

Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen

## Der Einfluß von Wachstumsinhibitoren auf die Langzeitlagerung von *in-vitro*-Kulturen der Rebe

von

G. ALLEWELDT und MARGIT HARST-LANGENBUCHER

### The effect of growth inhibitors on long-term storage of *in vitro* cultures of grapevine

#### Summary:

1. The effect of Cycocel (CCC) and Alar (B 995) on the growth of *in vitro* cultures of grapevine was tested under temperatures of +25, +8 and +3 °C. Both inhibitors were applied to the sterilized medium.
2. Alar caused in rather low concentrations (100 ppm) such a strong growth inhibition that subculturing became difficult. Moreover, the once induced inhibition was maintained in the two subsequent passages after Alar application.
3. CCC at concentrations of 500 to 1000 ppm reduced the length of the internodes of all cultivars tested to an extent of 30—40 % and the number of nodes/plantlet to 20—30 %, but delayed subculturing from 2—3 months to 5—7 months. An after-effect of CCC on subcultured plants was not observed.
4. CCC-treated plantlets had smaller and darker green leaves. Callus formation at the base of the explants was stimulated, whereas root growth was either unaffected or slightly enhanced.
5. CCC (750 ppm) prolonged vitality of the explants during a long-term storage at +8 °C.
6. CCC-treated plantlets (750 ppm) survived after a storage period of 10 months at a reduced storage temperature of +3 °C without any loss of vitality, whereas untreated plantlets did not survive.
7. The results were discussed in context with possible applications in producing of plant material free of virus infections, within the scope of clonal selection, and in storing germplasm.

**Key words:** tissue culture, CCC, growth regulator, temperature, growth, shoot, root, callus, storage.

### Einleitung

Die *in-vitro*-Kultur zur raschen Vermehrung und zur Produktion von virusfreien Pflanzen kann durchaus schon als eine gängige Methode in der Rebenzüchtung angesehen werden (BESSIS 1986), wenngleich viele Fragen im Zusammenhang mit der Eliminierung von Viren noch offen sind (KRUL und MOWBRAY 1984).

Die Erhaltung virusfreier Klone setzt ebenso wie die Erhaltung genetischer Ressourcen unter virusfreien Bedingungen eine Langzeitlagerung von *in-vitro*-Kulturen voraus. Erste Untersuchungen von BARLASS und SKENE (1983) und von GALZY (1985) haben gezeigt, daß eine Vitalitätserhaltung der Explantate über 6—12 Monate bei einer Temperatur von +8—10 °C ohne eine sonst notwendige Subkultur möglich ist. Die vorliegenden Befunde sind jedoch noch sehr unbefriedigend, da sich die angegebenen Licht- und Temperaturbedingungen für eine Langzeitlagerung verschiedener Genotypen als wenig geeignet erwiesen (vgl. ALLEWELDT 1985).

Im Rahmen einer umfangreichen Untersuchung zur Optimierung der Langzeitlagerung wurde auch der Einfluß von Wachstumsinhibitoren auf die Vitalität der Explantate untersucht. Über die bisher erzielten Ergebnisse wird im folgenden berichtet.

## Material und Methoden

Die Kultur der *in-vitro*-Pflanzen erfolgte auf einem leicht abgewandelten Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) mit 0,01 ppm Naphthylethylsäure, 0,03 ppm Benzyladenin und 30 g/l Saccharose. In der Normalkultur wurden eine Temperatur von +25 °C und eine Tageslänge von 16 h bei einer Lichtintensität von 40—50  $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  gewählt.

Als Inhibitoren wurden Cycocel (Chlorcholinchlorid, CCC) und Alar (N,N-Dimethylbernsteinsäure, B 995) eingesetzt. Diese wurden in verschiedenen Konzentrationen durch ein Sterilfilter in das frisch autoklavierte Medium gegeben, nachdem Vorversuche erbracht hatten, daß die Explantate weder nach Applikation über das Blatt noch bei nachträglicher Zugabe der Inhibitoren zum Medium einheitlich reagierten. Da stets mit Stecklingskulturen gearbeitet wurde, fanden Knospenaustrieb, Sproßwachstum und Bewurzelung bereits unter dem Einfluß der gewählten Inhibitoren statt.

