LANDBAUFORSCHUNG VÖLKENRODE, 43. JAHRGANG (1993), HEFT 2/3, SEITE 93 - 100

In-vitro-Vermehrung von Weißem Yam *(Dioscorea rotundata* Poir.) und Taro *(Colocasia esculenta* L.) zur Pflanzguterzeugung

GUNDA MIX-WAGNER

Institut für Pflanzenbau

1. Einleitung

Von den Pflanzenarten, die hauptsächlich Stärke als Reservematerial in ihren unterirdischen Speicherorganen enthalten, sind nur vier Arten bzw. Gattungen als Nahrungs- und Futtermittel weltweit von großer Bedeutung: Kartoffel *(Solanum* spp.*)*, Maniok *(Manihot esculenta* L.*)*, Batate *(Ipomoea batata* L.*)* und Yam *(Dioscorea).*

Andere knollentragende Pflanzenarten, wie z.B. *Colocasia esculenta* (Taro) und *Maranta arundinacea* (Pfeilwurz), sind zwar überall in den Tropen verbreitet, aber wirtschaftlich nur dann von lokaler Bedeutung, wenn sie die einzigen Nahrungspflanzen darstellen.

Die knollentragenden Pflanzenarten Yam *(Dioscorea rotundata* Poir.*)* und Taro *(Colocasia esculenta* L.*)* werden hauptsächlich vegetativ vermehrt. Sie werden schon seit Jahrhunderten kultiviert, so daß es zahlreiche Varietäten gibt, die sich durch Form, Farbe, Geschmack und Kocheigenschaften unterscheiden.

Bisher findet keine planmäßige züchterische Bearbeitung dieser Arten statt, um z.B. den Ertrag und die Krankheitsresistenz positiv zu beeinflussen.

Ein erster Schritt in diese Richtung wäre eine gezielte Pflanzguterzeugung bzw. -bereitstellung, damit vorselektiertes und gesundes Material zum Anbau kommt. Dazu ist es auch notwendig, die Pflanzguterzeugung von dem Anbau der Konsumware - die Vegetationszeit beträgt bis zu 10 Monate - zu trennen. Eine wesentliche Hilfe bei dem Aufbau einer Pflanzguterzeugung und auch für eine Erhaltungszüchtung wäre die Anwendung der In-vitro-Vermehrung.

In der vorliegenden Arbeit wird über Ergebnisse von Untersuchungen zur In-vitro-Vermehrung von Yam *(Dioscorea rotundata* Poir.*)* und Taro *(Colocasia esculenta* L.*)* berichtet.

2. Kurzbeschreibung der Yamgewächse und bisherige In-vitro-Arbeiten mit dieser Artengruppe

Die Dioscoreaarten (Yamgewächse) sind monokotyle sich windende Stauden. Von den etwa 600 Arten, die in den Tropen und Subtropen aller Erdteile verbreitet sind, werden etwa zehn in größerem Ausmaß in Afrika angebaut. Die meisten der kultivierten Yamarten erzeugen Wurzelknollen, die aus sproßbürtigen Wurzeln der Stengelbasis entstehen. Es kommen aber auch Sproßknollen und Rhizome vor.

Der Weiße Yam *(Dioscorea rotundata* Poir.*)* ist in einigen Ländern des tropischen Westafrikas das Grundnahrungsmittel. Die vielen vorhandenen selektierten Genotypen haben eine Wachstumszeit von 6-10 Monaten. Die Yamkultur erfordert sehr viel Handarbeit, zu der auch die Pflanzgutbereitstellung gehört. Die Vermehrung erfolgt vegetativ in Form von Tochterknollen, die sich nach der Ernte der großen Knollen (bis 20 kg) am abgetrennten in der Erde liegenden Knollenkopf nach 6-8 Wochen bilden und dann geerntet werden (Franke, 1989; Rehm et al., 1976).

Bei einigen Dioscorea-Arten, wie z.B. D. alata und D. bulbifera konnten In-vitro-Techniken erarbeitet und mit Erfolg auch schon angewandt werden (Brinks, 1992). Bei D. rotundata Poir. dagegen waren die Erfolge bisher sehr gering. Mantell und Mitarbeiter berichteten 1978 von ersten Versuchen einer In-vitro-Vermehrungsmethode für *D. rotundata* Poir. Aus nodalen Segmenten konnten aber nur vereinzelt Sproß- und Mikroknollen induziert werden, wenn die Tageslänge und der Saccharosegehalt im Nährboden optimal abgestimmt waren (Ng, 1988).

2.1 *Dioscorea rotundata* Poir.

2.1.1 Material und Methoden

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte aus einer Herkunft, die von der 'Nyankpala Agricultural Experiment Station' (Ghana) zur Verfügung gestellt wurde. Jede Knolle wurde in einen mit Erde gefüllten 12 l Plastikeimer gelegt. Die sich entwickelnden Stauden wuchsen während des Sommers im Gewächshaus. Die Temperatur betrug während des Tages etwa 30° C und nachts 22° C.

In Kultur genommen wurden die Nodien mit Achselknospen und nur die Sproßspitzen, die keine Blütenstände gebildet hatten.

Vor der Kultivierung der Nodien und Sproßspitzen erfolgte eine oberflächliche Desinfektion des Gewebes für 15 Minuten in einer 2 %igen Calciumhypochloridlösung. Anschließend wurde mehrmals mit einer Zitronensäurelösung (100 mg/l) gespült und um die Braunfärbung der Schnittflächen zu vermeiden, wurden die Gewebeteile bis zum Auflegen auf die Nährböden in dieser Lösung belassen.

