

Induktion und Histologie von Kartoffel-Mikroknollen

UTE MENGE-HARTMANN

Institut für Pflanzenbau

Einleitung

Bei Kartoffeln werden Gewebekulturtechniken u.a. erfolgreich zur schnellen Vermehrung, Eliminierung von Pathogenen und Langzeitlagerung genetischer Ressourcen angewendet. Bei der letztgenannten Nutzung werden chemische Wachstumshemmer eingesetzt, die die Zeiten zwischen den Subkulturen der *in vitro*-Pflänzchen und somit die Lagerungsdauer verlängern sollen oder eine Wachstumsdepression wird durch niedrige Inkubationstemperaturen erzielt.

Als weitere Methode zur mittelfristigen Lagerung von Kartoffel-Genmaterial wurde in den letzten Jahren die Induktion von *in vitro*-Knollen (Mikroknollen) an Blattachselknospen von Kartoffelsprossen eingeführt (Dodds, 1988; Chandra et al., 1988; Lizarraga et al., 1989). Die Lagerungsdauer solcher *in vitro*-Knollen läßt sich möglicherweise in Zukunft durch veränderte Kulturbedingungen auf 4 bis 5 Jahre ausdehnen, ohne daß eine Subkultur durchgeführt werden muß (Lizarraga et al., 1989).

Mikroknollen können darüber hinaus für zwei weitere Anwendungen genutzt werden: 1.) zum Verteilen von virusfreiem Genmaterial, wie es beispielsweise durch das International Potato Center (CIP) in Peru praktiziert wird und 2.) werden solche Knollen innerhalb von Saatguterzeugungsprogrammen als zusätzliche Komponente zu Standard-Methoden der schnellen Vermehrung eingesetzt.

Da über die Histologie und Stärkeeinlagerung, sowie deren möglichen Einfluß auf die Länge der Lagerfähigkeit von *in vitro*-Knollen derzeit noch wenig bekannt ist, wurden *in vitro*-Knollen im Rahmen von Arbeiten zur Knolleninduktion und Lagerfähigkeit mikroskopisch untersucht.

Material und Methoden

Im Gewächshaus angezogenen Pflanzen der Kartoffelsorten Christa, Hela, Ukama (sehr frühe Sorten), Granola, Grata und Hansa (mittelfrühe Sorten) wurden nodale Sproßsegmente entnommen und mit 1 % Calciumhypochlorid oberflächensterilisiert. Mit diesen Segmenten wurde *in vitro* auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit 3 % Saccharose und 0,8 % Agar eine schnelle Vermehrung durchgeführt (modifiziert nach Rosell et al., 1987). Dazu wurden die Pflanzen unter 16stündiger Belichtung bei einer Lichtintensität von 2000 Lux und 25°C kultiviert. Sobald sich aus den nodalen Sproßsegmenten nach mehrmaligem Umsetzen auf frisches Nährmedium hinreichend viele, etwa 4 Wochen alte Pflänzchen mit mindestens vier Nodien entwickelt hatten, wurden sie auf drei verschiedene Knollen-Induktionsmedien überführt. Diese basierten auf MS-Grundmedium und enthielten folgende Zusätze:

1.) 5mg/l 6-Benzylaminopurin (BAP) und 500mg/l Chlorocholinchlorid (CCC; modifiz. nach Tovar et al., 1985),
2.) 2mg/l BAP, 2mg/l 1-Naphthylthylsäure (NAA) sowie 100

mg/l CCC und 3.) 2mg/l NAA und 2mg/l BAP (modifiziert nach Rosell et al., 1987). Alle Induktionsmedien enthielten 0,8 % Agar und 8 % Saccharose und wurden vor dem Autoklavieren (121°C, 15 Min.) auf einen pH-Wert von 5,7 eingestellt.

In einem ersten Versuchsansatz wurden pro zylindrischem 350ml-Kulturgefäß jeweils fünf, in einem zweiten Ansatz bis zu 12 Pflänzchen bei 20 - 22°C im Dauerdunkel induziert.

