

# Pflanzen

## Produktion und Konservierung von *in vitro*-Kartoffelpflanzgut

Cong Linh Lê, Daniel Thomas, Jean-Pierre de Joffrey und Frederic Tschuy, Eidgenössische Forschungsanstalt für Pflanzenbau Changins (RAC), CH-1260 Nyon 1

Auskünfte: Cong Linh Lê, E-Mail: cong-linh.le@rac.admin.ch, Tel. +41 (0)22 363 44 44

### Zusammenfassung

**Der vorliegende Artikel beschreibt eine Einkapselungstechnik für Kartoffelknollen-Segmente im Miniaturmassstab zur Erhaltung des Wachstumspotenzials während einer langen Konservierungszeit. Knotensegmente mit je einer Achselknospe wurden in einer Kalzium-Alginat-Matrix eingekapselt, die mit einem Murashige und Skoog-Nährmedium angereichert war. Diese Segmente oder Mikrokugeln wurden danach während drei bis 12 Monaten bei einer Temperatur von +4 °C aufbewahrt, um ihre Regenerierungsfähigkeit zu überprüfen. Beim Anbau unter konventionellen Kulturbedingungen nach einem Konservierungsjahr konnten bei der Sorte Matilda mehr als 90 % des eingekapselten Pflanzenmaterials ihr Regenerierungsvermögen normal entwickeln, während bei den Sorten Bintje und Charlotte 80 % respektive nur 40 % des Materials überlebten. Nebst anderen Vermehrungstechniken kann diese neuartige Technik für die Vorstufenproduktion von Kartoffelpflanzgut und zur Konservierung von der agronomisch bedeutenden Genotyp-Sammlungen verwendet werden.**

Im Verlauf des letzten Jahrzehnts wurden grosse Anstrengungen für die Entwicklung der Produktionstechnik von künstlichem Saatgut unternommen (Redenbaugh *et al.*, 1991 und 1993; Gray *et al.*, 1995). Bei vielen angebauten Pflanzenarten, insbesondere bei Koniferen (Attree *et al.*, 1994), Gemüse (Ghosh und Sen, 1994), Obst (Piccioni und Standardi, 1995; Castillo *et al.*, 1998; Pattnaik und Chand, 2000), Zier- (Janeiro *et al.*, 1997) und Gewürzpflanzen (Sharma *et al.*, 1994), wurden Resultate erzielt, welche die Machbarkeit dieser neuen Technologie belegen. In den meisten Fällen wurden somatische Embryonen verwendet (Gray *et al.*, 1995). Die Eignung von anderen Pflanzenorganen wie Apex und Achselknospen wurde für Gehölz- (Bapat, 1993) und Obstarthen (Ganapathi *et al.*, 1992) sowie für Kartoffeln (Sarkar und Naik, 1998) auch erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Konservierungs- und Regenerierungstechnik aus Achselknospen durch Einkapselung entwickelt mit dem Ziel, «künstliches» Pflanzgut zu produzieren, welches entweder der Vermehrung im grossen Stil und/oder der Aufbewahrung der Kartoffel-Genotypen dient, die in der Schweiz angebaut werden.

### Versuchsmaterial

In diesen Versuchen wurden Mini-Kartoffelpflanzen (cv. Bintje, Charlotte und Matilda) verwendet, die gemäss oben beschriebener Technik *in vitro* kultiviert wurden (Lê, 1991).

### Einkapselung

Knotensegmente von 5 mm Länge (Mikrostecklinge) mit je einer Achselknospe wurden der Mutterpflanze entnommen und in eine Murashige-Skoog-Nährlösung (1962) eingetaucht, die verschiedene Alginat-Konzent-

rationen - zwischen 1 und 3% - enthielt. Danach wurden sie in einer Kalziumchlorid-Lösung (100 mM) komplexiert, um Mikrokugeln mit einem Durchmesser von 4 bis 5 mm zu bilden. Letztere wurden schliesslich zwei- bis dreimal mit sterilem Wasser gewaschen, bis sie frei von jeglichem Kalziumchlorid-Überschuss waren.

