

Die Entwicklung einer in vitro-Langzeitlagerungsmethode für Zichorien-Zuchtmaterial (*Cichorium intybus* L.)

GUNDA MIX und LOTHAR FRESE

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Die Wurzelzichorie (*Cichorium intybus* var. *sativum*) ist zur Erzeugung von Inulin und Fructose geeignet. Als mögliche Absatzmärkte für diese agrarischen Rohstoffe werden vor allem die Nahrungsmittelindustrie und die chemisch/pharmazeutische Industrie genannt. Die Wettbewerbsfähigkeit von Wurzelzichorien gegenüber Zucker oder Stärke produzierenden konventionellen Feldfrüchten muß jedoch zunächst durch züchterische Maßnahmen verbessert werden.

Die verfügbare genetische Variabilität aber auch zuchtmethodisch relevante Eigenschaften einer Pflanzenart sind Faktoren, die den Züchtungsfortschritt beeinflussen. In diesem Zusammenhang erweist sich die stark ausgeprägte vegetative Regenerationsfähigkeit der Zichorie als eine wertvolle Eigenschaft, die die Anwendung der Polycross-Methode ermöglicht und die Entwicklung besserer Sorten erleichtern könnte.

Bislang dienten gärtnerische Klonungsverfahren der Vermehrung und langfristigen Erhaltung von selektierten Genotypen. Die Handhabung des Klonmaterials ließe sich jedoch rationalisieren, falls es gelänge, Genotypen über längere Zeiträume in vitro zu lagern. Über die Erzeugung von in vitro-Kulturen bei *Cichorium* wurde bereits von Gautheret (1941), Vasil et al. (1966), Binding et al. (1981) und Mix (1985) berichtet. Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Methode, die zur mittelfristigen in vitro-Lagerung von Klonmaterial geeignet ist.



Abbildung 1: In vitro Zichorienpflanzen. Rechts in Kulturgefäß (3), links in Kulturgefäß (2).

Material und Methoden

Einzelpflanzen wurden 1984 aus den von Frese (1987) beschriebenen Ausgangspopulationen nach züchterischen Gesichtspunkten selektiert und anschließend auf konventionellem Wege geklont. Hierbei zeigte sich, daß nicht alle Genotypen zur natürlichen Regeneration fähig waren. 73 mehr oder weniger gut regenerierende Genotypen stellten das Ausgangsmaterial dar, von denen 40 Genotypen schließlich in die in vitro-Kultur überführt werden konnten.

Den im Gewächshaus angezogenen Pflanzen wurden nicht ganz vollentwickelte Blätter entnommen. Die Inkulturnahme der Blattrippensegmente und die Regeneration zu ganzen Pflanzen in vitro wurde bereits ausführlich beschrieben (Mix, 1985). Die ausreichend bewurzelten Zichorienpflanzen wurden auf einem hormonfreien Nährboden oder Nährlösung in unterschiedlichen Kulturgefäßen weiter kultiviert.

Die Nährlösung setzte sich aus den Mikro- und Makronährstoffen des MS-Grundnährbodens zusammen (Murashige et al., 1962). ThiaminHC1 (0,1 mg/l) und 10 g/l Saccharose wurden der Nährlösung zugesetzt.

Als Kulturgefäße (1) dienten einmal Reagenzgläser (15 cm lang, \varnothing 1,5 cm) und zum anderen Gefäße (2) von 9 cm Höhe und 5 cm Durchmesser (Abb. 1, links). Die Reagenzgläser waren mit einer Filterpapierbrücke ausgestattet, um der Pflanze ausreichend Halt zu geben. Jedes Reagenzglas enthielt 6 ml Nährlösung.

In den Gefäßen dienten entweder Agar Agar (7,5 g/l) oder Perlite als Festigungssubstrat. In jedem Gefäß (2) befand sich ca. 8 g Perlite und 60 ml Nährlösung, die nach dem Autoklavieren zugesetzt wurde.