Die induzierten Mikroknollen wurden nach 8 Wochen geerntet und ihre Zahl pro Pflanze sowie ihr Durchmesser ermittelt. Anschließend wurden die Mikroknollen bei 4°C *in vitro* eingelagert und die Dauer ihrer Lagerfähigkeit, d.h. die mit dem Ende der Keimruhe einsetzende Keimentwicklung, regelmäßig überprüft.

Nach 13 Monaten Lagerung wurden jeweils 5 bis 6 Mikroknollen der Sorten Granola und Ukama, die auf Medium 2 und 3 (zweiter Versuchsansatz) induziert worden waren, für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen präpariert. Hierzu wurden Längsscheiben der Knöllchen für 16 Stunden mit phosphat-gepuffertem Glutaraldehyd-Formaldehyd (Karnovsky, 1965) fixiert, nach Entwässerung in Aceton ansteigender Konzentration mit einem Kritisch-Punkt-Trockner getrocknet und nach frischem Anschneiden mit einer Rasierklinge mit Gold besputtert.

Zur Isolierung der Stärkekörner wurden Knöllchen beider Sorten homogenisiert, mit Wasser aufgeschlämmt, durch eine dreifache Lage Nylongewebe filtriert und mehrfach gewaschen. Das Sediment wurde durch mehrfaches Zentrifugieren gereinigt und schließlich luftgetrocknet. Zur Größenbestimmung der isolierten Stärkekörner wurden auf rasterelektronenmikroskopischen Fotos (REM ISI-60) jeweils 500 Körner je Probe vermessen.

Ergebnisse und Diskussion

Die sechs untersuchten Kartoffelsorten reagierten unterschiedlich auf die Knolleninduktion. Die höchsten Induktionsraten wurden bei der Sorte Hela mit 1,4 Mikroknollen pro Pflänzchen unter Zusatz von BAP und CCC beobachtet (Medium 1), bei Ukama mit jeweils einer Knolle pro Pflänzchen sowohl auf Medium 2 mit BAP, NAA und CCC als auch auf Medium 3 mit NAA und BAP, sowie bei Granola mit 1,2 Mikroknollen auf Medium 3 (Tabelle 1). In einem identischen Ansatz mit bis zu 12 Pflänzchen pro Kulturgefäß, bestätigte sich diese Tendenz weitgehend (Tabelle 1, Werte in Klammern). Die niedrigste Induktionsrate wies die Sorte Grata auf. Auf keinem der Medien entwickelten sich mehr als 0,5 Knöllchen pro Pflanze (Tabelle 1). Die Anzahl der induzierten Knollen wird offensichtlich weniger durch das Induktionsmedium, sondern weitgehend durch den Genotyp bestimmt (vgl. Chandra et al., 1991).

Grata hatte nicht nur die wenigsten, sondern mit 1,9 mm Durchmesser auch die kleinsten Knollen (Tabelle 1, Grata auf

Medium 1). Die größten Knollen wies mit 4,5mm die Sorte Ukama auf Medium 3 mit BAP und NAA auf. Überwiegend waren die auf Medium 3 induzierten Knollen bei den untersuchten Sorten etwas größer als die der anderen Medien.

Während der in vitro-Einlagerung bei 4°C zeigte sich, daß sich die Knollen der beiden Induktionsansätze in der Dauer ihrer Lagerfähigkeit unterschieden. Nach 11 Monaten waren die Mikroknollen des ersten Induktionsansatzes mit 5 Pflanzen pro Kulturgefäß bei den sehr frühen Sorten Christa, Hela und Ukama nahezu alle stark gekeimt, d.h. die Einzelkeime waren bis zu 30mm lang. Dagegen wiesen z.B. bei der mittelfrühen Sorte Granola nur etwa 50 % der Knöllchen 7 bis 15mm lange Keime auf. Die Mikroknollen des Induktionsansatzes mit 12 Pflanzen pro Kulturgefäß befanden sich hingegen auch nach 13monatiger Lagerung noch weitgehend in Keimruhe. Tovar et al. (1985) nehmen an, daß Umweltbedingungen während der Induktionsphase - wie hier möglicherweise die höhere Anzahl Pflanzen pro Kulturgefäß - eine kritische Rolle für die Dauer der Keimruhe spielen können.

Bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen solcher ruhender Mikroknollen der sehr frühen Sorte Ukama und der mittelfrühen Sorte Granola, die auf Medium 2 mit BAP, NAA und CCC bzw. Medium 3 mit BAP und NAA induziert worden waren, erschienen die Endknospen (Abbildungen 1 a, b) vital und das Periderm turgeszent (Abbildungen 1 b, 2). Während Granola nur wenige, schwach in das Periderm eingesenkte Lentizellen (L, Abbildung 2) besaß, lagen sie bei Ukama meist über das Periderm erhöht (Abbildungen 3 a, b) und in etwas größerer Dichte vor. Ein Längsschnitt durch eine 3,5 mm lange Mikroknolle von Ukama zeigt, wie bei in vivo-Kartoffeln, ein 8 bis 12schichtiges, gut ausgebildetes, etwa 100 bis 170 µm dickes Periderm (P, Abbildungen 4, 5), das das stärkespeichernde Parenchym allseits umgibt (vgl. Harris, 1982).

Auch die Struktur der Speicherparenchymzellen gleicht derjenigen von in vivo-Kartoffelknollen (vgl. Reeve et al., 1970), d.h. ihre Größe nimmt vom Nabelende (N) zum Mark (M) hin bis zu etwa 100 µm zu und zur Kronenseite (K) hin wieder ab (Abbildungen 4 bis 7). Von der Rinde (R) zum Mark hin werden die Zellen ebenfalls kontinuierlich größer, nur in unmittelbarer Umgebung des Leitgewebes ist das Parenchym sehr kleinzellig (LG, Abbildungen 4 und 5).

Größenunterschiede wurden auch bei den Stärkekörnern dieser Zellen beobachtet. Im Nabel- und Kronenbereich (Abbildung 6) sind sie kleiner als in den zentralen Markzellen (Abbildung 7). Von der Rinde zum Mark nimmt ihre Größe von außen nach innen kontinuierlich bis zu einem durchschnittlichen Durchmesser von 20 µm zu. Eine Ausnahme bilden die zahlreichen kleinen Körner im mit dem Leitgewebe assoziierten kleinzelligen Speicherparenchym (Abbildung 5).

Die Packungsdichte der Stärkekörner war in Zellen der Mikroknollen von Ukama auf Medium 3 (BAP- und NAA-Zusatz) am höchsten, insbesondere in den Zellen des Kronenendes (Abbildungen 4, 5). In den auf Medium 2 (mit BAP, NAA und CCC) induzierten Knollen von Ukama war die Packungsdichte insgesamt etwas geringer. Deutlich weniger Stärke als die Knollen von Ukama enthielten die von Granola und am wenigsten wiederum die auf Medium 2 induzierten Knollen. Bei diesen war das Nabelende nahezu stärkefrei.

Da sich die Medien 2 und 3 nur im Zusatz von CCC unterschieden, verursachte diese Komponente möglicherweise eine verringerte Stärkeeinlagerung und verbunden damit eine verminderte Lagerfähigkeit.