Um die Auswirkung der Pillierungsart auf das Wachstumspotenzial des Pflanzenmaterials zu ermitteln, wurden die Explantate mit einer oder mehreren Alginat-Schichten umhüllt.

### Konservierung bei kühlen Temperaturen

Mikrokugeln mit je einer Achselknospe wurden in mit Parafilm® versiegelte Petri-Schalen gelegt. Danach wurden sie in einen Kühlraum (+ 4 °C) gestellt, der während der gesamten Konservierungszeit 8 Stunden pro Tag mittels fluoreszierenden Röhren bei einer Intensität von 30 µmol/m<sup>2</sup>/Sek beleuchtet wurde.

### Kulturbedingungen

Am Schluss jeder Konservierungszeit (3, 6, 9 und 12 Monate) wurden die Mikrokugeln auf einen Basis-Nährboden CMS (Lê und Collet, 1985) transferiert und in einen Anzuchttraum bei einer Temperatur von 22 ± 1 °C und einer Photoperiode von 16 Stunden gestellt. Das von fluoreszierenden Röhren (Philips TLD 58W/89) ausgestrahlte Licht erreichte auf Pflanzenhöhe der Kulturen eine Intensität von 55 µmol/m<sup>2</sup>/Sek. Die relative

Feuchtigkeit im Umfeld der Kultur wurde bei 55-60 % aufrechterhalten.

Durch die Beobachtung von 20 Explantaten pro Behandlung wurden das Überleben der Mikrokugeln sowie die Auswirkung der Pillierungsart auf das Wachstumspotenzial der Mikroplanzen beurteilt. Die Anzuchtversuche sind mindestens dreimal wiederholt worden.

Die Resultate der verschiedenen Behandlungen wurden schliesslich einer Varianzanalyse (ANOVA) und einem Vergleich der Mittelwerte anhand des Duncan-Tests ( $p = 0,05$ ) unterzogen.

### **Einfluss der Alginat-Konzentration**

Die Auswirkung der Alginat-Konzentration auf die Überlebensrate der Kartoffel-Mikrokugeln nach 12-monatiger Konservierung gemäss unserem Vorgehen (Tab. 1) ist in Abbildung 1 ersichtlich.

Bei einer Alginat-Konzentration von 1 % verloren die Explantate nach dreimonatiger Aufbewahrung

**Tab. 1. Wachstum der Explantate (cv. Bintje), die während 12 Monaten in einer oder mehreren Alginat-Schichten (3%) bei + 4 °C konserviert wurden. Das Wachstum der beblätterten Triebe wird vier Wochen nach ihrem Anbau bei Raumtemperatur bewertet.**