Die Gewebeteile wurden immer größer, als dann für die Kultur notwendig, von den Spenderpflanzen entnommen, damit nach der Desinfektion das durch das Calciumhypochlorid geschädigte Gewebe (Schnittflächen) entfernt werden konnte.

Die Nährböden für die Nodien- und Sproßspitzenkultur basierten auf dem Murashige und Skoog Grundnährboden (1962). Die Zusammensetzung der getesteten Nährböden

Tabelle 1: **Zusammensetzung der Nährböden und deren pH-Werte**
Composition of the media and their pH values

Nährboden	BAP**	Kin	NES**	C C C*	Thiamin** H Cl	L-cystein**	my-o-** Inositol	Zucker*	pH-Wert
D1					1		100	20	5,8
D2	0,01		0,1	1			100	20	5,8
D3		0,5				20		20	5,7
D4		0,5				20		50	5,7
D5		0,5				20		50	6,2
D6		0,5				20		50	5,4
D7	2		2	100				80	5,0
D8	2			100				80	5,0

BAP - 6-Benzylaminopurin
Kin - 6-Fufurylaminpurin
NES - 1-Naphthylessigsäure
C C C - Chlorcholinchlorid

* g/l
** mg/l

ist in Tabelle 1 (D1-6) wiedergegeben. Allen Nährböden wurde Saccharose in unterschiedlichen Konzentrationen und 7,5 g/l Agar, wenn nicht anders beschrieben, zugesetzt. Die Nährböden wurden vor dem Autoklavieren auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt (Tabelle 1). Die Kultur der Nodien bzw. Sproßspitzen erfolgte bei 25° C in einem 12h Tag bei einer Lichtintensität von 4-6 klx. Diese Bedingungen wurden während der Dauer der In-vitro-Kultur beibehalten.

Nachdem sich Pflanzen mit 3-4 Blättern aus den Achselknospen entwickelt hatten, wurde das jeweilige Explantat entfernt und die Sprosse auf die Nährböden D6-8 (Tabelle1) aufgesetzt.

In den Kulturgefäßen (9 cm Höhe und 5 cm Durchmesser) dienten entweder Agar (7,5 g/l) oder Steinwolle als Festigungssubstrat. In jedem Gefäß befanden sich zwei Lagen (2 cm) Steinwolle und 60 ml Nährlösung (D6-8). Die Steinwolle muß von der Nährlösung durchtränkt, aber nicht überdeckt werden.

Die Übertragung der In-vitro-Pflanzen in Erde machte keine Schwierigkeiten, vorausgesetzt, die Pflanzen wurden während der ersten Tage in einer Umgebung mit hoher Luftfeuchtigkeit gehalten.

2.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Aus den Achselknospen und Sproßspitzen konnten Pflanzen mit gut ausgebildetem Wurzelsystem entwickelt werden. Neben dieser vegetativen Vermehrung des Materials wurde ebenfalls der für Dioscorea rotundata beschriebene Nährboden (Ng, 1990), getestet.

Insgesamt wurden 50 Nodien bzw. Sproßspitzen auf jeden der vier Nährböden (Tab.1, D1-4) aufgelegt. Die Zusammensetzung des Nährbodens D1 basierte auf den Erfahrungen mit den Vermehrungsnährböden für Kartoffel (Mix, 1984), jedoch zeigte sich, daß auf einem hormonfreien Nährboden Monokotyle wie Yam eine sehr schlechte Sproßregeneration (9 %) aus Achselknospen gegenüber der dikotylen Kartoffel (95 %) zeigten. Wurden dem Nährboden 6-Benzylaminopurin (BAP) und 1-Naphthylessigsäure (NES) zugesetzt (D2), dann ließ sich die Regenerationsrate um 71 % auf 80 % steigern. Durch die Erhöhung der Konzentration von BAP und NES im Nährboden (D7, D8) konnte eine Vielfachsproßbildung ausgelöst werden. Die Nährböden D3 und D4, mit der Zusammensetzung wie bei Ng (1990) für Yam beschrieben, wurden ebenfalls auf ihre Einsetzbarkeit für den zu testenden Genotypen mit aufgenommen. Der D3 Nährboden, ausgewiesen als Nährboden für eine hohe Sproßbildungsrate aus Nodien, regte aber in den vorliegenden Versuchen nur 12 % der Nodien bzw. Sproßspitzen auf Agar und auf Steinwolle 20 % zur Sproßbildung an. Durch die Erhöhung der Saccharosekonzentration von 20g/l auf 50g/l und die Verlängerung der Tageslänge auf 12h konnte Ng (1990) an 62,5 % der Yamsprosse Mikroknollen induzieren. Dieses Ergebnis konnte durch die vorliegenden Untersuchungen auf dem Nährboden D4 nicht bestätigt werden. Die Sproßbildungsrate lag bei D4 (auf Agar 10 %, auf Steinwolle 21 %) ähnlich wie bei D3, doch war ein deutlich langsameres Wachstum der Sprosse zu beob-

Tabelle 2: **Einfluß des Festigungssubstrates auf die Regenerationsrate von Sprossen**
Influence of the substrate on the regeneration rate of shoots