Sorte/Behandlung	Pro Pflänzchen gebild. Mikroknollen	Durchmesser der Mikroknollen (mm)	Durchmesser der Stärkekörner (µm)
Christa	1 0,8 (0,9)	3,3; n=20 (3,2; n=36)	
	2 0,5 (-)	2,5; n=12 (-)	
	3 0,8 (-)	3,6; n=19 (-)	
Hela	1 1,4 (0,6)	3,3; n=28 (3,2; n=19)	
	2 0,8 (0,6)	2,4; n=16 (3,0; n=25)	
	3 0,6 (0,8)	4,0; n=11 (3,4; n=31)	
Ukama	1 0,7 (0,9)	3,1; n=15 (3,6; n=30)	
	2 1,0 (1,2)	4,1; n=21 (4,2; n=50)	$\bar{x}=5,8$; $s=3,6$; max. 20,0 min. 1,1
	3 1,0 (0,9)	4,5; n=33 (3,8; n=46)	$\bar{x}=6,3$; $s=3,0$; max. 20,3 min. 1,1
Granola	1 0,8 (0,7)	2,7; n=19 (2,5; n=39)	
	2 0,7 (0,5)	2,8; n=18 (2,8; n=34)	$\bar{x}=6,8$; $s=3,9$; max. 25,0 min. 1,1
	3 1,2 (0,9)	2,8; n=28 (3,6; n=44)	$\bar{x}=6,7$; $s=3,7$; max. 20,0 min. 1,7
Grata	1 0,5 (0,4)	1,9; n=12 (1,8; n=25)	
	2 0,3 (0,2)	2,1; n=11 (2,8; n=5)	
	3 0,5 (0,2)	2,8; n=13 (2,7; n=6)	
Hansa	1 0,9 (0,4)	2,9; n=18 (2,4; n=16)	
	2 0,5 (0,3)	2,8; n=12 (3,1; n=15)	
	3 0,7 (0,4)	3,4; n=17 (2,6; n=11)	
1 = Medium 1: 5 mg/l BAP, 500 mg/l CCC 2 = Medium 2: 2 mg/l BAP, 2 mg/l NAA, 100 mg/l CCC 3 = Medium 3: 2 mg/l BAP, 2 mg/l NAA			

Tabelle 1: Anzahl und Größe pro Pflänzchen gebildeter Mikroknollen von sechs Kartoffelsorten sowie Durchmesser der Stärkekörner von Ukama- und Granola-Mikroknollen

Der unterschiedliche Stärkegehalt der Knollen von Granola und Ukama könnte dadurch bedingt sein, daß die Stärkeeinlagerung zum Zeitpunkt der Ernte bei der mittelfrühen Sorte Granola noch nicht abgeschlossen war. Nach Untersuchungen von Hori (1954) setzt die Stärkebildung nämlich im Apex der Kartoffelknolle, sowie in der Nähe von Knospen und zu beiden Seiten des Leitgeweberings ein. Sie schreitet dann graduell im Innern von Rinde und Markzellen fort, so daß das Nabelende erst zuletzt erreicht wird.

Die Möglichkeit, daß die Stärke des Nabelendes nach 13 Monaten bereits abgebaut worden war, ist unwahrscheinlich, da bei keiner der untersuchten Mikroknollen eine deutliche Keimbildung eingesetzt hatte. Auch eine vollständige Veratmung dieser Stärke während der Lagerung dürfte nicht in Betracht kommen, da nach Untersuchungen von Struik und Lommen (1990) bei Miniknollen innerhalb eines Jahres nur 10 % der Trockenmasse durch Veratmung verloren gehen. Darüber hinaus wiesen die zur Bestimmung der mittleren Korngröße isolierten Stärkekörner keine auf einen Abbau hinweisenden Korrosionen auf. Sie zeigten nach Anfärben mit verdünntem Jodjodkalium die für Kartoffelstärke typische Blaufärbung und konzentrische Schichtung um ein exzentrisches Hilum (Abbildung 8) sowie im polarisierten Licht das charakteristische Malteserkreuz (Abbildung 9).

Die Größenunterschiede zwischen Stärkekörnern von in vivo-Kartoffeln, die zwischen 5 und 100 µm, im Mittel 38 µm groß sind, und in vitro-Knollen sind beträchtlich, wie Abbildung 10 a und b es exemplarisch für die Sorte Grata zeigen.

Die Größenbestimmung der isolierten Stärkekörner von Granola und Ukama ergab mittlere Durchmesser von 5,8 µm für Ukama auf Medium 2 (mit BAP, NAA und CCC) bis zu 6,8 µm für Granola auf demselben Medium mit Minimalwerten von 1,1 µm und Maximalwerten von 25 µm (Tabelle 1). Wie bei in vivo-Kartoffeln zeigte die Stärke der untersuchten Mikroknollen eine relativ weite Verteilung der Korngröße (Abbildung 11, Ukama und Abbildung 12, Granola), und die kleinsten Körner erschienen weitgehend rund, größere zunehmend oval.