## Ergebnisse

### 1. Die Wirkung von Wachstumsinhibitoren auf das Sproßwachstum

Der Knospenaustrieb der *in-vitro*-Stecklinge wurde durch CCC selbst in hohen Konzentrationen von 3000 ppm nur um 1—2 Wochen verzögert, während B 995 bereits im Konzentrationsbereich von 100—500 ppm Austriebsverzögerungen um 2—3 Wochen verursachte und im Konzentrationsbereich zwischen 1000 und 3000 ppm zu einem Ausfall von 40—100 % der Kulturen führte.

Beim Sproßwachstum wurde durch beide Inhibitoren sowohl die Streckung der Internodien gehemmt als auch die Blattformveränderung verlangsamt. Auch hierbei erwiesen sich die Pflanzen gegenüber B 995 als so sensibel, daß weitere Versuche mit diesem Inhibitor als wenig sinnvoll erachtet wurden. CCC indessen führte bei einer Konzentration von 1000 ppm zu einer erwünschten Verkürzung der Sproßlänge, die vor allem durch eine Reduktion der Internodienlänge bedingt war (Abb. 1). Zwar konnte mit höheren Konzentrationen eine noch intensivere Hemmwirkung erzielt werden, doch führte sie zu einer so extremen Internodienverkürzung, daß eine anschließende Vermehrung der Pflanzen schwierig wurde und unerwünschte Ausfälle zur Folge hatte. Die beobachtete Hemmwirkung von CCC und B 995 trat bei allen untersuchten Rebsorten auf. Quantitative Reaktionsdifferenzen konnten nicht festgestellt werden.

Die Blätter der *in-vitro*-Pflanzen waren nach einer Anwendung von B 995 oder CCC augenscheinlich dunkler grün und ein wenig kleiner als bei unbehandelten Pflanzen. Nach der Applikation von CCC konnte zudem festgestellt werden, daß die Blattdicke behandelte Explantate im Vergleich zu den Kontrollpflanzen vergrößert war.

Das Wurzelwachstum der Explantate wurde durch B 995 fast vollständig unterdrückt, durch CCC aber bis zu 1000 ppm erkennbar stimuliert (Abb. 2) oder, bei höheren Konzentrationen, nicht beeinflußt. Auffallend war ferner, daß CCC das Kalluswachstum an der Stecklingsbasis anregte.

Bei der Subkultivierung der mit B 995 behandelten Explantate auf einem unbehandelten Medium blieb die induzierte Wachstumsstörung erhalten: Erneut war der Austrieb verzögert, das Sproßwachstum reduziert und die Wurzelbildung gehemmt, was insgesamt zu hohen Ausfällen führte. Anders verhielten sich die Subkulturen der mit CCC vorbehandelten Explantate: Austrieb, Sproßwachstum und Wurzelbildung

