©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Austria)	Vol. 19	Fasc. 3—4	175—179	10. 9. 1979

Untersuchungen zum Kalluswachstum und zur Regeneration von *Lycopersicon esculentum*

Von

K. Danek-Jezik [1]) und J. Schmidt [2])

Mit 2 Abbildungen

Eingegangen am 6. Juli 1978

Summary

Investigations on callus development and regeneration of *Lycopersicon esculentum*

Callus cultures of *L. esculentum* were successfully established on defined nutrient media from young seedlings as well as from stem explants of young plants. Regeneration of plantlets was regularly obtained from young callus of medium growth (up to 30% of the explants). Optimum conditions for callus growth and differentiation were different with respect to the nutrient solution as well as the phytohormones supplied.

Zusammenfassung

Bei der Anlage von Kalluskulturen von *L. esculentum* auf definierten Nährmedien wurden sowohl mit jungen Keimlingen als auch mit Stengelgewebe junger Pflanzen günstige Erfolge erzielt. An jungem Kallus mittleren Wachstums gelang eine regelmäßige Regeneration von Pflänzchen (an maximal 30% der Explantate). Die optimalen Bedingungen für Kallusbildung und Differenzierung waren sowohl hinsichtlich der Nährlösung als auch der Phytohormone verschieden.

Einleitung

Da die Tomate eine unserer wichtigsten Nutzpflanzen ist, besteht wohl erhebliches theoretisches und praktisches Interesse, bei Anlage von Gewebekulturen zu einem raschwüchsigen Kallusgewebe auf definiertem Medium

[1]) Dr. K. Danek-Jezik, Institut für Pflanzenphysiologie, Abteilung Anatomie und angewandte Physiologie der Universität Wien, Leiter: o. Prof. Dr. H. Schindler, Dr. Karl Lueger-Ring 1, A-1010 Wien.

[2]) Dipl.-Ing. J. Schmidt, Institut für Landwirtschaft der Österreichischen Studiengesellschaft für Atomenergie Ges. m. b. H., Leiter: a. o. Prof. Dipl.-Ing. Dr. E. Haunold, Forschungszentrum, A-2444 Seibersdorf.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

zu gelangen, sei es als Standardgewebe für physiologische Untersuchungen oder als Ausgangspunkt für Studien zum Regenerationsverhalten.

Versuche mit Kalluskulturen aus Blättern liegen von PADMANABHAN, PADDOCK & SHARP (1974) vor. Weitere Arbeiten, wie z. B. FUKAMY & MACKINNEY (1967) sowie DE LANGHE & DE BRUIJNE (1976) verwendeten chemisch nicht definierte Medienzusätze (Erbsenextrakt und Kokosnußmilch).

Die Regeneration von Tomate wurde an Blattkallus (PADMANABHAN, PADDOCK & SHARP 1974, BEHKI & LESLEY 1976) und Stengelkulturen beschrieben (DE LANGHE & DE BRUIJNE 1976). Auch aus haploiden Geweben wurde versucht, Regenerate zu gewinnen (GRESSHOFF & DOY 1972) was im Einzelfall auch gelang. Es erschien daher von Interesse, bisher erzielte Ergebnisse zu überprüfen und die Kallusbildung und Regenerationsfähigkeit verschiedener Ausgangsgewebe zu untersuchen.

Material und Methodik

Das Explantatmaterial stammte von der Sorte „Rheinlands Ruhm". In Einzelfällen wurden die Versuche auch mit der Sorte Moneymaker durchgeführt, welche geringfügig schlechteres Wachstum zeigten. Es wurden Versuche mit Früchten, Blättern und Stengeln von Glashauspflanzen sowie mit steril gezogenen Keimlingen durchgeführt.

Die Kulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, auf Agar-Agar-Substrat angelegt (0,8%). Die verwendeten Salzlösungen waren MURASHIGE & SKOOG (1962) und STEINECK (Tab. 1).

