

Langzeitlagerung von Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) in vitro

GUNDA MIX und SIEGFRIED SCHITTENHELM

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Das Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der FAL unterhält gegenwärtig eine Kollektion von 36 Topinamburgenotypen (Schittenhelm, 1987). Bei 37 Neuzugängen wird derzeit mittels Elektrophorese geprüft ob es sich lediglich um Duplikate von vorhandenen oder um neue Herkünfte handelt. Die bislang praktizierte Form der Erhaltung dieser Sammlung besteht aus einer Aufeinanderfolge von Feldanbau und anschließender Winterzwischenlagerung der Knollen. Letztere erfolgt entweder in einer nichttemperierten Halle oder in Kühlkammern bei 5°C. Die Aufbewahrungsgefäße werden hierzu wechselweise mit Knollen und Komposterde beschichtet. Bei Lagerung in Säcken, Kisten oder dergleichen beginnen die Knollen bereits nach 1-2 Wochen zu schimmeln. Die Langzeiterhaltung einer Topinambursammlung in der beschriebenen Form ist sehr arbeitsaufwendig und birgt zudem verschiedene Risiken biotischer und abiotischer Art (Wildverbiß, Überschwemmungen etc.)

Im Rahmen der Bemühungen zur Sicherung der pflanzen-genetischen Ressourcen werden daher bei vegetativ vermehrbaren Arten solche Techniken bevorzugt, die es ermöglichen Pflanzen in vitro zu erhalten. Erfahrungen über in vitro-Langzeitlagerung unter niedrigen Temperaturen liegen schon voneinigen Pflanzenarten vor (z.B. Kartoffel: Mix, 1983; Chrysanthenen: Preil et al., 1979).

Seit etwa 40 Jahren versucht man bei Topinambur aus Kallus Pflanzen zur regenerieren. Es wurden sehr unterschiedliche Nährböden ausgetestet, um die Zellteilungsrate und Zelldifferenzierung zu stimulieren. Die meisten Versuche einer Regeneration von Sprossen aus Speicherparenchym ruhender Knollen waren erfolglos (Nitsch und Nitsch, 1956; Minocha und Halperin, 1974; Markland und Haddon, 1982). Steirücken (1984) testete unterschiedliche Explantate von 10 verschiedenen Genotypen. Bei 5 Genotypen gelang die Regeneration zu Pflanzen, wobei sich die Explantate von Blättern und Rhizomen als am besten geeignet erwiesen.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob mit den aus verschiedenen Explantaten regenerierten Sprosse eine in vitro-Langzeitlagerung durchgeführt werden kann.

Material und Methoden

Als Versuchsmaterial dienen 20 Topinamburgenotypen aus der Institutskollektion. Diese Genotypen unterscheiden sich stark in ihrem äußeren Erscheinungsbild (z.B. Form und Größe der Blätter sowie Form, Größe, Zahl und Farbe der Knollen). Von im Freiland aufgewachsenen Pflanzen wurden

Nodien und Sproßspitzen entnommen. Die Pflanzen befanden sich bei der Entnahme der Gewebeteile im Jugendstadium. Die Topinamburaugen stammten von in Erde gelagerten Knollen.

Bei der Nodien- und Sproßspitzenkultur erfolgte die oberflächliche Desinfektion für 15 Minuten in einer 2% - 8% Calciumhypochloridlösung. Anschließend wurde mehrmals mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Die Gewebeteile wurden immer etwas größer zugeschnitten, damit nach der Desinfektion das durch Calciumhypochlorid geschädigte Gewebe entfernt werden konnte. Der Kultur Nährboden für



Abb. 1: Aus Nodien entwickelte Pflanzen in Reagenzglasern



Abb. 2: Aus Nodien entwickelte Pflanzen im großen Kulturgefäß

die Sproßspitzen basierte auf dem Murashige und Skoog Grundnährboden (Murashige und Skoog, 1962), dem noch 20 g Saccharose und 1 mg/l Auxillin (GA3) zugesetzt wurden. Der MS-Grundnährboden für Nodien wurde durch 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.1 mg/l Thiamin HCL und 10 g/l Saccharose ergänzt. Die regenerierten Pflänzchen wurden zum einen in mit flüssigem Nährboden gefüllte Reagenzgläser (Höhe: 16 cm, Durchmesser: 1.5 cm) und zum anderen in Kulturgefäße (Höhe: 11 cm, Durchmesser: 5 cm) überführt (Abb. 1 und 2).