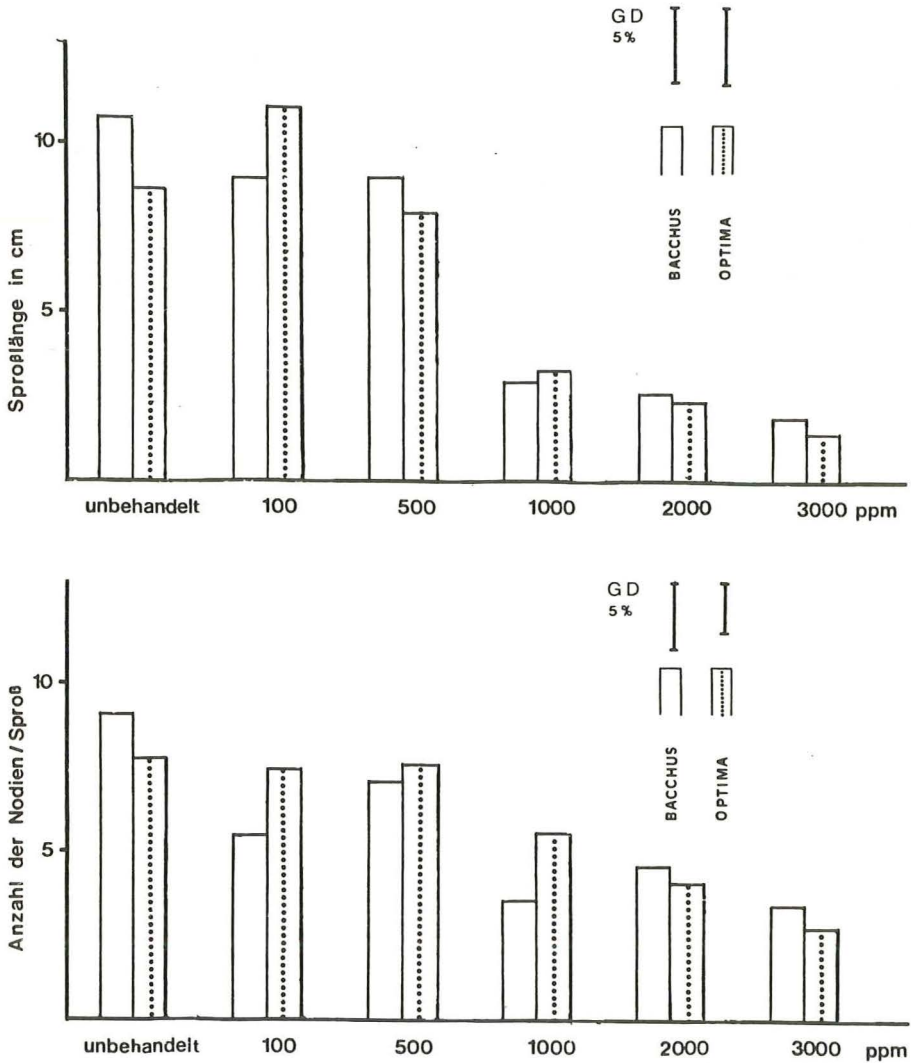


Abb. 1: Einfluß von CCC auf das Längenwachstum und auf die Nodienzahl/Explantat bei den Rebsorten Bacchus und Optima.

Influence of CCC on extension growth and number of nodes/shoot of cvs Bacchus and Optima.

waren normal. Unterschiede zu nicht mit CCC vorbehandelten Pflanzen ließen sich nicht nachweisen.

Die vorgelegten Ergebnisse über die Wirkung von CCC und B 995, über die an anderer Stelle ausführlich berichtet wird, haben gezeigt, daß durch CCC bei Konzentrationen zwischen 500 und 1000 ppm eine reversible Verlangsamung des Sproßwachstums ohne Hemmeffekte auf das Wurzelwachstum erzielt werden kann, während durch B 995 auch im niedrigsten Anwendungsbereich (100 ppm) irreversible Hemm-

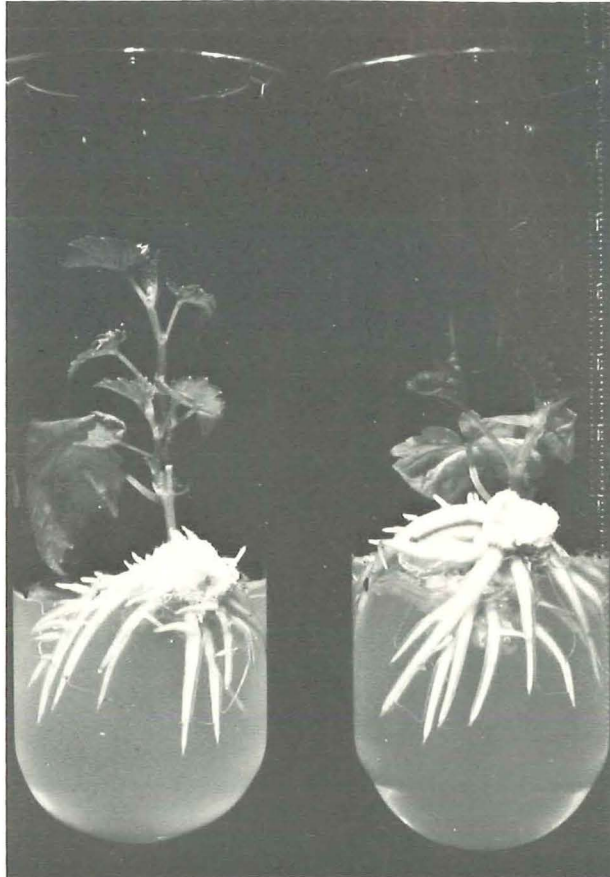


Abb. 2: Einfluß von 500 ppm CCC (rechts) auf das Wurzel- und Kalluswachstum der Rebsorte Bacchus.