Tabelle 1

Salzlösung für Tomate nach STEINECK (1976)

Salz	mMol/l
KNO_3	4,0
$Ca(NO_3)_2$	0,5
CaH_2PO_4	0,5
$MgSO_4$	1,0

Die Spurenelement-, Eisen- und Vitaminlösung wurde nach MURASHIGE & SKOOG (1962) verwendet, dazu 20 g/l Saccharose, 200 mg/l Caseinhydrolysat, 50 mg/l myo-Inosit und 15 mg/l Polyvinyl-2-Pyrrolidon (PVP) zur Bindung von Gerbstoffen (SCHNEIDER & HALLER 1970).

Die Kulturen waren bei 20—24° C und ca. 10.000 Lux (Radium-Halogen-Metalldampflampe) im 16 Stundentag aufgestellt.

Zur Bestimmung des Wachstums wurde eine optische Klassifizierung angewendet, die eine rasche Beurteilung auch von einer großen Anzahl von Kulturröhrchen gestattet und die Kultur in ihrer weiteren Entwicklung nicht stört.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Folgende Einteilung wurde getroffen: tot — abgestorbene Explantate, K_0 — Explantat ohne Kallusansatz, K_1 — geringer Kallusansatz an einzelnen Stellen des Explantats, K_2 — mäßige Kallusentwicklung an mehreren Stellen, K_3 — Kallusbildung auf gesamter Oberfläche des Explantats, K_4 — starkes Kalluswachstum.

Ergebnisse und Diskussion

Die Explantate von Früchten entwickelten nur ganz geringen Kallusansatz, Blätter von Freilandpflanzen erwiesen sich für sterile Kulturen als wenig geeignet. Die Explantate von Stengeln und vor allem das Hypocotyl von steril gezogenen Keimlingen hingegen brachten bei günstiger Hormonkombination (Tab. 2) einen kräftigen raschwüchsigen Kallus hervor.

Tabelle 2

Kallusbildung von Stengelexplantaten auf Murashige & Skoog — Medien mit je 2 ppm Auxinen und 1 ppm Cytokinin wie angegeben sowie zusätzlich jeweils 1 ppm GA_3

Wuchsstoffe in ppm		Ansatz-	nach 6 Wochen				
Auxin	Cytokinin	zahl	tot	K_0	K_1	K_2	K_3
2,4-D	Kinetin	19	—	—	19	—	—
IBS	Kinetin	35	—	12	21	2	—
IES+NES	Kinetin	42	—	4	2	15	21
IES	Kinetin	17	—	—	13	4	—
NES	Kinetin	18	—	2	3	13	—
NES	BAP	33	1	—	32	—	—

Explantate auf Medien mit IES produzierten einen harten, kleinzelligen Kallus. Mit NES dagegen entwickelte sich ein weiches (wäßriges), großzelliges Gewebe. Mit IBS erhielten wir zwar helle, aber sehr kleine Kallusgebilde, mit 2,4-D ebenfalls kleinen aber dunklen brüchigen Kallus ähnlich wie bei Ersatz von Kinetin durch BAP. Die Kombination NES+IES brachte großzelligere und nicht so harte Kalli wie mit IES, die sich außerdem durch die hellere Färbung von den Ansätzen mit NES allein abhoben.

Das Medium nach Steineck schien für die Kallusentwicklung weniger geeignet zu sein. So brachte die Hormonkombination NES und Kinetin häufig keinen oder nur geringen Kallusansatz (von 38 Explantaten 8 K_0, 16 K_1 und 14 K_2), während die gleiche Hormonkombination im Murashige & Skoog-Nährboden (Tab. 2) zumeist mäßige Kallusbildung erlaubte.

Bei Versuchen mit Wuchsstoffen in Konzentrationen bis 10 ppm stellte sich guter Wachstumserfolg nur dann ein, wenn die Auxinkonzentration mindestens doppelt so hoch wie jene des Kinetins gewählt und außerdem Gibberellin beigefügt wurde. Bei höherem Kinetingehalt kam es kaum

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

zur Kallusbildung, aber auch bei mehr als 6 ppm Auxingehalt verfärbten sich die Kalli braun bis schwarz und starben ab.