Abb. 3: Knollenaugenkultur nach Vorbehandlung

Für die Augenkultur wurden die Knollen gut gereinigt und für eine Woche in gasförmigem Stickstoff gelagert, um die Keimruhe der Knollenaugen zu brechen (Abb. 3). Eine Anzahl von Augen wurde direkt ohne Vorbehandlung in Kultur genommen (Abb. 4).

Die Desinfektion der Knollenaugenexplantate erfolgte für 20 Minuten in einer 2 % - 5 %-Calciumhypochloridlösung. Auch hier wurde das geschädigte Gewebe entfernt bevor das Explantat auf den Nährboden aufgelegt wurde (Abb. 5). Zum MS-Grundnährboden wurden pro Liter noch 0.1 mg Benzylaminopurin (BAP), 1 mg Kinetin, 0.5 mg Zeatin Ribosid, 0.1 mg Thiamin HCL, 10 g Saccharose, 10 g Fruktose sowie 10 g Glukose zugesetzt.

Nachdem sich aus den Augen Sprosse entwickelt hatten, wurden diese ebenso wie die Nodien und Sproßspitzen in Reagenzgläser und Kulturgefäße überführt.

Als Nährboden für die aus den drei verschiedenen Explantaten regenerierten Pflanzen wurde einheitlich ein MS-Grundnährboden versetzt mit 20 g/l Saccharose verwendet. Allen festen Nährböden wurde 7.5 g/l Agar zugesetzt. In den Reagenzgläsern mit flüssiger Nährlösung (6 ml/Glas), wurden die Pflänzchen auf Filterpapierbrücken gesetzt (Abb. 1 und 4).

Das Autoklavieren erfolgte für 10 Minuten bei 1.1 bar, nachdem alle Nährböden und Lösungen zuvor auf pH 5.8 eingestellt worden waren. Die Kulturen der verschiedenen Gewebeteile befanden sich in einem Klimaraum bei 22 °C und einer Tag/Nacht-Dauer von 12 h. Die Langzeitlagerung in den Reagenzgläsern erfolgte bei 10 °C, einer Tageslänge von 16 Stunden und einer Lichtintensität von 1.5 KLux. Für die Pflanzen in den großen Kulturgefäßen wurde eine Temperatur von 22 °C am Tag und 18 °C in der Nacht, eine Belichtungsdauer von 16 h und eine Lichtintensität von 5-6 KLux gewählt.

Ergebnisse und Diskussion

Bei allen zwanzig Topinamburgenotypen konnten, mit unterschiedlichem Erfolg, aus den Nodien und Sproßspitzen Pflanzen regeneriert werden. Ein großes Problem stellte die Desinfektion der Gewebeteile dar. Wurden die Sproßspitzen klein genug gewählt, so konnten mit 2 % Calciumhypochlorid eine bakterien- und pilzfreie Kultur angelegt werden. Bei höheren Konzentrationen wurden zuviel Zellen in den Sproßspitzen abgetötet, so daß nur noch bei wenigen Sproßspitzen ein Längenwachstum zu beobachten war.



Abb. 4: Knollenaugenkultur ohne Vorbehandlung

Von den Nodien konnte selbst nach Desinfektion mit 8 % Calciumhypochloridlösung nur eine begrenzte Anzahl weiter kultiviert werden. Je älter die Pflanzen von denen die Nodien entnommen wurden, desto stärker war die systemische Infektion und umso schwieriger die Pflanzenregeneration.

Bis sich aus Sproßspitzen und Nodien gut entwickelte Pflanzen gebildet hatten vergingen im allgemeinen 4-6 Wochen.