Influence of 500 ppm CCC (right) on root growth and callus formation of cv. Bacchus.

wirkungen auftreten. Deshalb wurde für eine Langzeitlagerung unter reduzierten Wachstumsbedingungen eine CCC-Konzentration von 750 ppm gewählt.

## 2. Die Wirkung von CCC auf die Langzeitlagerung von *in-vitro*-Kulturen

Vorangegangene Versuchsreihen haben ergeben, daß die Vitalität der Explantate im photoperiodischen Kurztag (10 h), bei einer verminderten Lichtintensität von  $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  und bei einer Temperatur von  $+8^\circ\text{C}$ , etwa 6—12 Monate erhalten bleibt (ALLEWELDT 1985) — ein Ergebnis, welches weitgehend mit den Befunden anderer Autoren übereinstimmt (BARLASS und SKENE 1983; GALZY 1985), doch für eine ausreichende Langzeitkonservierung von Reben noch wenig erfolgversprechend ist. Auch gibt es Rebsorten, die selbst unter diesen Bedingungen so hohe Ausfälle haben, daß ihre Langzeitlagerung sehr unsicher ist.

In dem Bemühen, die Lagerungsfaktoren von *in-vitro*-Pflanzen zu optimieren, wurde auch die Wirkung von CCC überprüft. Nach kurzer Anzucht bei +25 °C bis zu einer Sproßlänge von 5 cm wurden die Pflanzen einer Langzeitlagerung bei +8 und +3 °C unterworfen. Wie aus der Tabelle hervorgeht, konnte durch CCC die Überlebensrate der Sorte Bacchus bei +8 °C um 10 % und bei der Sorte Optima um 60 % verbessert werden. Selbst eine Lagertemperatur von +3 °C, die für unbehandelte Kontrollen stets letal ist, schränkt die Überlebensrate der Kulturen bei einer CCC-Anwendung von 750 ppm nicht ein (Abb. 3).

Die vitalitätserhöhende bzw. -erhaltende Wirkung von CCC ließ sich zwischenzeitlich bei mehreren Rebsorten nachweisen; über die maximale Lagerungsdauer kann allerdings noch nichts ausgesagt werden. In noch laufenden Versuchsreihen ist eine Lagerdauer von 10—11 Monaten ohne einen erkennbaren oder tolerierbaren Vitalitätsverlust erreicht worden.

Die Überlebensrate in % von *in-vitro*-Pflanzen in der Langzeitlagerung (n = 20 Explantate/  
Variante)

The rate of survival as % of *in vitro* plantlets in the long-term storage (n = 20 explantates/  
treatment)

Rebsorte	+8 °C — ppm CCC			+3 °C — ppm CCC		
	0	500	750	0	500	750
Bacchus	90	100	100	0	80	100
Optima	40	46	100	0	40	100

### Diskussion

Die Wirkung der Wachstumsinhibitoren Cycocel und Alar auf das Wachstum von *in-vitro*-Pflanzen ähnelt weitgehend den an Freilandpflanzen beobachteten und beschriebenen Wachstumsveränderungen: Hemmung der Internodienstreckung, Verlangsamung der Blattbildung und Reduktion der Blattgröße (SKENE und MULLINS 1967; BOURQUIN und ALLEWELDT 1970; WEAVER und POOL 1971; IANNINI 1972; CINDRIC 1975; GIORGESSI und CARGNELLO 1978). Allerdings reichen die vorliegenden Daten nicht aus, um eine eventuelle Sortenspezifität in der Reaktion auf Cycocel oder Alar, wie sie an Freilandpflanzen beschrieben worden ist, auch in der *in-vitro*-Kultur aufzuzeigen. Im Gegenteil: die bisher behandelten Rebsorten reagierten qualitativ und quantitativ in gleicher Weise auf beide Hemmstoffe. Dieser Reaktionsunterschied zwischen Freiland- und *in-vitro*-kultivierten Reben könnte möglicherweise auf die unterschiedliche Applikation der Inhibitoren zurückzuführen sein: an Freilandpflanzen über das Blatt und in der *in-vitro*-Kultur über die Wurzel.