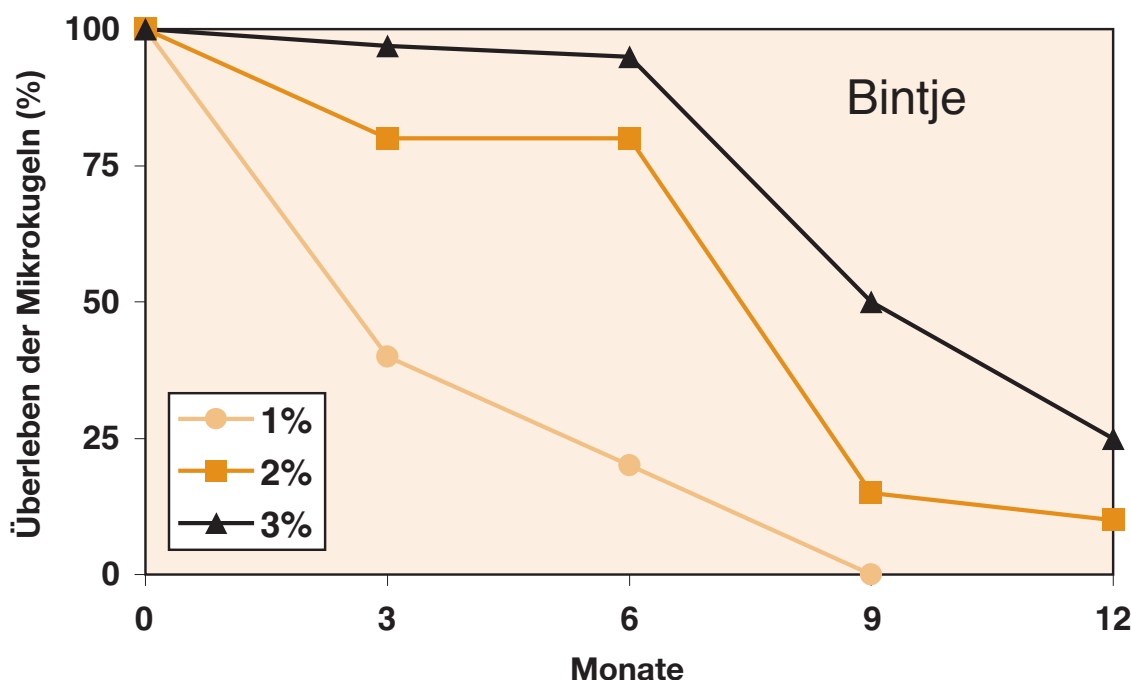
Schicht(en)	Anzahl Triebe/Explantate	Grösse (cm)
0 (Kontrolle)	-	-
1	1,00 ± 0,10b <sup>1</sup>	7,10 ± 0,61b <sup>1</sup>
2	1,80 ± 0,28a	8,90 ± 0,53a
3	1,60 ± 0,21ab	7,00 ± 0,33b

<sup>1</sup> Werte, die vom gleichen Buchstaben gefolgt werden, weisen beim Schwellenwert von 5% gemäss Duncan-Test keine grundlegende Differenz auf.

ihr Wachstumsvermögen sehr rasch (Abb.1). Mit dieser Behandlung war es uns nicht möglich, die Explantate länger als neun Monate am Leben zu erhalten. Wurde der Alginat-Gehalt der Mikrokugeln auf 2 % erhöht, konnten die Explantate bis zu 12 Monate überleben, wobei die Überlebensrate bei 10 % lag. Bei 3%iger Alginat-Konzentration waren bei gleicher Konservierungsdauer 25 % der Explantate vollkommen lebensfähig (Abb. 1).