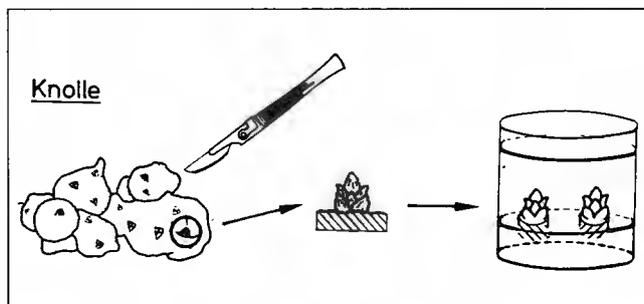


Abb. 5: Schematische Darstellung der in vitro-Augenkultur



Abb. 6: Aus Stolonen sich entwickelnde Pflanzen

Die Knollenaugen erschienen anfänglich als ein geeignetes Gewebeteil, um daraus schnell Pflanzen zu erhalten. Schwierigkeiten taten sich jedoch auch hier auf bei der Erreichung von nicht mit Mikroorganismen verseuchten Augen. Aus diesem Grund mußte überwiegend eine 5 % Calciumhypochloridlösung zur Desinfektion eingesetzt werden. Von einer starken Infektion des Knollenmaterials berichteten auch Steinrücken und Grunewaldt (1984) sowie Markland und Haddon (1982).

Wurden die Augen direkt nach dem Herauspräparieren aus der Knolle in vitro kultiviert, streckte sich das Auge nur wenig und verhartete dann über lange Zeit (2-3 Jahre) in diesem Stadium (Abb. 4). Wurden die Knollen hingegen für eine Woche in reiner Stickstoffatmosphäre gelagert, so reagierten die Augen mit einer schnellen und kräftigen Entwicklung zu Sprossen und Wurzeln (Abb. 3). Fracassini et al. (1980) führten eine 2,4D Behandlung durch um die Keimruhe der Knollen zu brechen. Für unseren Zweck ist diese Methode wegen der mutagenen Wirkung von 2,4D jedoch nicht geeignet.

Für die Weiterkultivierung erwiesen sich Reagenzgläser mit Filterpapierbrücken und 6 ml Nährlösung für Topinambur als weniger geeignet, wohingegen sie sich für die in vitro-Langzeitlagerung von Kartoffelmateriale sehr gut bewährt hatten (Mix, 1983). Die gewählten Reagenzgläser besitzen offensichtlich ein zu begrenztes Volumen, da die Topinamburpflanzen ein sehr gedrungenes Wachstum zeigten (Abb. 1). Nach längerer Kultivierungszeit in vitro war es nicht möglich, aus der gelagerten Pflanze wieder mehrere neue Pflanzen zu erhalten. Nur aus der jeweiligen Sproßspitze einer gelagerten Pflanze konnte wieder eine ganze Pflanze herangezogen werden. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei Zichorien-

pflanzen gemacht (Mix, und Frese, 1988). Das würde bedeuten, daß sich die Pflanzenzahl je Genotyp auf lange Sicht reduziert. Gleichfalls wäre es schwierig bei Nachfragen ausreichend Material zur Verfügung zu stellen.

Diese Schwierigkeiten lassen sich durch die Wahl eines größeren Kulturgefäßes umgehen. Abbildung 2 zeigt eine Topinamburpflanze in einem solchen Kulturgefäß. Es ist zu erkennen, daß sich diese Pflanze deutlich besser entwickelt hat als die gleichaltrige Pflanze im Reagenzglas (Abb. 1, rechts). Weiterhin konnte beobachtet werden, daß die Pflanzen in diesen großen Kulturgefäßen Stolonen bilden, aus denen sich wieder kleine Pflanzen entwickeln (Abb. 6).

Bei Zichorien zeigte sich ebenfalls, daß durch die Wahl größerer Kulturgefäße am Wurzelhals der *in vitro*-Pflanzen neue Sprosse entstehen (Mix und Frese, 1988). Diese Pflanzen lassen sich ohne Schwierigkeiten in neue Kulturgefäße überführen. Man erhält so ein System bei dem sich Pflanzen selbst vermehren. Dieses System ließe sich möglicherweise auch dazu verwenden eine schnelle Vermehrung durchzuführen. Bei der Kartoffel wird die schnelle Vermehrung von vielen Zuchtbetrieben in der Erhaltungszüchtung eingesetzt, um möglichst schnell große Mengen virus- und bakterienfreies Pflanzgut zu erhalten (Wriedt, 1985). Bei Topinambur könnte die schnelle Vermehrung dazu genutzt werden mit vielversprechenden Zuchtklonen ein oder mehrere Generationen der Feldvermehrung zu überspringen, um so die für umfangreichere Prüfungen notwendigen großen Pflanzenzahlen zu bekommen.

