

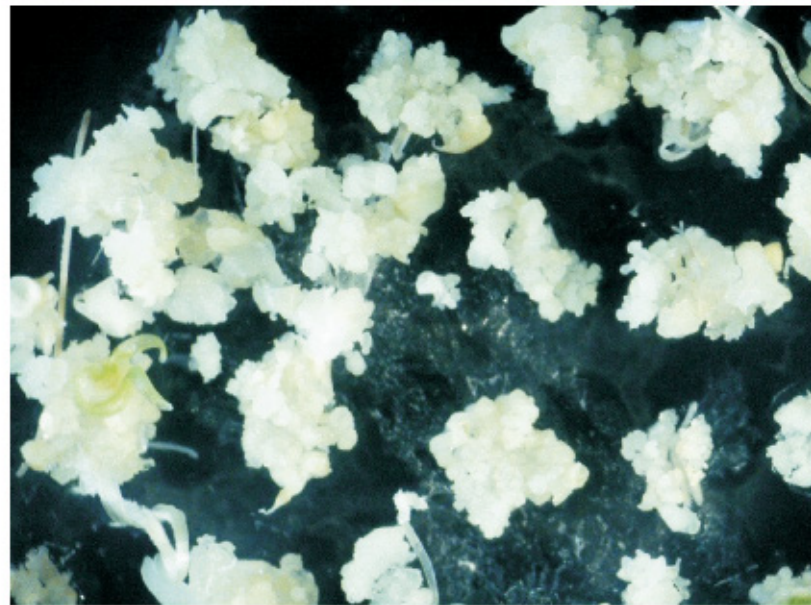


LfL

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Biotechnologie

Zell- und Gewebekulturtechniken



LfL-Information

Impressum:

Herausgeber: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
Vöttinger Straße 38, 85354 Freising-Weihenstephan
Internet: <http://www.LfL.bayern.de>

Redaktion: Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
Am Gereuth 8, 85354 Freising-Weihenstephan
E-Mail: Pflanzenbau@LfL.bayern.de, Tel.: 08161/71-3637

2. Auflage März / 2006

Druck: Lerchl-Druck, Freising

Schutzgebühr: 1,00 €

© LfL



Biotechnologie
Zell- und Gewebekulturtechniken

Dr. Gert Daniel



Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	5
2	Zell- und Gewebekulturtechniken	6
2.1	Methoden zur Erweiterung genetischer Variabilität	6
2.1.1	Antherenkultur	6
2.1.2	Mikrosporenkultur	10
2.1.3	Embryonenkultur	12
2.2	Methoden zur Vermehrung und Erhaltung von Zuchtmaterial	15
2.2.1	Meristemkultur	15
2.2.2	Sprossspitzen- / Nodienkultur	16
3	Züchtungsfortschritt durch Zell- und Gewebekultur.....	17
3.1	Sortenzüchtung	17
3.2	<i>In vitro</i> -Vermehrung und <i>in vitro</i> -Erhaltung von Pflanzen im Rahmen von Zuchtprogrammen	19

1 Einleitung

Der Einsatz biotechnologischer Methoden (Zell- und Gewebekulturtechniken und gentechnologische Methoden) in der landwirtschaftlichen Pflanzenzüchtung verzeichnete in den letzten Jahren einen rasanten Aufschwung. Die Umsetzung der Ergebnisse aus der Grundlagenforschung in die angewandte Forschung und die praktische Anwendung der biotechnologischen Methoden sind bereits weitestgehend erfolgt.

Am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der LfL wurden bereits 1981/82 erste Versuche zum Einsatz der Embryonenkultur in der Getreidezüchtung durchgeführt. In den folgenden Jahren wurden weitere Gewebekulturtechniken, die verschiedenen Methoden der Genomanalyse und des Gentransfers an der LfL etabliert.

Mit dem Einsatz biotechnologischer Methoden im Rahmen der Pflanzenzüchtung befassen sich zur Zeit fünf Arbeitsgruppen:

- Gewebekulturtechniken (IPZ 1a)
- Genomanalyse (IPZ 1b)
- Gentransfer, GVO-Sicherheitsforschung (IPZ 1c)
- Zuchtmethodik und Biotechnologie Kartoffeln (IPZ 3b)
- Züchtungsforschung Hopfen (IPZ 5c)

Schwerpunktmäßig werden folgende Fruchtarten mit biotechnologischen Methoden bearbeitet:

- Sommer- und Wintergerste
- Winterweizen
- Kartoffel
- Hopfen
- Heil- und Gewürzpflanzen

Die vorliegende Zusammenstellung der Gewebekulturtechniken und deren Einsatz in der Pflanzenzüchtung soll den Stand der Arbeiten an der LfL aufzeigen.