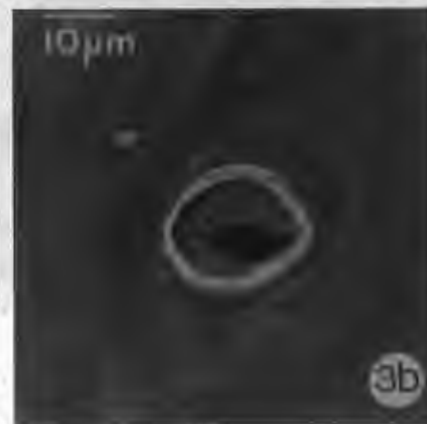
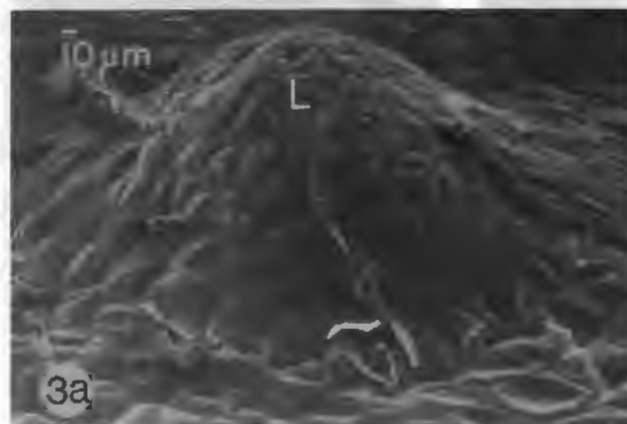
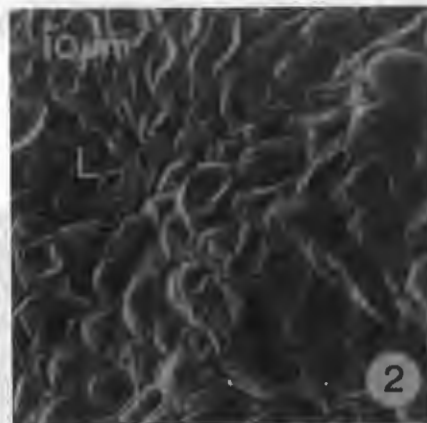
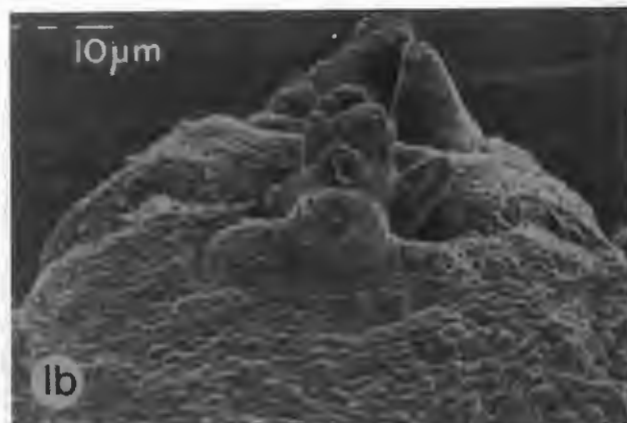


Abbildung 1a: Außenaufsicht auf eine Mikroknolle von Granola (Medium 2; K = Kronenende, N = Nabelende, A = Auge; Abbildung 1 b: vergrößerter Ausschnitt des Kronenendes; Abbildung 2: Periderm einer Mikroknolle von Granola (Medium 2) mit schwach eingesenkter Lentizelle (L); Abbildungen 3 a und 3 b: Lentizellen (L) von Ukama (Medium 3)