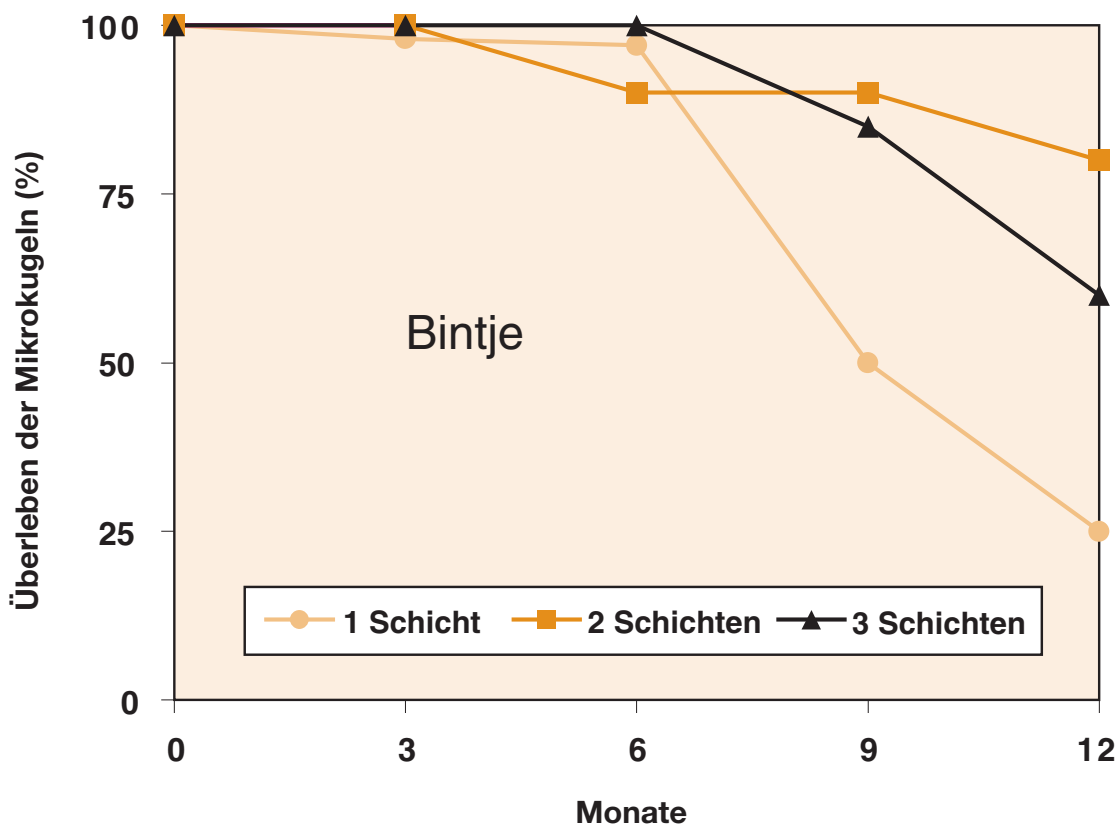
Die negative Auswirkung einer tiefen Alginat-Konzentration auf

das Überleben der Explantate konnten Pattnaik und Chand (2000) ebenfalls beim Maulbeerbaum beobachten. Sie stellten fest, dass Explantate, die mit 2 % Alginat umhüllt waren, zu schwach und schwer zu manipulieren waren. Ganapathi *et al.* (1992) haben ihrerseits aufgezeigt, dass bessere Resultate für die Vermehrung des Bananenbaums erzielt werden können, wenn die Vegetationspunkte mit 3 % Alginat umhüllt wurden. In unseren Versuchen ermöglichte eine solche Konzentration, sowohl die Konservierungsdauer zu verlängern wie auch den An-



**Abb. 1. Beziehung zwischen der Konservierungsdauer und der Überlebensrate der Explantate (cv. Bintje), die mit einer 1-, 2- und 3%igen Alginat-Schicht umhüllt wurden.**

Abb. 2. Beziehung zwischen der Konservierungsdauer und der Überlebensrate der Explantate (cv. Bintje), die mit einer, zwei und drei Alginat-Schichten zu jeweils 3% umhüllt wurden.



teil der Explantate zu erhöhen, die sich bei Raumtemperatur normal entwickeln.

#### Einfluss der Pillierung

Um den Einfluss der Pillierung auf die Wachstums- und Entwicklungsfähigkeit der Explantate im Verlauf der Konservierung zu bestimmen, wurden unterschiedliche Pillierungsarten untersucht, wobei die Explantate mit einer, zwei oder drei Alginat-Schichten zu jeweils 3% umhüllt wurden.

Unter unseren Bedingungen verbesserte die Umhüllung mit mehreren Alginat-Schichten das Überleben der Mikrokeln. Mit einer einzigen Schicht sank hingegen die Überlebensrate drastisch (Abb. 2). Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass mehrere Alginat-Schichten einen bessern Schutz vor Austrocknung während einer langen Konservierungszeit bieten. Die positive Auswirkung der zusätzlichen Alginat-Schichten war nicht nur am Ent-

wicklungspotenzial neuer, beblätterter Triebe ersichtlich, sondern ebenfalls an ihrer Wachstumsfähigkeit, insbesondere bei Explantaten, die mit einer doppelten Alginat-Schicht umhüllt waren (Tab. 1 und Abb. 3). Auf dieses Phänomen ist für die Kartoffeln anscheinend bisher noch nicht hingewiesen worden.