Die intensive Hemmwirkung von Alar auf die *in-vitro*-Kulturen der Rebe schließt seine praktische Nutzenanwendung aus, obgleich Alar bei der *in-vitro*-Kultur der Kartoffel die Langzeitlagerung verbessert (MIX 1981; WESTCOTT 1981). Ob ein eventueller Anwendungsspielraum durch die Applikation von Konzentrationen unter 100 ppm gegeben ist, ist zwar nicht auszuschließen, aber auch wenig wahrscheinlich. Stattdessen erwies sich die Anwendung von 750 bis 1000 ppm CCC als außerordentlich vorteilhaft.



Abb. 3: Die Wirkung einer CCC-Applikation von 750 ppm auf die Vitalität der Explantate der Rebsorte Bacchus nach einer Lagerdauer von 10 Monaten.

Effect of a CCC application at 750 ppm on the vitality of explantates of cv. Bacchus after a storage period of 10 months.

Unter normalen Kulturbedingungen von  $+25^{\circ}\text{C}$  zwingt das rasche Sproßwachstum bereits nach 8—10 Wochen zur Subkultur. Durch CCC kann die Verweildauer der Pflanzen auf demselben Nährmedium auf das 2- bis 3fache, d. h. auf etwa 20—26 Wochen verlängert werden. Obgleich die Vermehrungsrate der mit CCC behandelten Pflanzen aufgrund verkürzter Internodien geringfügig erhöht ist (1 : 7 bis 1 : 8 gegenüber 1 : 5 bis 1 : 6 bei unbehandelten Pflanzen), kann sie die durch die längere Verweildauer bedingte Reduktion der Subkulturen nicht kompensieren, so daß über die Zeit gesehen die potentielle Vermehrungsrate herabgesetzt ist. Für die rasche Anzucht einer Vielzahl von Einzelpflanzen eines Klons ist daher die Anwendung von CCC nicht geeignet.

Die lebensverlängernde Wirkung von CCC in der Langzeitlagerung ist beachtenswert. Wenngleich noch nicht festgestellt worden ist, welches Ausmaß die Vitalitätssteigerung einnimmt, so ergeben sich jetzt schon wichtige Perspektiven. Erstens erhöht sich durch CCC nach längerer Lagerdauer die Überlebensrate von Rebsorten mit schwacher Vitalität, und zweitens wird eine Herabsetzung der Lagertemperatur auf  $+3^{\circ}\text{C}$  ohne Vitalitätsverlust überstanden. Ob langfristig eine Lagertemperatur von  $+3^{\circ}\text{C}$  gegenüber  $+8^{\circ}\text{C}$  sinnvoll ist, müssen erst weitere Untersuchungen ergeben. Der

Befund erlaubt jedoch die Schlußfolgerung, daß die Vitalität der Explantate durch CCC erheblich verbessert wird.

Ob neben CCC auch andere Faktoren die Lebensdauer der *in-vitro*-Kulturen zu verlängern vermögen, ist derzeit noch nicht überschaubar. Einige Indizien weisen darauf hin, daß die Erhöhung der Saccharosekonzentration im Nährmedium von 30 auf 50 g/l ebenso lebensverlängernd wirkt wie eine weitere Herabsetzung der Lichtintensität auf  $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ . Völlige Dunkelheit (vgl. BARLASS und SKENE 1983) indessen wirkte sich auf die Lebensdauer ungünstig aus.

Eine für alle Genotypen gesicherte Lebensdauer von mindestens 12—18 Monaten in der Langzeitlagerung wird von uns als eine Voraussetzung für den Einsatz der *in-vitro*Kultur in der Klonenselektion und in der Erhaltung genetischer Ressourcen gesehen. Die vorliegenden Befunde von FAUSTINI (1982), BARLASS und SKENE (1983) und GALZY (1985) erfüllen diese Forderungen noch nicht.