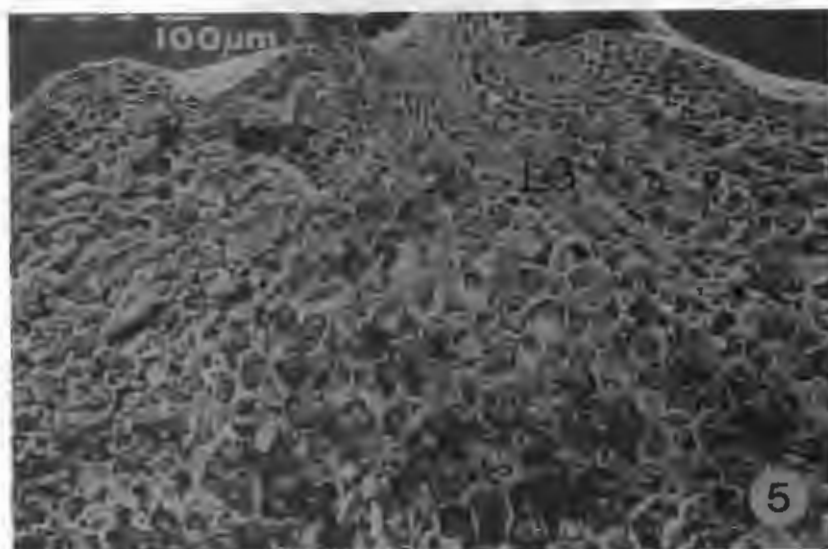


Abbildung 4: **Medianer Längsschnitt durch eine Mikroknolle von Ukama (Medium 3; P = Periderm, LG = Leitgewebe, M = Mark, R = Rinde)**

Abbildung 5: **Ausschnitt aus Abbildung 4, Kronenende mit kleinzelligem Parenchym in der Umgebung des Leitgewebes (LG)**

Abbildung 6: **Kleinzelliges Parenchym mit kleinen runden Stärkekörnern aus dem Rindenbereich des Kronenendes**

Abbildung 7: **Großzelliges Parenchym mit größeren ovalen Stärkekörnern aus dem zentralen Markbereich**

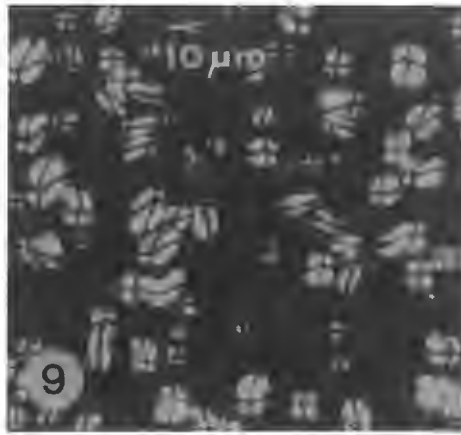
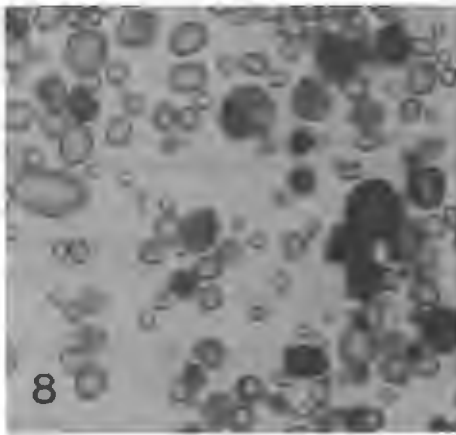


Abbildung 8: Mit Jodjodkalium angefärbte isolierte Stärke von Ukama (Medium 3)
Abbildung 9: Stärke von Hela (Medium 1) im polarisierten Licht

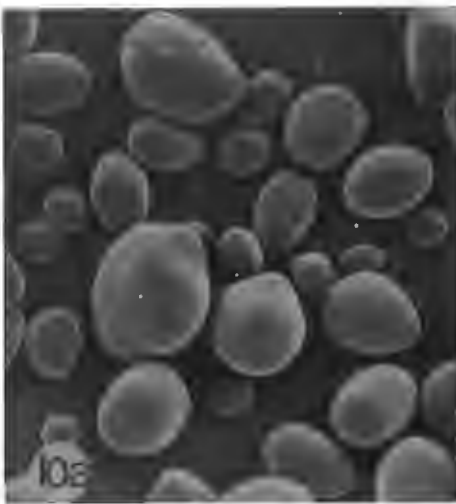


Abbildung 10a: Stärke von Grata von im Feld angebauten Knollen
Abbildung 10b: Stärke von Grata von Mikroknollen