Samen, die auf MURASHIGE & SKOOG-Medium (flüssig oder durch Agar verfestigt) angekeimt wurden, begannen sich bald am Hypocotyl zu entdifferenzieren und Kallus zu bilden (Abb. 1). Sie bestätigten im wesentlichen die Ergebnisse der Stengelexplantate. So erhielten wir bei der Kombination von je 1 ppm NES, IES, Kinetin und GA_3 nach 4 Wochen von 22 Stück 9 K_2, 8 K_3 und sogar 5 K_4.

Ein drei Monate altes und zweimal überimpftes Kallusgewebe (sowohl vom Stengel als auch vom Keimling) zeigte im Mikroskop deutlich die Bildung von Zellen, die in Form und Größe sehr verschieden waren. Dabei auftretende große Zellformen wurden von KANT & HILDEBRANDT (1969) als polyploid gedeutet (Abb. 2). Es bedarf mehrerer Passagen, bis das Gewebe eine annähernd einheitliche Struktur bekommt.

Mit diesem auf MURASHIGE & SKOOG-Medium kultivierten Kallus wurden Regenerationsversuche gemacht, wobei sich nur die jungen Kulturen — einmal überimpfter Kallus, der maximal die Größe K_2 haben durfte — als brauchbar erwiesen. Aus älteren oder größeren Gewebekulturen ließen sich kaum Sprosse oder Wurzeln entwickeln. Vor allem erwiesen sich dabei niedrigere Hormonkonzentrationen als zielführend (Tab. 3).

Tabelle 3

Verschiedene Hormonkombinationen mit Kinetin zur Regeneration auf STEINECK-Medium

Wuchsstoff (ppm) IES	Kinetin	GA_3	Stück	Wurzelbildung	Sproßbildung
2	1	1	18	4	1
1	2	0,5	24	3	2
1	0,5	0,5	24	24	3
0,5	1	0,5	20	8	7
0,3	0,1	0,1	21	11	6

Im Gegensatz zur Kallusbildung war bei diesen Experimenten das STEINECK-Medium dem von MURASHIGE & SKOOG überlegen. Dies ist möglicherweise auf das Fehlen von Ammoniumionen im STEINECK-Medium zurückzuführen. Eine Verringerung der Salzkonzentration im MURASHIGE & SKOOG-Medium auf ähnliche Werte wie im STEINECK-Medium brachte keinen Erfolg.

Nährmedien ohne GA_3 brachten den Kallus zum Absterben und verhinderten so auch die Sproßbildung. Von den Auxinen erwies sich IES für die Regeneration am besten. Parallelversuche mit NES brachten im Vergleich dazu nur halb so viele Sproßentwicklungen und zeigten kaum Wurzeln.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Bei Verringerung des Auxingehaltes unter 1 ppm (Tab. 3) und Steigerung der Cytokininkonzentration über jene des Auxins (Tab. 4) nimmt auch die Sproßbildung zu. BAP dürfte dem Kinetin zumindest in Einzelfällen überlegen sein, was mit den Ergebnissen von BEHKI & LESLEY (1976) übereinstimmt.

Tabelle 4

Verschiedene Hormonkombinationen mit BAP zur Regeneration auf STEINECK-MEDIUM

Wuchsstoffe (ppm) IES	BAP	GA_3	Stück	Wurzelbildung	Sproßbildung
1	0,5	0,5	21	21	3
0,5	1	0,5	24	6	5
1	2	0,5	23	12	6

Als günstig erwies es sich, Sprosse und Wurzeln nach ca. 6—8 Wochen vorsichtig vom Kallus zu trennen und im Erlenmayerkolben nun in eine MURASHIGE & SKOOG-Nährlösung halber Konzentration ohne Hormone zu verpflanzen und erst später aus dem sterilen Milieu auf Glashauskultur umzustellen. Schließlich gelang es auch, die Regenerate im Freiland weiter zu kultivieren. Weder morphologische noch anatomische Unterschiede konnten zwischen den Regeneraten und aus Samen gezogenen Tomaten festgestellt werden.