Nährboden	Substrat	Regenerationsrate %	ø Sproßanzahl/Pflanze
D5	Agar	5	1
	Steinwolle	82	1
D6	Agar	28	1
	Steinwolle	62	2
D7	Agar	51	8
	Steinwolle	85	15
D8	Agar	3	2
	Steinwolle	10	3

Abbildung 1: **Ein aus einer Yamachselknospe regenerierter Sproß**

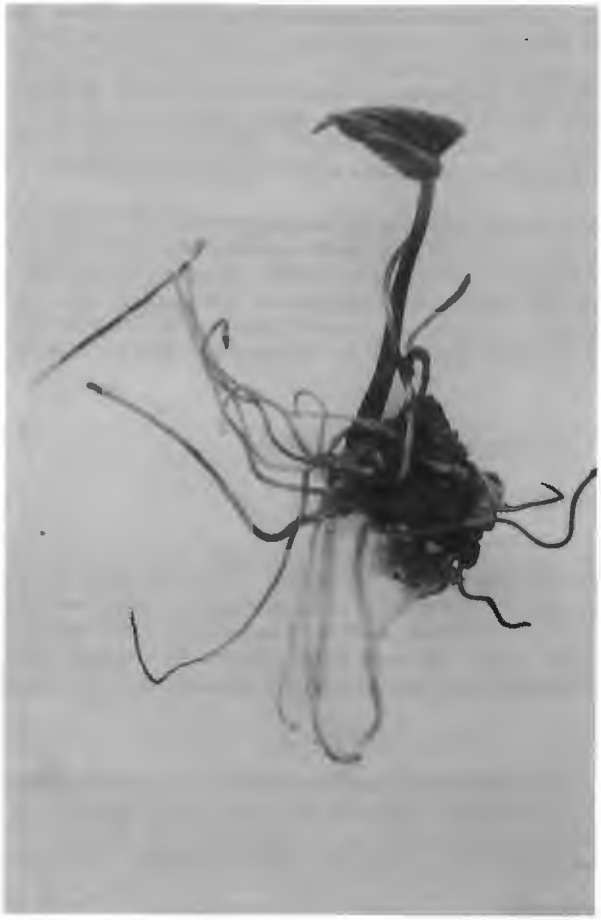

Abbildung 2: **Mehrfachsproßbildung durch den Zusatz von C C C und NES zum Nährboden**

achten, das aber in keinem Falle zur Mikroknollenbildung führte.

Die Nährböden D5 und D6 hatten die gleiche Zusammensetzung wie Nährboden D4. Jedoch wurde der Nährboden D5 auf den pH-Wert 6,2 und D6 auf 5,4 eingestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die Sproßbildung wurde deutlich auf beiden Nährböden durch den pH-Wert beeinflußt. Der hohe pH-Wert (D5) wirkte sich negativ auf die Sproßbildungsrate aus. Sie lag beim Nährboden mit Agar versetzt bei 5 % und auf Steinwolle bei 8,2 %. Auf dem Nährboden mit dem niedrigen pH-Wert von 5,4 konnten 62 % der Nodien bzw. Sproßspitzen auf Steinwolle und 28 % auf Agar Sprosse bilden, wobei die auf Steinwolle gewachsenen Sprosse sich durch einen besonders kräftigen Wuchs auszeichneten (Abbildung 1).

Nach 6-8 Wochen wurden die Sprosse von den jeweiligen Explantaten abgetrennt. Sie wurden dann auf drei Nährböden (Tab.1, D6-8), die sich in größeren Kulturgefäßen (9 cm hoch, 5 cm im Durchmesser) befanden, umgesetzt.

Durch das erneute Aufsetzen eines Teiles der Sprosse auf den D6 Nährboden sollte wiederholend geprüft werden, ob eine Mikroknollenbildung bei erhöhter Saccharosekonzentration und verlängerter Tageslänge wie bei der Kartoffel (A b b o t et al., 1986) doch zu induzieren ist.

Nach 3monatiger Kultur waren an drei von 35 Sprossen mikroknollenähnliche Strukturen am Wurzelansatz zu erkennen, die sich aber nicht weiterentwickelten und deshalb nicht als Mikroknollen zu betrachten waren.

Dem Nährboden D7 wurde 1-Naphthylessigsäure und wie D8 noch 6-Benzylaminopurin, Chlorchinolinchlorid (C C C) und 80 g/l Saccharose zugesetzt und vor dem Autoklavieren auf pH 5 eingestellt (Tabelle1).

Chlorchinolinchlorid (C C C) wurde dem Nährboden zugesetzt, da H u s s e y et al. (1984) diese Substanz als erfolgsentscheidend für eine In-vitro-Knollenbildung bei Kartoffeln beschrieben haben. Von der Bedeutung des C C C für die Knollenbildung konnten auch L e n t i n e et al. (1991) berichten. Die vorliegenden Ergebnisse von Yam konnten den Einfluß von C C C auf die Mikroknollenbildung nicht bestätigen.

Bei den Yamnodien bzw. Sproßspitzen hatte das C C C in Kombination mit NES einen starken Einfluß sowohl auf die Sproßentwicklung als auch auf die Vielfachsproßbildung (Abbildung 2), denn auf dem Nährboden D7 mit Steinwolle bildete eine Pflanze durchschnittlich 15 Sprosse bei einer Sproßbildungsrate von 85 %.