Allerdings wurde eine erhebliche Abnahme der Überlebensrate beobachtet, wenn die Explantate mit drei Alginat-Schichten umhüllt wurden (Abb. 2). Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Nährmatrix zu starr ist, was die Atmung des Pflanzengewebes während der Konservierung bei tiefer Temperatur beeinträchtigt und, wie von Redenbaugh *et al.* (1987) bereits vermutet, dessen Wachstumspotenzial vermindern kann (Abb. 4).

#### Einfluss des Genotyps

In unserem Versuch haben wir ebenfalls den Einfluss des Ge-

notyps auf die Resistenz gegenüber Austrocknung untersucht. Zu diesem Zweck haben wir die Reaktionen, die in zwei Alginat-Schichten umhüllten Explantate der Sorten Bintje, Charlotte und Matilda verglichen (Abb. 5).

Wie in Abbildung 5 ersichtlich, variierte die Fähigkeit der drei untersuchten Genotypen, neue, beblätterte Triebe zu entwickeln, erheblich. Man schätzt, dass mehr als 90% der Mikrokeln der Sorte Matilda ihre Wachstumsfähigkeit nach zwölfmonatiger Konservierung wieder erlangten, während bei den Sorten Bintje und Charlotte 80% respektive nur 40% der Explantate überlebten. Diese unterschiedlichen Reaktionen auf die Aufbereitungsbedingungen der Mikrokeln könnten auf genotypische Eigenschaften zurückzuführen sein. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei anderen untersuchten Pflanzenarten beobachtet (Pattnaik und Chand, 2000).

### Verhalten der regenerierten Pflanzen

Indem die Mikrokugeln nach der Konservierungszeit unter konventionellen Kulturbedingungen angebaut wurden, konnten Pflanzen geschaffen werden, die ihren Wachstums- und Knollenbildungs-Zyklus weiterzuführen vermochten (vgl. Kasten). Analysen mit Molekular-Markern bestätigten, dass diese Pflanzen mit dem Genotyp der jeweiligen Sorte identisch waren (Lê *et al.*, 2002).

### Schlussfolgerungen

Die *in vitro*-Einkapselung der Kartoffelknollen-Segmente stellt eine neue Konservierungsart für qualitativ hochwertiges Pflanzenmaterial dar, welches den agronomisch bedeutenden Genotyp-Kollektionen angehört.

Diese neue Methode ist demzufolge eine sichere und interessante Alternative zu den früher beschriebenen Techniken - wie die Mikro-Stecklingsvermehrung.



Abb. 3. Beziehung zwischen der Konservierungsdauer und der Wiederaufnahme des Wachstums der Explantate (cv. Matilda), die mit einer (links), zwei (mitte) und drei (rechts) Alginat-Schichten umhüllt sind, nach einem Konservierungsjahr bei +4 °C.



Abb. 4. Verlust des Wachstumspotenzials eines Explantats (cv. Bintje), das mit drei Alginat-Schichten umhüllt ist, bei der Rückkehr zur Raumtemperatur.