Literatur

BEHKI R. M. & LESLEY S. M. 1976. In vitro plant regeneration from leaf explants of *Lycopersicon esculentum*. — Can. J. of Botany 54: 2409—2414.

FUKAMY T. & MACKINNEY G. 1967. Culture of tomato callus tissue. — Nature (Lond.) 213: 944—945.

GRESSHOF P. M. & DOY C. H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. Planta (Berl.) 107: 161—170.

KANT V. & HILDEBRANDT A. C. 1969. Cytomorphological studies of geranium cells in tissue culture. — Phyton (Buenos Aires) 26: 169—175.

DE LANGHE E. & DE BRUIJNE E. 1976. Continuous propagation of tomato plants by means of callus cultures. — Scientia Horticulturae 4: 221—227.

MURASHIGE T. & SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. — Physiol. Plant. 15: 473—497.

PADMANABHAN V., PADDOCK E. F. & SHARP W. R. 1974. Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. — Can. J. of Botany 52: 1429—1432.

SCHNEIDER V. & HALLER V. W. 1970. Polyvinylpyrrolidon als Schutzstoff bei der Untersuchung gerbstoffgehemmter Enzymreaktionen. — Planta (Berl.) 94: 134—139.

STEINECK O. 1976. Persönliche Mitteilung.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

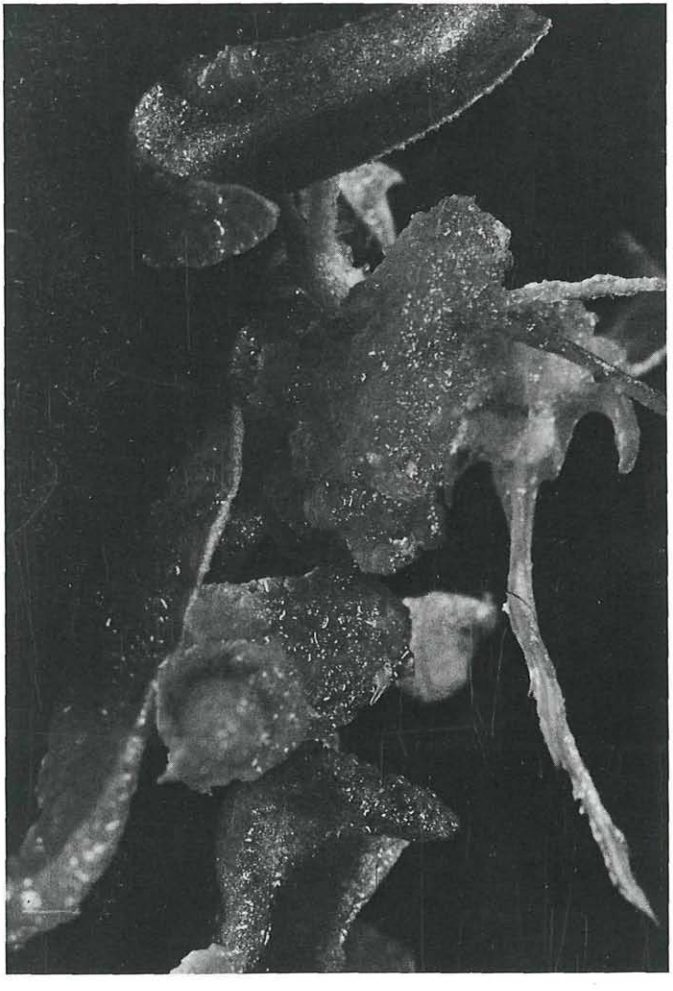

Abb. 1. Keimblätter und primärer Kallus am Hypokotyl einer 1 Monat alten Kultur von sterilisierten Samen