Auf dem D7 Agamährboden reduzierte sich die Sproßbildungsrate auf 51 % sowie die Vielfachsproßbildung auf 8 Sprosse pro Pflanze. Nach Entzug des Auxins (Nährboden D8) wurde eine eindeutig gehemmte Sproß- sowie Vielfachsproßbildung beobachtet. Die Regenerationsergebnisse der Steinwollekultur lagen etwas höher als auf dem mit Agar versetzten Nährboden.

Der Einsatz von Steinwolle als Festigungssubstrat führte mit allen Nährlösungen immer zu einer Steigerung der Sproßbildung (Tabelle 2).

Durch die Wahl von größeren Kulturgefäßen bis zu einem Liter konnte die Vielfachsproßbildung noch gesteigert werden. Bei Zichorien wurde ähnliches beobachtet, nämlich, daß in größeren Kulturgefäßen am Wurzelhals der In-vitro-Pflanzen wieder neue Sprosse entstanden (Mix et al., 1988).

Die Sproß- und Vielfachsproßbildungsergebnisse lassen den Schluß zu, daß Dioscorea rotundata Poir. Nodien bzw. Sproßspitzen zur In-vitro-Regeneration ganzer Pflanzen einen niedrigen pH Wert im Nährboden bevorzugen.

3. Kurzbeschreibung von Taro *(Colocasia esculenta* L.) und bisherige In-vitro-Arbeiten an dieser Art

Colocasia esculenta L. besitzt unter den Rhizomstärkelieferanten die größte Bedeutung als Nahrungspflanze mit etwa 1000 selektierten Genotypen. Er ist im Sundaarchipel beheimatet, kommt aber in allen tropischen Regionen vor, wo geeignete Bedingungen für die ausdauernde Sumpfform vorhanden sind. Taro ist eine pflanzenbaulich interessante Pflanze, da sie sehr hohe Salzgehalte im Boden toleriert.

Aus den knolligen Rhizomen gehen bei gestauchter Achse mehrere mächtige, herzpfeilförmige Blätter, deren Stiel bis zu 2 m lang werden kann, hervor.

Colocasia esculenta L. zählt zu den Aronstabgewächsen, die kolbenförmige Blütenstände entwickeln, ohne daß es zu einer Samenbildung kommt. Während der 6-15monatigen Vegetationszeit vergrößert sich das Rhizom und die an den Ausläufern gebildeten Tochterknollen dienen als Pflanzgut (Franke, 1989; Rehm et al., 1976).

Aus Colocasiasproßspitzenkulturen konnten schon die ersten Pflanzen in vitro regeneriert werden (Mapes et al., 1972; Cendeño-Maldonado et al., 1988). Auch andere Explantate wie Achselknospen und Stengelteile wurden für die Regeneration von Pflanzen herangezogen (Jackson et al., 1977; Yam et al, 1990b). Morishita (1988) berichtet in einem Übersichtsartikel über bisher in vitro erarbeitete Ergebnisse.

Da die Knolle meistens als Ausgangsmaterial zur Verfügung steht, wäre es von Vorteil, direkt aus Knollengewebe Pflanzen zu regenerieren. Esenowa (1986) gelang es, auf Knollensegmenten durch eine Kombination von Kinetin und verschiedenen Auxinen in unterschiedlichen Konzentrationen sowie mit Kokosnußmilch im Nährboden, Kallus zu induzieren.

3.1 *Colocasia esculenta* L.

3.1.1 Material und Methode

Die Untersuchungen zur Regeneration von Pflanzen aus Knollenstücken erfolgte mit einem Colocasia-Genotyp aus Asien. Die Knollen wurden in Ringe eingeteilt, dafür wurden die Knollen der Breite nach in Scheiben (ca. 1 cm) und die Scheiben jeweils in zwei Ringe (Ringbreite variierte nach Knollengröße) und das Mittelstück zerschnitten (Abbildung 3).

Das runde Mittelstück wurde verworfen, da es als Grundgewebe keine meristematischen Bereiche enthielt, sondern nur große Zellen und große Interzellularräume, die mit einer viskosen dickflüssig trüben Flüssigkeit angefüllt waren. Der