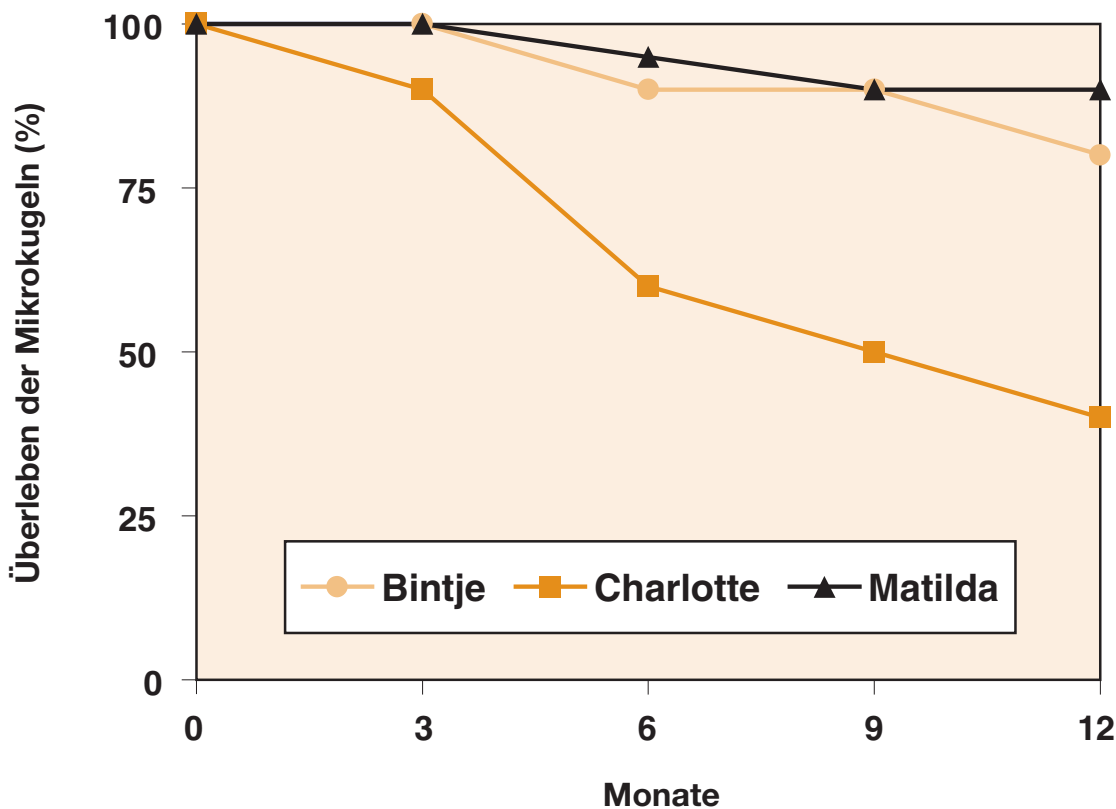
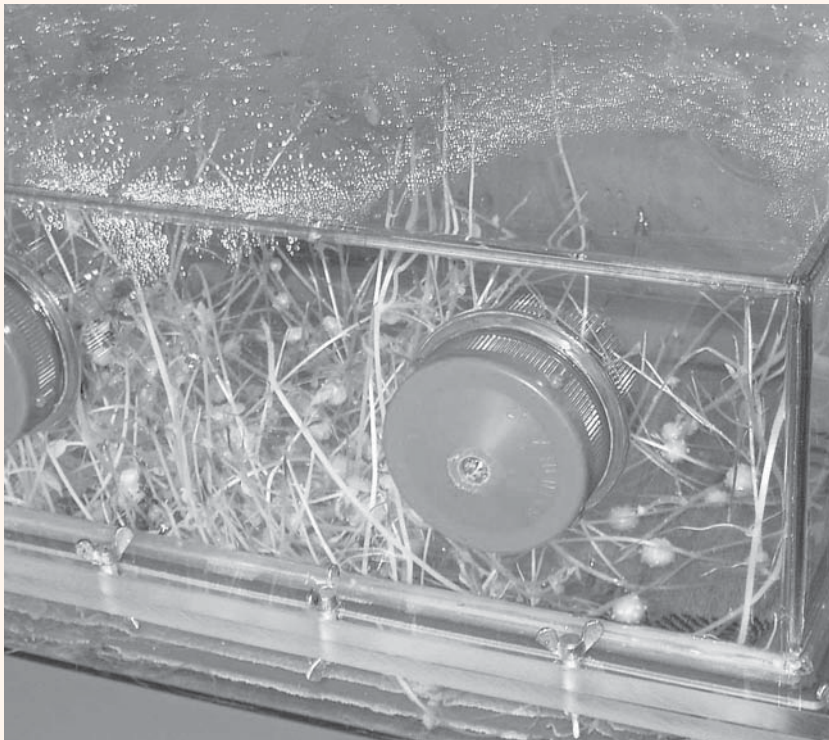


Abb. 5. Überlebensrate der Kartoffelsorten Bintje, Charlotte und Matilda nach zwölfmonatiger Konservierung bei +4 °C.