Die mit Nährlösung oder Nährboden gefüllten Kulturgefäße wurden bei 1,1 bar für 10 Minuten autoklaviert. Die Kultur erfolgte bei einer Tag/Nacht-Temperatur von 20°C bzw. 18°C in einem 12-Stunden-Tag.

Von jedem Genotyp wurden die fünf am kräftigsten entwickelten Pflanzen für die Langzeitlagerung ausgewählt. Jede Pflanze wurde in ein 1 1/2 l fassendes Kulturgefäß (18 cm hoch, \varnothing 10 cm) überführt (Abb. 1, rechts). Dieses Gefäß enthielt ca. 23 g Perlite und 150 ml Nährlösung.

Die Nährlösung, die separat autoklaviert wurde, enthielt die MS-Grundnährstoffe, ThiaminHC1 (0,1 mg/l) und 10 g/l Saccharose. Die Kulturgefäße wurden mit dem Perlite autoklaviert und vor der Übertragung der Pflanzen das Perlite mit der Nährlösung versetzt.

Während der Langzeitlagerung betrug die Tag/Nacht-Temperaturen 20°C bzw. 18°C bei einer Tageslänge von 12 Stunden.

Ergebnisse und Diskussion

Aus den Blattrippensegmenten der 40 Genotypen konnten Pflanzen mit gut ausgebildetem Wurzelsystem entwickelt werden.

Genotypische Unterschiede, wie bei Mix (1985) beschrieben, zeigten sich bei der Regeneration von Pflanzen auch an diesem Versuchsmaterial sehr deutlich. Für eine Langzeiterhaltung von Zichorienpflanzen ist es von entscheidender Bedeutung, eine Methode zur Verfügung zu haben, die eine Wiederkultivierung von Blattrippensegmenten der in vitro-Pflanzen ausschließt.

Versuche haben ergeben, daß Blattrippensegmente von in vitro-Pflanzen eine sehr geringe Regenerationsrate zeigen. Deshalb müssen die Kulturbedingungen so gewählt werden, daß sich an der in vitro-Pflanze neue Sprosse am Wurzelhals entwickeln.

Die drei ausgetesteten Kulturgefäße führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Tabelle 1). An den Pflanzen in den Reagenzgläsern (1) konnte keine Sproßbildung am Wurzelhals beobachtet werden. Die ältesten Blätter der Pflanzen fingen ca. nach zwei Monaten an, sich gelb zu verfärben, was stark vom Genotyp abhing. Nach ca. sechs Monaten waren die ganzen Pflanzen gelb und starben langsam ab. Dieses Absterben beruhte nicht auf einem Nährstoffmangel, da durch eine Erneuerung der Nährlösung (6 ml) nach jeweils vier Wochen dieser Prozeß nicht aufgehalten werden konnte. In den Reagenzgläsern (1) stand für eine gute Entfaltung der Blätter zu wenig Raum zur Verfügung, wodurch die Photosyntheseleistung wahrscheinlich sehr schnell stark absank.

In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Sproßbildung in den Kulturgefäßen (2) (9 cm hoch, \varnothing 5 cm) mit Agar oder Perlite als Festigungssubstrat wiedergegeben. Es ist deutlich abzulesen, daß die Zichorienpflanzen auf Perlite nach sechs Monaten im Durchschnitt bis zu vier Sprosse mehr als auf Agar gebildet hatten.

Nach einem halben Jahr in Kultur verkümmerten die Sprosse am Wurzelhals der Hauptpflanze allmählich, da nur ein begrenzter Raum für die einzelnen Sprosse im Kulturgefäß verblieb. Ein Nährstoffdefizit konnte nicht vorliegen, da alle 6-8 Wochen, abhängig von der Luftfeuchtigkeit im Kulturraum, neue Nährlösung (60 ml) in das Kulturgefäß (2) gegossen wurde.