Abbildung 3: **Schematische Darstellung der Segmentierung der Knolle**

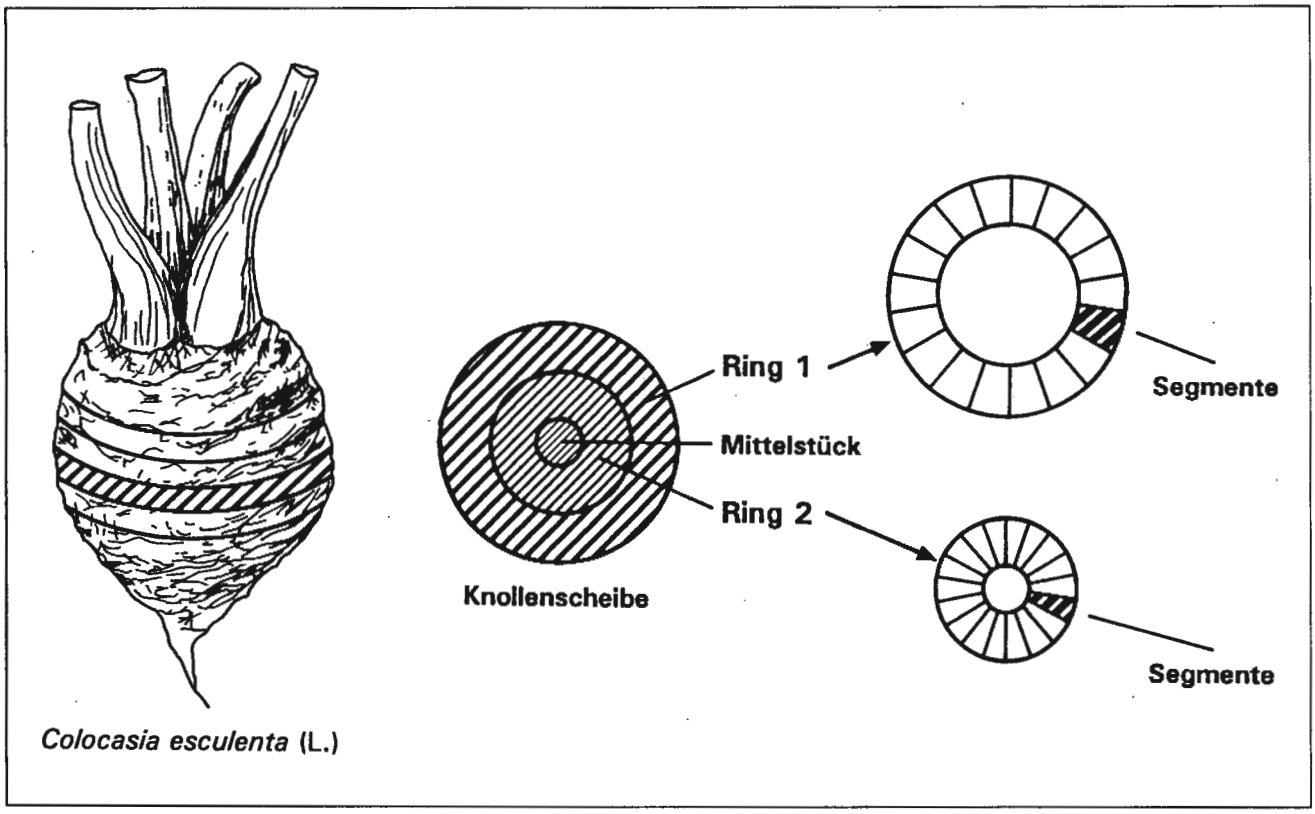

Tabelle 3: **Zusammensetzung der sproßinduzierenden Nährböden**
Composition of the shoot inducing media (mg/l)

Nährboden	BAP	Zeatin	NES	IES	Adeninsulfat	L-cystein
C1		3,0	0,01		40	30
C2		3,0	0,01			
C3		3,0	0,1			
C4	2,0					
C5	2,0		1,0	0,1		

Ring I bestand aus Rindenzellen und Blattanlagen und Ring II aus Leitgefäßen und den Kambiumbereichen. Das Zerschneiden der Knollen erfolgte in der Lösung A (von Zitronensäure und Ascorbinsäure je 400 mg/l), um die Braunfärbung des Gewebes zu verhindern. Daran anschließend wurden die Stücke (getrennt nach Ringen) für eine Stunde in eine Asche-Fungizid-Lösung (B) gelegt. Die Lösung B enthielt 100 g Asche und 5,3 g Fungizid (Benomyl/Du Pont) pro Liter. Während der Behandlung erfolgte ein mehrfaches Durchrühren der mit Knollenstücken versetzten Lösung. Daran schloß sich die Desinfektion der Knollenstücke für 20 Minuten in einer 3 %igen Calciumhypochloridlösung (C) an. Die Knollenstücke wurden anschließend mehrfach mit der sterilen Lösung A gespült. Die Knollenstücke verblieben weiter in der Lösung A, damit auch während der Zeit des Ansetzens eine Braunfärbung des Gewebes verhindert werden konnte.

Die Ringe I und II wurden in ca. 2 cm breite Stücke zerschnitten. Von dem Ringmaterial I und II wurden jeweils 200 Stücke auf 5 verschiedene Nährböden aufgelegt (40 Stück/Nährboden). Da die Ringe willkürlich in Stücke geschnitten wurden, kann nicht davon ausgegangen werden, daß jedes Stück wenigstens eine Knospe oder meristematisches Gewebe (Kambium) enthielt. Andererseits wäre es aber möglich, daß ein Stück mehrere regenerationsfähigen Zonen aufweist.

Die Kultivierung der Stücke zu je 3 in einem Erlenmeyerkolben (100 ml) erfolgte bei 25° C bei einer Tageslänge von 16 h mit 4-6 klx. Die Erlenmeyerkolben enthielten entweder festen Nährboden (6 g/l Agar) oder Nährlösung mit 4,5 g Perlite/Glas als Stützsubstrat.

Alle verwendeten Nährböden, auf denen die Knollenstücke eine Reaktion zeigten, enthielten in halber Konzentration die Makro- und Mikronährstoffe nach Murashige und Skoog (1962) und 20 g/l Saccharose. Die fünf erfolgreichsten Nährböden setzten sich wie folgt zusammen: (Tab.3) Cytokinine: 6-Benzylaminopurin (BAP), Zeatin (Z); Auxine: Indolylessigsäure (IES), 1-Naphthylessigsäure (NES); Adeninsulfat (AS) und L- Cytein (CY). Alle Nährlösungen wurden mit 1 mg/l Thiamin H Cl, 0,5 mg/l Nikotinsäure und 0,5 mg/l Pyridoxin HCl versetzt. Der pH-Wert aller Nährlösungen wurde auf 5,7 eingestellt.