### Kartoffel-Mikroknollen aus der Dose!



Kartoffel-Mikroknollen können unter strengen Bedingungen, die auf Knollenbildungs-Prozess abgestimmt sind, durchaus in einem geschlossenen System produziert werden. *In vitro*-Kartoffelknoten-Segmente mit je einer Achselknospe werden auf einem festen Substrat, das mit der bereits beschriebenen Nährlösung (Lê, 1999) durchtränkt wurde, in einen Kulturbehälter gestellt (vgl. Abbildung oben). Die Knollenbildung erfolgt, indem die Kulturen folgenden Bedingungen ausgesetzt werden: 8-stündige Beleuchtungsperiode pro 24-stündiger Zyklus, alternierte Temperatur ( $20 \pm 1$  °C/Tag,  $18 \pm 1$  °C/Nacht) und zusätzliche Energiezufuhr in Form von Zucker. Danach werden die Kulturen abgedunkelt, damit sich die Knollen richtig entwickeln können. Die Versorgung mit Nährlösungen erfolgt mittels eines Ernährungssystems über Fluss und Rückfluss durch eine Öffnung, die mit einem geschlossenen Plastikbeutel verbunden ist. Dieses System erlaubt es, die Bedürfnisse an Nährstoffen während der gesamten Kulturdauer ohne jegliches Ansteckungsrisiko dem Bedarf anzupassen. Die Ernte der Mikroknollen erfolgt nach 12 Wochen. Diese Mikroknollen können während des ganzen Jahres produziert werden und stellen erstklassiges Material für die Versorgung mit qualitativ hoch stehendem Vorstufenpflanzgut dar.

**Produktion von Kartoffel-Mikroknollen im geschlossenen System. Eine vom Dienst für in vitro-Kultur der Eidgenössischen Forschungsanstalt Changins/Nyon entwickelte Technik.**

rung (Lê, 1991) und die Mikroknollenbildung (Lê, 1999) - um Vorstufenpflanzgut zur Verfügung zu stellen und die Kartoffelsorten des schweizerischen Sortiments zu konservieren.

### Literatur

- Attree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C., 1994. Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) synthetic seeds in a bioreactor. *Plant Cell Report* **13**, 601-606.
- Bapat V. A., 1993. Studies on synthetic seeds of Sandalwood (*Santalum album* L.) and Mulberry (*Morus indica* L.). In: Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. Redenbaugh K (Ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Fl. USA, 381-408.
- Castillo B., Smith M. A. L., Yadav U. L., 1998. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. *Plant Cell Report* **17**, 172-176.
- Ganapathi T. R., Suprasanna P., Bapat V. A., Rao P. S., 1992. Propagation of banana through encapsulated shoot tips. *Plant Cell Report* **11**, 571-575.
- Ghosh B., Sen S., 1994. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. *Plant Cell Report* **13**, 381-385.
- Gray D. J., Compton M. E., Harrell R. C., Cantliffe D. J., 1995. Somatic embryogenesis and Synthetic Seed I. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 30. Bajaj YPS (ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 126-151.
- Janeiro L. V., Ballester A., Vietez A. M., 1997. *In vitro* response of encapsulated somatic embryos of *Camellia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **51**, 119-125.

Die Arbeit wurde von der Aktion COST 843 (BBW) im Rahmen der Entwicklung von angewandten, pflanzlichen Biotechnologien in der Schweiz, finanziell unterstützt.