Zusammenfassung

Die Erhaltung einer Topinamburkollektion *in vivo* ist nicht nur arbeitsaufwendig sondern auch mit verschiedenen Risiken behaftet. Ausgehend von Sproß- und Knollenexplantaten von 20 Topinamburgenotypen ließen sich *in vitro* erfolgreich neue Pflanzen regenerieren. Für die Langzeiterhaltung erwiesen sich Reagenzgläser als wenig geeignet, da nur die jeweiligen Sproßspitzen zur Weitervermehrung verwendet werden konnten. In größeren Kulturgefäßen hingegen bildeten die *in vitro*-Pflanzen Stolonen aus denen sich wieder mehrere neue Pflanzen entwickelten. Außer für eine Langzeiterhaltung ließe sich ein solches System sich selbst vermehrender *in vitro*-Pflanzen möglicherweise auch zur schnellen Vermehrung von Zuchtmaterial nutzen.

Longterm storage of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) *in vitro*

The preservation of a Jerusalem artichoke collection *in vivo* is not only labour intensive but also risky in a way. Deriving from shoot and tuber explants of 20 genotypes new plants could be regenerated successfully *in vitro*. For longterm preservation test tubes proved to be unsuitable because only the shoot tips could be used for further propagation. In bigger culture vessels the *in vitro* plants formed stolons which can serve as basis for several new plants. Besides longterm storage such a system of self-propagating *in vitro* plants could possibly be used for the rapid propagation of breeding material.

Literatur

Fracassini, D.S.; Bagni, N.; Cionini, P.G. und Bennici, A.: Polyamines and nucleic acids during the first cell cycle of *Helianthus tuberosus* tissue after the dormancy break. - In: *Planta* 148 (1980), S.332-337.

Markland, W. und Haddon, L.: An improved technique for the culture of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) explants for use in the study of xylem differentiation. - In: *Plant Cell Report* 1 (1982), S. 229-231.

Minocha, S.C. und Halperin, W.: Hormones and metabolites which control tracheid differentiation with or without concomitant effects on growth, in cultured tuber tissue of *Helianthus tuberosus* L. - In: *Planta* 116 (1974), S. 319-331.

Mix, G.: Langzeitlagerung von Kartoffelgenmaterial *in vitro*. - In: *Landbauforschung Völkenrode* 33 (1983), S. 179-182.

Mix, G. und Frese, L.: Die Entwicklung einer *in vitro*-Langzeitlagerungsmethode für Zichorien-Zuchtmaterial (*Cichorium intybus* L.). - In: *Landbauforschung Völkenrode* (1988, im Druck).

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

Nitsch, J.P. und Nitsch, C.: Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. - In: *Amer. Journ. of Bot.* 43 (1956), S. 839-851.

Preil, W.; Huhnke, W.; Engelhardt, M. und Hoffman, M.: Gewebekulturen in der Pflanzenzüchtung. - In: *Gb + Gw* 79 (1979), S. 614-618.

Schittenhelm, S.: Preliminary results of a breeding programme with Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). - In: *Proceedings of a Workshop on Evaluation of Genetic Resources for Industrial Purposes*, Braunschweig 23/24 June (1987), S. 209-219.

Steinrücken, G.: Untersuchungen zur Herstellung genetischer Variabilität bei *Helianthus tuberosus* L. - In: *Dissertation Hannover* (1984).

Steinrücken, G. und Grunewaldt, J.: *In vitro*-Regeneration bei *Helianthus tuberosus* L. - In: *Gartenbauwissenschaften* 5/6 (1984), S. 266-269.

Wriedt, G.: Die Gewebekultur in der Erhaltungszüchtung der Kartoffel. - In: *Vorträge für Pflanzenzüchtung*, Heft 8, (1985), S. 26-33.

Verfasser: Mix, Gunda, Dr. agr.; Schittenhelm, Siegfried, Diplom Agrarbiologe; Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. agr. M. Dambroth.