Nachdem die Sprosse etwa 5 cm gewachsen waren, wurden sie vom Explantat abgetrennt. Ein Sproß wurde in einen Erlenmeyerkolben, der eine hormonfreie Nährlösung und Perlite als Stützsubstanz für den Sproß enthielt, gesetzt. Die Überführung der bewurzelten Sprosse in Erde konnte im 2-3 Blattstadium erfolgen. Die Pflanzen wurden während der ersten Woche mit einer durchsichtigen Plastikhaube abgedeckt.

Für die mikroskopischen Untersuchungen des Knollenmaterials wurde ein Gefriermikrotom eingesetzt. Die Schnittfärbung erfolgte mit einer 0,05 %igen Toulodinblaulösung.

3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Bei Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß während des Zerschneidens der Knollen sich eine langsame Braunfärbung des Gewebes einstellte. Wurden aber die Knollen in einer Lösung, die Ascorbinsäure und Zitronensäure (Lösung A) enthielt, geschnitten, konnte die Braunfärbung um 97,5 % gegenüber der Kontrolle, bei der 80 % der Knollenstücke braun waren, verringert werden.

Ein weiteres Problem stellte die Desinfektion der Knollenstücke dar. Erfolgte die Sterilisation der Knollenstücke nur in der Lösung C (3 % Calciumhypochloridlösung), dann waren noch 80 % der Knollenstücke kontaminiert und mußten nach einigen Tagen verworfen werden. Die Durchführung einer kombinierten Desinfektion in Lösung B (Fungizid/Asche) und C (Calciumhypochlorid) reduzierte die Kontamination um 50 %.

Tabelle 4: **Anzahl regenerierter Sprosse aus zwei Gewebeschichten der Knolle**
Number of regenerated shoots out of two tissue layers of the tuber

	Nährboden	abs. Anzahl regener. Sprosse	Regenerationsrate (%)
Ring I	C1	21	52,5
	C2	19	47,5
	C3	41	102,5
	C4	38	95
	C5	44	110
Ring II	C1	14	35
	C2	12	30
	C3	34	85
	C4	8	20
	C5	32	80

Abbildung 4: **Die Entwicklung eines Sprosses aus einer im Gewebe liegenden Knospe (Ring II)**

Abbildung 5: **Ein aus der Rindenschicht sich entwickelnder Sproß**

Um eine Oxidation des Gewebes während der Kultur zu vermeiden, wurde dem C1 Nährboden 30 mg/l L- Cystein, wie auch von anderen Autoren beschrieben (N g ,1988), zugesetzt.

In den vorliegenden Versuchen erbrachte der Zusatz von L-Cystein zum Nährboden keinen zusätzlichen Effekt, da das Spülen der Gewebeteile mit Ascorbin- und Zitronensäure (Lösung A) eine anhaltende Wirkung auf das Gewebe ausübte.

Die Einteilung des Knollengewebes in zwei Ringe sollte aufzeigen, inwieweit der vorhandene Kambiumbereich bei Monokotylen befähigt ist, Sprosse zu regenerieren, wodurch die Regenerationsrate einer Knolle gesteigert werden könnte. Bisher wurden nur isolierte Knospen als Ausgangsmaterial für eine Regeneration von Sprossen aus Knollen beschrieben (Y a m et al., 1990a). Dieses Ausgangsmaterial entspricht nur einem Teil des Gewebes des ersten Ringes. Abbildung 5 zeigt einen aus dem Rindenparenchym sich entwickelnden Sproß. Kultiviert man aber das ganze Knollengewebe außer dem Mittelstück, so lassen sich mehr Regenerate gewinnen, da die weiter im Gewebe liegenden meristematischen Bereiche auch noch zur Regeneration von Pflanzen angeregt werden können (Abbildung 4).

Die Regenerationsraten auf den fünf Nährböden waren sehr unterschiedlich (Tabelle 4).

Auf den Nährböden C1 und C2 war eine geringere Sproßbildung aus beiden Ringgeweben (I+II) im Vergleich zu den restlichen drei Nährböden zu beobachten. Der Zusatz von 40 mg/l Adeninsulfat und L- Cystein zum C1 Nährboden erbrachte keinen erkennbaren Einfluß auf die Sproßinduktion. Durch die Erhöhung des 1-Naphthylessigsäuregehaltes (NES) von 0,01 mg/l (C1+ C2) auf 0,1 mg/l (C3) reagierte das Gewebe mit einer deutlich erhöhten Sproßbildungsrate in beiden Ringen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Y a m et al.(1990a) beschrieben. Hier wurde sogar 0,1 mg/l NES im Nährboden als unterste Grenze für eine Sproßregeneration angegeben.

Wurde das Zeatin durch Benzylaminopurin ersetzt (C4), zeigte nur das erste Ringgewebe eine hohe Regenerationsfähigkeit auf Nährboden C4. Alle sichtbaren Blattanlagen (Knospen) bildeten einen Sproß, wogegen aus dem Gewebe des zweiten Ringes nur vereinzelt Sprosse entwickelt wurden. Es scheint so, um aus meristematischer Zellschicht (Kambium) bei Colocasia Sprosse zu regenerieren, daß neben Cytokininen auch Auxine im Nährboden anwesend sein müßten.