- Lê C. L., 1991. Aspects pratiques de la micropropagation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Revue suisse Agric.* **23** (6), 357-358.
- Lê C. L., 1999. *In vitro* microtuberization: an evaluation of culture conditions for the production of virus-free seed potatoes. *Potato Research* **42**, 489-498.
- Lê C. L., Collet G. F., 1985. Assainissement de la variété de pomme de terre *Sangema*. Méthode combinant la thérapie *in vitro* et la culture de méristèmes. *Revue suisse Agric.* **17** (4), 221-225.
- Lê C. L., Thomas D., Nowbuth L., 2002. Conservation des pommes de terre *in vitro* et caractérisation des variétés cultivées en Suisse. *Revue suisse Agric.* **34** (3), 133-136.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
- Mathur J., Ahuja P. S., Lal N., Mathur A. K., 1989. Propagation of *Valeriana wallachii* D. C. using encapsulated apical and axial shoot buds. *Plant Science* **60**, 111-116.
- Pattnaik S., Chand P. K., 2000. Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**, 177-185.
- Piccioni E., Standardi A., 1995. Encapsulation of micropropagated buds of six woody species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **42**, 221-226.
- Redenbaugh K., Slade D., Viss P., Fujii J., 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience* **22**, 803-809.
- Redenbaugh K., Fujii J., Slade D., Viss P., Kossler M., 1991. Artificial seed-encapsulated somatic embryos. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 17. High-tech and Micropropagation I. Bajaj YPS (ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 395-416.
- Redenbaugh K., Fujii J., Slade D., 1993. Hydrated coatings for synthetic seeds. *In: Synseeds. Application of synthetic seeds to crop improvement*. Redenbaugh K. (ed), CRC Press, Boca Raton, Fl. USA, 35-45.
- Sarkar D., Naik P. S., 1998. Synseeds in potato: an investigation using nutrient-encapsulated *in vitro* nodal segments. *Scientia Hort.* **73**, 179-184.
- Sharma T. R., Singh B. M., Chauhan R. S., 1994. Production of disease-free encapsulated buds of *Zingiber officinale* Rosc. *Plant Cell Report* **13**, 300-302.

## RÉSUMÉ

### Bioencapsulation: production et conservation de semences de pomme de terre miniaturisées *in vitro*

On décrit dans cet article une technique d'encapsulation des segments de nœuds de pomme de terre qui permet de conserver leur potentiel de croissance pour une longue conservation. Des segments de nœuds comportant chacun un bourgeon axillaire sont encapsulés dans une matrice d'alginate de calcium enrichie d'une solution nutritive de Murashige et Skoog (1962). Ces segments (ou microbilles) sont conservés ensuite pendant une période allant de 3 à 12 mois à +4 °C, afin de déterminer leur capacité de régénération. Plus de 90 % du matériel encapsulé de la variété Matilda a recouvré son pouvoir de régénération, tandis que 80 % de la variété Bintje et 40 % de Charlotte survivaient après une année de conservation, au retour dans les conditions de culture conventionnelle. Cette technique offre la possibilité de produire des semences de pomme de terre, à côté des autres techniques de multiplication, soit pour la distribution de matériel soit pour la conservation des collections de génotypes agronomiquement importants.

## SUMMARY

### Bioencapsulation: *in vitro* production and conservation of miniaturized seeds of potato

A procedure for the encapsulation of nodal segments of potato aiming to preserve their growth potential for a long period of storage is described. Nodal segments with axillary buds were encapsulated in calcium alginate matrix containing Murashige & Skoog (MS) nutritive medium. These segments (or microbeads) were then stored at +4 °C for a period of 12 months, in order to examine their regeneration capacity. Up to 90 % of encapsulated cv. Matilda plant material retrieved its regeneration potential, while 80 % of cv. *Bintje* and only 40 % of cv. *Charlotte* survived when transferred to conventional conditions after 12 months of storage. This technique offers the possibility of producing potato seeds, beside other means of propagation, for the distribution of pre-basic plant material or for the conservation of agronomically important genotype collections.

**Key words:** *Solanum tuberosum*, artificial seeds, alginate coated beads, encapsulation.