vitro culture period on the recovery of cryopreserved shoot tips of *Solanum tuberosum*. - Cryoletters 12 (1991), S. 17-22.

H e n s h a w, G.G.; K e e f e, D.P. and O ' H a r a, J.F.: Cryo-preservation of potato meristems. - S c h ä f e r - M e n u h r, A. ed. In vitro techniques: propagation and long term storage. Martinus Nijhoff/Junk Publishers, Dordrecht for CEC (1985), S. 155-160.

K a r t h a, K.K.; L e u n g, N.L. and M r o g i n s k y, L.A.: In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). - Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 107 (1982), S. 133-140.

M i x - W a g n e r, G.: In vitro Erhaltung pflanzengenetischer Ressourcen. - Proceedings "Sicherung und Nutzbarmachung pflanzengenetischer Ressourcen", Gatersleben (1990), S. 72-83.

M i x - W a g n e r, G. und S e i d e w i t z, L.: Evaluierungsdaten "Old Potato Varieties" - Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der FAL (1991).

M u r a s h i g e, T. and S k o o g, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - Physiologia plantarum 15 (1962), S. 473-497.

S c h n a b e l - P r e i k s t a s, B.; E a r l e, E.D. and S t e p o n u s, P.: Cryopreservation of potato shoot-tips by vitrification. - Twenty-Ninth Annual Meeting of the Society for Cryobiology. Ithaca, New York, 14-19 June, 1992, S.48.

T o w i l l, L.E.: *Solanum tuberosum*: A model for studying the cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing *Solanum* species. - Plant Science Letters 20 (1981a), S. 315-324.

T o w i l l, L.E.: Survival at low temperatures of shoot-tips from cultivars of *solanum tuberosum* group *tuberosum*. - Cryo-Letters 2 (1981b), S. 373-382.

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

T o w i l l, L.E.: Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *solanum tuberosum* groups *andigena*, *pbureja*, *stenotomum*, *tuberosum*, and other tuber-bearing *solanum* species. - Cryo-Letters 5 (1984), S. 319-326.

T o w i l l, L.E.: Cryopreservation of shoot-tips by vitrification. - VII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, 24-29 June, 1990, S.378.

Verfasser: S c h ä f e r - M e n u h r, Angelika, Dr. agr.; S c h u m a c h e r, Heinz-Martin, Dr. rer. nat., DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; M i x - W a g n e r, Gunda, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Komm. Leiter: Prof. Dr. Dr. Jean C. M u n c h.