Die höchste Sproßregeneration aus Gewebestücken der beiden Ringe wurde auf Nährboden C5 erzielt. G ó m e z und Mitarbeiter (1989) konnten ebenfalls über den positiven Einfluß der Indolylessigsäure auf die Sproßbildung berichten.

Im 1-2 Blattstadium wurde das Explantat entfernt und die Sprosse auf einen hormonfreien Nährboden überführt. Nach einigen Wochen hatte sich ein Wurzelsystem gebildet, das die Überführung der Pflanze in Erde zuließ. In Erde entwickelten sich die Pflanzen nach einer kurzen Anpassungsphase sehr gut. Ein Absterben der Pflanzen nach der Überführung in

Erde war nur ganz vereinzelt zu beobachten. Die gleichen Beobachtungen konnten auch Monge und Mitarbeiter (1987) bei der Kultivierung der in vitro erzeugten Pflanzen berichten.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, daß durch den Einsatz eines geeigneten Nährbodens und eines Festigungssubstrates eine hohe Sproßbildung aus Yamachselknospen und Sproßspitzen erzielt werden kann. Werden Taroknollen als Explantat eingesetzt, so läßt sich die Regenerationsrate steigern, indem nicht nur die Rindenschicht, sondern auch die darunterliegende, das Kambium enthaltende Schicht in die Kultur mit einbezogen wird.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau Ellruth Müller und Frau Tinka Eneva für ihre exzellente technische Assistenz.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen zur In-vitro-Regeneration wurden mit den knollentragenden Stärkepflanzen Yam *(Dioscorea rotundata* Poir.*)* und Taro *(Colocasia esculenta* L*)* durchgeführt.

Dioscorea rotundata Poir.:
Aus den Achselknospen und Sproßspitzen konnten Pflanzen mit gut entwickeltem Wurzelsystem regeneriert werden. Die höchsten Regenerationsraten waren auf den Nährböden, die 6-Benzylaminopurin (BAP) und 1-Naphthylessigsäure (NES) enthielten, zu beobachten. Der Einsatz von Steinwolle als Festigungssubstrat führte mit allen Nährlösungen, die noch zusätzlich einen niedrigen pH-Wert aufwiesen, immer zu einer Steigerung der Sproßbildung. Der Zusatz von Chlorchinolchlorid (C C C) zur Nährlösung bewirkte eine Vielfachsproßbildung bis zu 15 Sprosse pro Pflanze.

Colocasia esculenta L.:
Aus Knollen, die in verschiedene Gewebezonen getrennt wurden, konnten Pflanzen regeneriert werden. Die höchste Sproßregeneration in allen Gewebezonen wurde auf Nährböden, die BAP und NES enthielten, erzielt. Wurde jedoch Auxin dem Nährboden entzogen, konnte die meristematische Zellschicht (Kambium) nicht zur Sproßbildung angeregt werden.

Die Pflanzen beider Arten entwickelten sich gut und konnten nach einer Abhärtungsphase in ein Gewächshaus überführt werden. Die vorliegenden Ergebnisse haben deutlich gemacht, daß eine In-vitro-Vermehrung bei Dioscorea rotundata Poir. und Colocasia esculenta L. möglich ist und damit eine gute Voraussetzung für eine spezielle Pflanzguterzeugung bei diesen Arten besteht.

In vitro multiplication of Yam *(Dioscorea rotundata* Poir.*)* and Taro *(Colocasia esculenta* L.*)* for planting material production

Dioscorea rotundata Poir.:
Yam produces edible underground tubers. The propagation is done with tuber pieces. The aim now is to produce healthy planting material through In-vitro-propagation.

Axillary buds and shoot tips were cultured to regenerate plantlets. It was not possible to induce micro tubers at the In-vitro-plantlets.

After surface sterilization the explants were washed in an ascorbic- and citric acid solution to avoid blackening. The Murashige and Skoog basal medium was used for the eight culture media.

The daily light period was 12h with an intensity of 4-6 klx. The day and night temperature was 25° C.

Axillary buds and shoot tips were not able to develop shoots like potatoes do on a hormon-free medium (D1). The addition of BAP and NAA to the medium (D2) showed an increase up to 80 % of the shoot formation rate. From the explants only 12 % on agar and 20 % on rock wool could develop shoots on a medium (D3) described by Ng (1990) as a medium with a high regeneration ability. By increasing the sucrose content from 20 to 50 g/l and by prolongation of the day time to 12h it was not possible to induce microtuber formation as described by Ng (1990).

A change of the pH had an influence on the shoot formation. A decrease of the pH to 5,4 (D6) and the culture of the explants on rock wool increased the shoot formation rate up to 62 %. The shoots developed to strong plantlets. A high pH of 6,2 (D5) depressed the shoot formation.

The transfer of the developed shoots on media D7 and D8 made it obvious that the addition of C C C and NAA to the medium and the growing of shoots on rock wool (D7) lead to a high regeneration rate of 85 % and a multiple shoot formation of up to 15 shoots/plantlet. From the results of the shoot and the multiple shoot formation it might be possible to conclude that for a successful yam culture the pH should be around 5,0. The results showed also that the shoot formation is much better on rock wool than on agar.

Colocasia esculenta L.:
Taro has always been propagated clonally through small tubers. This method is slow and spreads virus diseases. Attempts are made to develop a rapid mass propagation procedure for the production of virus-free planting material.