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

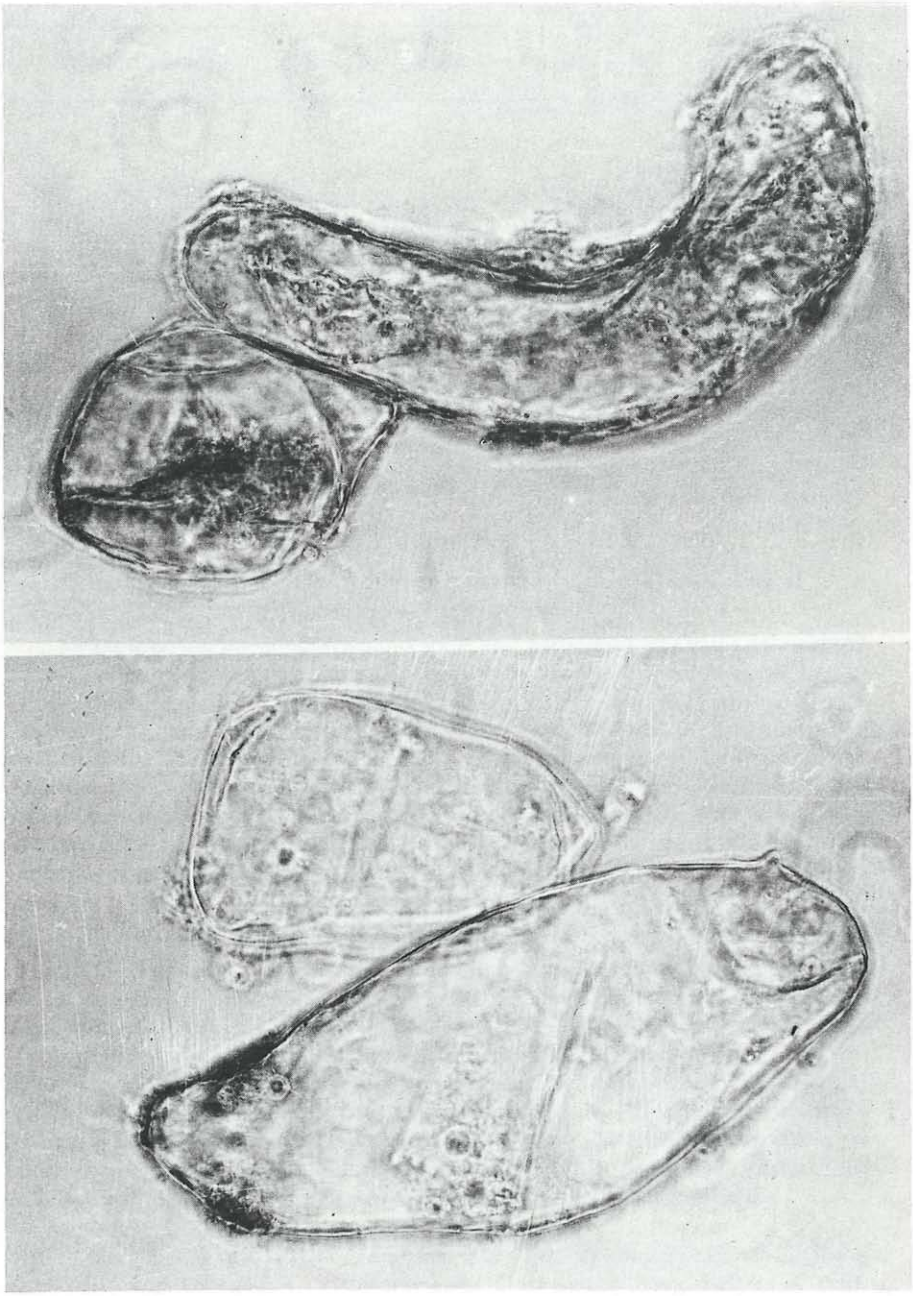

Abb. 2. Einige typische Zellformen eines 3 Monate alten Sekundärkallus (nach einem Quetschpräparat)

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1979

Band/Volume: 19_3_4

Autor(en)/Author(s): Danek-Jezik K., Schmidt J.

Artikel/Article: Untersuchungen zum Kalluswachstum und zur Regeneration von Lycopersicum esculentum. 175-179