### Zusammenfassung

1. Es wurde der Einfluß von Cycocel (CCC) und von Alar (B 995) auf das Wachstum von *in-vitro*-Kulturen der Rebe bei +25, +8 und +3 °C untersucht. Beide Inhibitoren wurden dem sterilisierten Nährmedium zugegeben.
2. Alar führte bereits bei niedrigen Konzentrationen (100 ppm) zu einer sehr starken Wachstumshemmung der Explantate, die eine normale Weitervermehrung sehr erschwerte. Zudem konnte eine Nachwirkung der Wachstumshemmung noch in der zweiten Subkultur beobachtet werden.
3. CCC reduzierte bei einer Konzentration von 500—1000 ppm und einer Kulturtemperatur von +25 °C die Streckung der Internodien um 30—40 % und die Blattzahl/Explantat um 20—30 %, erhöhte jedoch die Verweildauer von 2—3 Monaten auf 5—7 Monate. Eine Nachwirkung von CCC auf das Wachstum der Subkulturen wurde nicht beobachtet.
4. Die mit CCC behandelten Pflanzen hatten kleinere und dunklere Blätter. An der Sproßbasis wurde das Kalluswachstum stimuliert. Das Wurzelwachstum blieb unbeeinflusst oder wurde schwach gefördert.
5. In der Langzeitlagerung bei +8 °C löste CCC (750 ppm) eine Vitalitätsverlängerung der Kulturen aus.
6. Durch CCC (750 ppm) konnte bei der Langzeitlagerung von 10 Monaten die Lager-temperatur ohne Vitalitätsverlust von +8 auf +3 °C herabgesetzt werden. Unbehandelte Pflanzen überlebten diese Lagertemperatur nicht.
7. Die Befunde wurden im Hinblick auf die Anwendung in der Produktion von virusfreiem Pflanzgut, in der Klonenselektion und in der Erhaltung genetischer Ressourcen der Rebe diskutiert.

### Literatur

- ALLEWELDT, G.; 1985: Investigations on the cold storage of *in vitro* cultured grapevines. Confér. Amélioration de la Vigne et Culture *in vitro*, 23—28Avril 1985, Paris (Moët-Hennessy), 5—6.
- BARLASS, M.; SKENE, K. G. M.; 1983: Long-term storage of grape *in vitro*. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter, 19—21.
- BESSIS, R.; 1986: Grapevine physiology: the contribution of culture *in vitro*. *Experientia* 42, 927—933.
- BOURQUIN, H. D.; ALLEWELDT, G.; 1970: Der Einfluß von CCC und B 995 auf das Triebwachstum von Reben. *Vitis* 9, 105—120.

- CINDRIC, P.; 1975: Effect of grapevine treatment with chlorine-choline-chloride (CCC) on some physiological characters of leaves. *Savrem. Poljopriv. (Novi Sad)* **23**, 69—80.
- FAUSTINI, R.; 1982: Novel methods for the conservation of genetic material from grapevine. *Vignevini (Bologna)* **9** (9), 11—13.
- GALZY, R.; 1985: Les possibilités de conservation *in vitro* d'une collection de clones de vigne. *Bull. OIV (650—651)*, 377—390.
- GIORGESSI, F.; CARGNELLO, G.; 1978: Ricerche sull'azione di alcuni regolatori di crescita nella vite. *Riv. Viticult. Enol. (Conegliano)* **31**, 290—305.
- IANNINI, B.; 1972: Indagini sulla possibilità di utilizzare il cycocel (CCC) per limitare lo sviluppo della vite confronto fra effetto cimante del trattamento e maturazione tradizionale. *Ann. Ist. Sper. Viticult. (Conegliano)* **29** (5), 94—126.
- KRUL, W. R.; MOWBRAY, G. H.; 1984: Grapes. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMHIRATO, P. V.; YAMADY, Y. (Eds.): *Handbook of Plant Cell Culture 2: Crop Species*, 396—434. MacMillian Publishing Co., New York.
- LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F.; 1965: Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **18**, 100—127.
- MIX, G.; 1981: Kartoffelsorten aus dem Reagenzglas — Bedingungen zur Langzeitlagerung. *Kartoffelbau* **32**, 198—199.
- SKENE, K. G. M.; MULLINS, M. G.; 1967: Effect of CCC on the growth of roots of *Vitis vinifera* L. *Planta* **77**, 157—163.
- WEAVER, R. J.; POOL, R. M.; 1971: Effect of succinic acid-2,2-dimethylhydrazide and (2-chlorethyl)-trimethylammoniumchloride on shoot growth of 'Tokay' grapes. *Amer. J. Enol. Viticult.* **22**, 223—226.
- WESTCOTT, R. J.; 1981: Tissue culture storage of potato germplasm. 2. Use of growth retardants. *Potato Res.* **24**, 343—352.

*Eingegangen am 23. 2. 1987*

Prof. Dr. Dr. h. c. G. ALLEWELDT  
Lehrstuhl für Weinbau  
Universität Hohenheim  
D 7000 Stuttgart 70