Tuber segments were cultured to regenerate plantlets. All tubers were divided in three sections. The central section with large cells filled with viscous solution was rejected. The middle section with the cambium layer and few leaf buds and the outer section with the cortical layer and the buds were cultured. The sectional cuttings of the tubers were incubated in an ascorbic- and citric acid solution to minimize the blackening of the explants. The disinfection with calciumhypochloride (3 %) alone proved to be an unsatisfactory surface sterilization (40 %), but in combination with an ash-fungicide-solution treatment the contamination could be reduced to 40 %.

The segments of the middle and outer sections were placed separately on five different culture media with the half concentration of basal culture medium of Murashige and Skoog. The culture flasks contained solid media or liquid media with Perlite.

The cultures were incubated under 16h daylength with a light intensity of 4-6 klx. The temperature was kept at 25° C. These conditions were used during the whole culture duration.

On the media C1 and C2 the shoot regeneration was low in both tuber sections, but an increase of NAA (C3) from 0,01 to 0,1 mg/l caused an increase of shoot induction and development. The highest shoot regeneration rate (80 % and 110 %) could be reached when the segments of the two sections

were plated on a medium (C5) supplemented with 2,0 mg/l BAP and 1 mg/l IAA als well as NAA.

When the shoots had reached a stage of two leaves they were transferred on a hormon-free medium. After several weeks when the plantlets had developed a good root system they were potted in soil and grown in the green house.

The present results showed that a multiplication in vitro is possible with Dioscorea rotundata Poir. and Colocasia esculenta L. and this is a good prerequisite for a special production of planting material.

Literatur

Abbot, A.J. and Belcher, A.R.: Potato tuber formation in vitro. - Plant tissue culture and its agricultural applications, edited by L.A. Withers and P.G. Alderson (1986), S. 113-122.

Brinks, T.: schriftliche Mitteilung (1992).

Cedeño-Maldonado, A.; Fierro, C. and Bosques, A.: Salt and sugar levels for effective plant regeneration from In-vitro-cultured tissues of cocoyam. - J. of Agriculture of the University of Puerto Rico 72 (1988), S. 515-520.

Franke, W.: Kohlehydrate liefernde Pflanzen. - Nutzpflanzenkunde, Thieme Verlag (1989), S. 63-79.

Gómez, L.; Monge, M.; Valverde, R.; Arias, O. and Thorpe, T.: Micropropagación de tres araceas comestibles libres de virus. - Turrialba 39 (1989), S. 155-161.

Hussey, G. and Stacey, N.J.: Factors affecting the formation of In-vitro-tubers of potato *(Solanum tuberosum* L.*)*. - Ann. Bot. 53 (1984), S. 565-578.

Jackson, G.V.H.; Ball, E.A. and Arditti, J.: Tissue culture of taro, Colocasia esculenta (L.) Schott.. - J. Hort. Sci. 52 (1977), S. 373-382.

Lentini, Z. and Earle, E.D.: In vitro tuberization of potato clones from different maturity groups. - Plant Cell Reports 9 (1991), S. 691-695.

Mantell, S.H., Haque, S.Q. and Whitehall, A.P.: Clonal multipication of *Dioscorea alata* L. and *D. rotundata* Poir. yams by tissue culture. - J. of Hort. Science 53 (1978), S. 95-98.

Mapes, M.O. and Cable, M. J.: Mericloning of Taro *(Colocasia esculenta)*. - Hawaii Agri. Exp. Sta. J. Ser. Nr. 1694 (1972).

Mix, G.: Long-Term storage in vitro of potato gene material. - Plant Research and Development 19 (1984), S. 122-127.

Mix, G. und Frese, L.: Die Entwicklung einer In-vitro-Langzeitlagerungsmethode für Zichorien-Zuchtmaterial *(Cichorium intybus* L.*)*. - Landbauforschung Völkenrode 38 (1988), S. 170-172.

Monge, M.; Gómez, L.; Valverde, R. and Arias, O.: Evaluacion preliminar del comportamiento en el campo de la plantas de ñampi *(Colocasia esculenta var. antiquorum)* provenientes del cultivo in vitro de apices. - Agronomia Costarricense 11 (1987), S. 189-194.

Morishita, M.: Taro *(Colocasia esculenta* Schott.*)*. Eds. Bajaj, Y.P.S., Biotechnology in Agriculture and Forestry 6, Crops II, Springer Verlag (1988).

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

Ng, S.Y. C.: In vitro tuberization in white yam *(Dioscorea rotundata* Poir.*)*. - Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14 (1988), S. 121-128.

Ng, S.Y. C.: In vitro tuberization in white yam *(Dioscorea rotundata* Poir.*)*. - IITA Research 1 (1990), S. 11-13.

Rehm, S. und Espig, G.: Stärkepflanzen. - Die Kulturpflanzen der Tropen und Subtropen, Ulmer Verlag (1976), S. 54-65.

Yam, T.W.; Hsu, G.I. and Arditti, J.: Plant regeneration in vitro of South Pacific taro *(Colocasia esculenta var. esculenta cv. Akalomamale, Aracea)*. - Plant Cell Reports 9 (1990a), S. 229-232.

Yam, T.W.; Webb, E.L. and Arditti, J.: Callus formation and plantlet development from axillary buds of taro. - Planta 180 (1990b), S. 458-460.

Verfasser: Mix-Wagner, Gunda, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. agr. M. Dambroth.