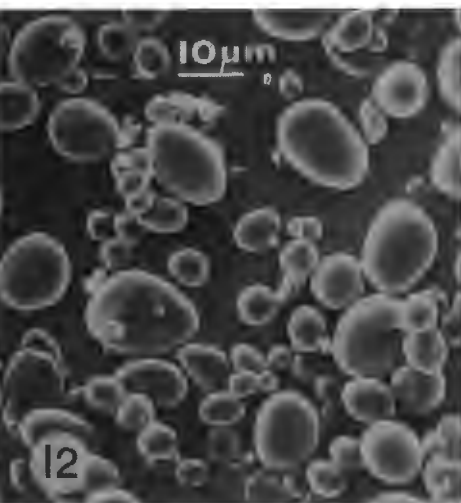
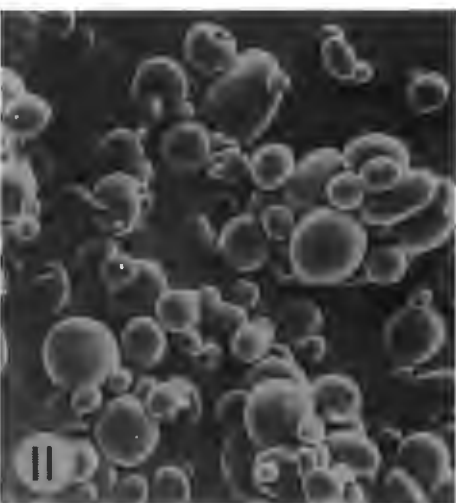


Abbildung 11: Isolierte Stärke aus Mikroknollen von Ukama (Medium 3)
Abbildung 12: Isolierte Stärke aus Mikroknollen von Granola (Medium 3)

Die Histologie der hier untersuchten Mikroknollen entspricht offensichtlich weitgehend derjenigen von in vivo-Kartoffelknollen, sowie der von Solanum-Arten aus den Series *Commersonia*, *Acaulia* und *Tuberosa*-wild (Schittenhelm und Menge, 1992). Auch bei der vergleichenden Analyse von in vitro- und im Feld erzeugten Knollen in Bezug auf Form und Farbe der Knollen und bei der Elektrophorese von Knollenproteinen ergaben sich gute Übereinstimmungen (Tovar et al., 1985).

Solche histologischen Untersuchungen von Mikroknollen können dazu dienen, anhand der Zell- und Stärkestruktur bereits zu einem frühen Zeitpunkt Aussagen über ihre voraussichtliche Lagerfähigkeit zu treffen und Kultur- und Induktionsbedingungen in Richtung auf die angestrebte Lagerdauer von 4 bis 5 Jahren zu optimieren.

Zusammenfassung

In vitro-Knollen (Mikroknollen) können zur Erhaltung des genetischen Potentials der Kartoffel eingesetzt werden. Ihre Lagerfähigkeit ist derzeit jedoch noch relativ kurz (ca. 2 Jahre). Daher wurden Untersuchungen zur Induktion und Lagerfähigkeit gemacht, sowie histologische Parameter von Mikroknollen analysiert. Bei sechs Kartoffelsorten konnten auf drei verschiedenen Induktionsmedien in Abhängigkeit von der Sorte zwischen 0,5 bis 1,4 Knollen pro Pflänzchen induziert werden, die im Mittel 1,9 bis 4,5 mm groß waren.