Tabelle 1: Der Einfluß der Kulturgefäße auf die Anzahl der gebildeten Sprosse pro Zeiteinheit

Kulturgefäße und Substrat	Anzahl der gebildeten Sprosse		
	nach 2 Monaten	nach 6 Monaten	nach einem Jahr
9 cm hoch, \varnothing 5 cm Agar	2 (0 - 4)	1 (0 - 2)	-
9 cm hoch, \varnothing 5 cm Perlite	2 - 3 (0 - 6)	4 - 5 (1 - 8)	-
18 cm hoch, \varnothing 10 cm Perlite	0 - 1 (0 - 3)	2 - 3 (1 - 5)	4 (2 - 6)

Alle Werte der Tabelle sind Durchschnittswerte/Pflanze. Die Werte in den Klammern geben die Spannweite wieder.

Diese Beobachtungen zeigten sehr deutlich, daß für eine Langzeitlagerung Bedingungen notwendig sind, die Pflanzen so lange wie nur möglich in einem Kulturgefäß wachsen zu lassen. Hierbei scheint die Gefäßgröße einen entscheidenden Einfluß auf die Länge der Kulturdauer und die Sekundärsproßbildung an den Pflanzen zu haben. Aus diesem Grund wurden 1 1/2 l fassende Kulturgefäße eingesetzt. In diesen Gefäßen (3) konnten sich die Blätter gut entfalten und das Absterben der Ausgangspflanze um durchschnittlich 4-6 Wochen hinausgezögert werden. Die sekundäre Sproßbildung, wie Tabelle 1 zeigt, setzte erst verstärkt nach 3 bis 4 Monaten ein. Zur gegebenen Zeit wurde jeweils der absterbende Hauptsproß entfernt und alle 2 bis 3 Monate frische Nährlösung hinzugefügt.

Durch die fortlaufende Bildung von neuen Sprossen und das Entfernen der alten Pflanzen ist es bisher gelungen, die Genotypen bis zu 1 1/2 Jahre im gleichen Kulturgefäß (3) zu lagern.

Tabelle 1 zeigt, daß die einzelnen Genotypen eine sehr unterschiedliche Anzahl an Sprossen in vitro regenerieren. Auch bei Versuchen zur in vitro-Kultur bei anderen Pflanzenarten wird diese genotypisch bedingte unterschiedliche Reaktion immer wieder beobachtet.

Die Voraussetzung für den Einsatz der in vitro-Kultur und Langzeitlagerung ist jedoch, daß alle selektierten und im Polycross getesteten Genotypen über einen Zeitraum von 4 und mehr Jahren erhalten werden können. Erst dann kann diese Methode dem Züchter von Nutzen sein.

Zusammenfassung

40 verschiedene Genotypen dienten als Ausgangsmaterial für die Entwicklung einer Methode zur Langzeitlagerung von Klonmaterial der Wurzelzichorie.

Auf Blattrippensegmenten konnten von 40 Genotypen Pflanzen regeneriert werden. Diese Pflanzen wurden in verschiedenen Kulturgefäßen, die unterschiedliche Festigungssubstrate enthielten, weiterkultiviert.

Eine gute Blatt- und Wurzelentwicklung zeigten die Pflanzen dann, wenn sie in einem Kulturgefäß von 9 cm Höhe und 5 cm Durchmesser angezogen wurden. Unter diesen Bedingungen konnte die beste sekundäre Sproßbildung am Wurzelhals (4-5 Sprosse) beobachtet werden. Alle Sprosse verkümmerten jedoch nach einem halben Jahr, da der Raum im Kulturgefäß einen begrenzenden Faktor für eine gute Blattentfaltung darstellte.

Zwischen den Genotypen zeigte sich eine große Spannweite in der Sproßbildung. Innerhalb der Genotypen war die Anzahl der regenerierten Sprosse je Einzelpflanze fast gleich. Sie schwankte in Abhängigkeit vom Genotyp zwischen 1-8 gebildeter Sprosse nach sechsmonatiger Kulturdauer. Die kräftigsten Pflanzen wurden dann für die Langzeitlagerung ausgewählt.