Nach dreizehnmonatiger in vitro-Einlagerung zeigten ruhende Mikroknollen von zwei exemplarisch untersuchten Sorten vitale Endknospen und eine in vivo-Kartoffeln vergleichbare Gewebestruktur mit von der Knollenperipherie zum Zentrum zunehmenden Zell- und Stärkekorngrößen. Die Packungsdichte der Stärkekörner in den Zellen variierte in Abhängigkeit vom Induktionsmedium und zwischen einer sehr früh bzw. mittelfrüh reifenden Kartoffelsorte.

Die Stärkekörner waren im Mittel 5,8 bis 6,8 µm groß (bei 2 Sorten) und erschienen wie miniaturisierte in vivo-Kartoffelstärkekörner.

Durch histologische Untersuchungen des Stärkespeicherparenchyms können frühzeitig Hinweise auf die voraussichtliche Lagerfähigkeit von Mikroknollen gewonnen werden.

Histological investigations on microtubers of potatoes

In vitro tubers (microtubers) can be used for the conservation of potato germplasm. Nevertheless, at the present time their storing ability is rather short (about 2 years). For that reason investigations were done with respect to the induction and storing ability as well as histological parameters of microtubers. With six potato varieties there was on three media an induction of 0,5 to 1,4 microtubers per plantlet having average diameters of 1,9 to 4,5 mm depending on the variety.

After 13 months of storing in vitro, dormant microtubers of two varieties, which were studied exemplarily, showed vital bud ends and a tissue structure comparable to in vivo potatoes with increasing cell and starch granule size from the periphery to the center of the tuber. The packing density of the starch grains in the cells varied depending on the induction medium and between a very early and a medium early variety. Starch grains had an average diameter of 5,8 to 6,8 µm (two varieties) and looked like deminished starch grains of in vivo potatoes.

Histological investigations of the starch storing tissue can give early indications on the presumable storing ability of the microtubers.

Literatur

Chandra, R., J.H. Dodds, und P. Tovar: In vitro tuberization in potato (*Solanum tuberosum L.*). - Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture, 55 (1988), S.10-20.

Chandra, R., G.J. Randhawa, D.R. Chaudhari und M.D. Upadhyaya: Efficacy of triazols from in vitro production of microtubers in potato. - American Potato Journal, 68 (1991), S.600. (Abstrakt).

Dodds, J.H.: Tissue culture technology: Practical application of sophisticated methods. - American potato Journal 65 (1988), S. 167-180.

Harris, P.M.: The potato crop. - The scientific basis for improvement. Chapman und Hall, J. Wiley, N. York (1978), reprinted 1982.

Hori, Sh.: Formation of storage starch in storage organs. I. The starch formation in potato tuber. - Bot. Mag. (Tokyo) 67 (1954), S. 57-62.

Karnovsky, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. - J. Cell Biol. 27 (1965), S. 137A-138A.

Lizarraga, R., Z. Huaman und J.H. Dodds: In vitro conservation of potato germplasm at the international potato center. - American Potato Journal 66 (1989), S. 253-269.

Murashige, T. und F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - Physiol. Plantarum 15 (1962), S. 473-479.

Reeve, R.M., E. Hautala und M.L. Weaver: Anatomy and compositional variations within potatoes. III. Gross compositional gradients. - American Potato Journal 47 (1970), S. 148-162.

Rosell, G., F.G. de Bertoldi und R. Tizio: In vitro mass tuberisation as a contribution to potato micropropagation. - Potato Research 30 (1987), S.111-116.

Schittenhelm, S. und U. Menge: Knollentragende Solanum-Arten. - Landbauforschung 3 (1992), S. 117-126.

Struik, P. C. und Lommen, W.J.M.: Production, storage and use of micro- and minitubers. - Proc. of the 11th triennial conference of the European Assoc. f Potato Res., Edinburgh, U.K. 8-13 July 1990, Wageningen, Netherlands; EAPR (1990), S. 122-133.

Tovar, P., R. Estrada, L. Schilde-Rentschler und J.H. Dodds: Induction and use of in vitro potato tubers. - Circular. International potato Center 13 (1985), S. 1-5.

Verfasser: Menge-Hartmann, Ute, Dr. rer. nat., Institut für Pflanzenbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Professor Dr. agr. Manfred Dambroth.