Die Langzeitlagerung der Pflanzen erfolgte in einem 1 1/2 l fassenden Kulturgefäß, das Perlite als Festigungssubstrat enthielt. Die Nährlösung, in der die Pflanzen aufwuchsen, setzte sich aus den MS-Grundnährstoffen, ThiaminHC1 (0,1 mg/l) und 10 g/l Saccharose zusammen. Nach 2 bis 3 Monaten, abhängig von der Wüchsigkeit der Pflanzen, mußte erneut Nährlösung nachgefüllt werden. Die Umweltbedingungen waren bei der Anzucht der in vitro-Pflanzen

und der Langzeitlagerung identisch. Während des 12-Stunden-Tages betrug die Temperatur 20° C und während der Nacht 18° C. Bei Tag/Nacht-Temperaturen von 18° C bzw. 16° C war eine verstärkte Bildung von Schossern zu beobachten, die nicht mehr als spontan bezeichnet werden kann. Um jedes Risiko der Blütenbildung auszuschalten, wurde die Tag/Nacht-Temperatur von 20° C bzw. 18° C gewählt.

Eine Lagerung bei tieferen Temperaturen scheidet bei Zichorienmaterial aus, da unter diesen Bedingungen eine Vernalisation der Pflanzen induziert wird. Die Pflanzen würden alle zu blühen beginnen.

Die bis jetzt gewonnenen Beobachtungen lassen darauf schließen, daß die Pflanzen zweieinhalb Jahre und wahrscheinlich noch länger im gleichen Kulturgefäß verbleiben könnten.

The development of an in vitro long-term storage method of chicory breeding material (*Cichorium intybus* L.)

Forty genotypes served as the basic material for the development of a method for in vitro long-term storage of chicory plants. From 40 genotypes plants could be regenerated on the leaf vein segments. These plants were further cultivated in different culture vessels which contained different supporting agents.

A good development of leaves and roots took place when the plants were grown in culture vessels which were 9 cm high and 5 cm in diameter. Under these conditions the best secondary shoot formation (4-5 sprouts) was observed on the root neck. There was a very great variability between the genotypes in the rate of shoot formation. Within genotypes the number of regenerated shoots per single plant was almost equal and ranged depending on the genotype from 1-8 well developed shoots after six months cultivation. The strongest plants were selected for long-term storage. They were stored in one and a half litre culture vessels which contained Perlite as supporting agent.

The nutrient solution in which the plants were grown was a mixture of MS basic nutrient, together with Thiamine acetic acid (0,1 mg/l) and 10 g/l sucrose. After 2-3 month, according to the plant growth, the vessels had to be filled up with fresh nutrition solution.

The environmental conditions were identical for both in the nursery of the in vitro plants and for the plants in long-term storage. During the 12 hour days the temperature was constant at 20° C, during the night 18° C.

Chicory cannot be stored at much lower temperatures as such temperatures induce premature flowering of the plants. From observations made up to now it can be deduced that the plants may be kept without change in the same culture vessels for at least two and a half years, and probably for a considerably longer time.

Literatur

Binding, H., Nehls, R., Kock, R. und Finger, J.: Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of Dicotyledoneae class. — In: Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 101 (1981), S. 119-130.

Frese, L.: Research on the Genetic Resources of Inulin-containing Chicory (*Cichorium intybus* L.). — In: Proceedings of a Workshop on Evaluation of Genetic Resources for Industrial Purposes. EUCARPIA, 23/24 June 1987, Braunschweig.

Gautheret, R.J.: Sur le repiquage des cultures de tissus d'endive, de salsifis et de topinambour. — In: Compte rendu de l'Academie des Séances Paris (1941), S. 213-217.

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

Murashige, T. und Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. — In: Physiologia plantarum 15 (1962), S. 473-497.

Paulet, P. und Nitsch, J.P.: La néoformation de fleurs sur cultures in vitro de racines de *Cichorium intybus* L. — In: Etude physiologique. — Annales de Physiologie Végétale 6 (1964), S. 333-345.

Vasil, I.K. und Hildebrandt, A.C.: Variation of morphogenetic behaviour in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia*. — In: Annual Journal of Botany 53 (1966), S. 860-869.

Verfasser: Mix, Gunda, Dr. agr.; Frese, Lothar, Dr. rer. hort., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. Manfred Dambroth.