Zunächst ein kurzer Überblick über die konventionellen Methoden der Pflanzenzüchtung. Die Pflanzenzüchtung ist das wichtigste Instrument zur Veränderung von Pflanzen, um sie den sich ständig ändernden Bedürfnissen des Menschen anzupassen.

Der Beginn der Pflanzenzüchtung liegt einige Jahrtausende zurück. Erst als die Menschen sesshaft wurden und Nahrungspflanzen anbauten, begannen sie mit der Auslese von Pflanzen, die für sie vorteilhafte Merkmale aufwiesen. Bevorzugt wurden Getreidepflanzen aus-gelesen, bei denen die Körner fester in der Ähre saßen, da bei diesen Pflanzen weniger Körner bei der Ernte herausfielen und somit nicht als Nahrung verloren gingen. Die mit unterschiedlicher Intensität durchgeführte Auslesezüchtung führte zu den ersten „Kulturpflanzen“. Diese Züchtungsmethode verlor an Bedeutung, weil der Mensch anfang, Pflanzenmerkmale verschiedener Wuchstypen oder Herkünfte über Kreuzungen zu kombinieren. Mit der Entdeckung von Gregor Mendel (1822-1884), dass Eigenschaften von Organismen durch Gene bestimmt werden, die bei der Verschmelzung von Ei- und Samenzellen der Elternpflanzen an die Nachkommen weitergegeben werden, war die Kombinationszüchtung „geboren“. Sie ist auch heute noch, trotz der Entwicklung anderer Zuchtmethoden, die vorherrschende Methode zur Schaffung genetischer Vielfalt.

Die biotechnologischen Methoden als Ergänzung und in Verbindung mit der konventionellen Pflanzenzüchtung werden in Abb. 1 dargestellt.

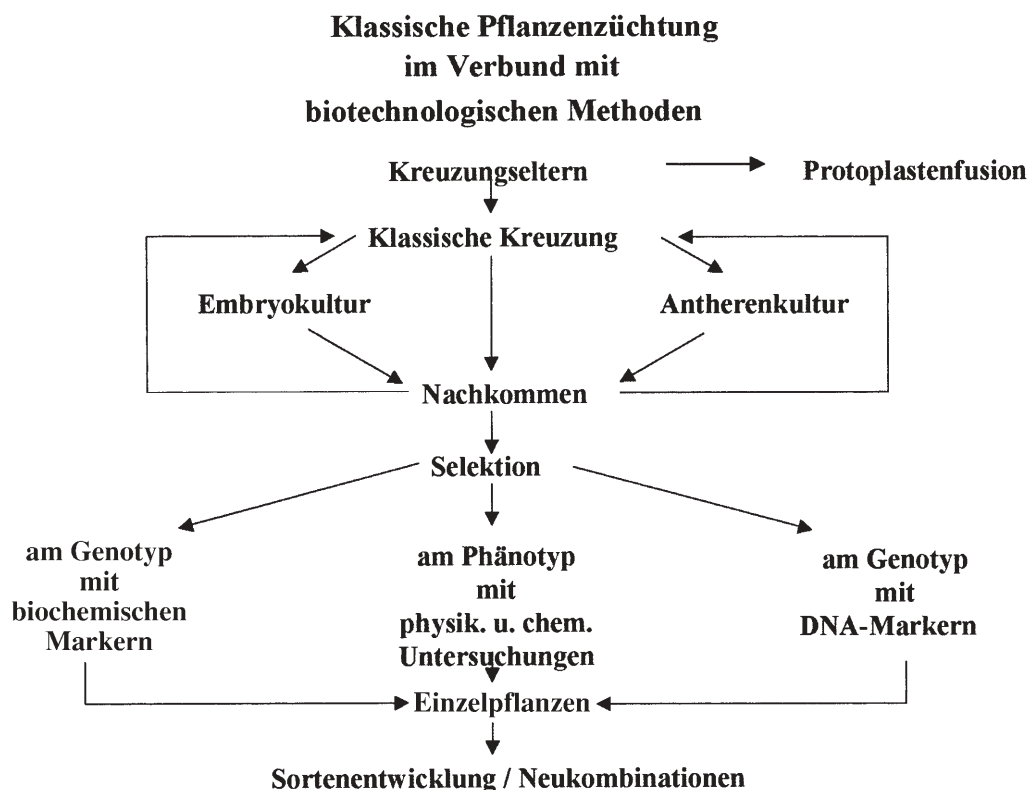


Abb. 1: Schema zur klassischen Züchtung und Biotechnologie im Verbund

2 Zell- und Gewebekulturtechniken

Zell- und Gewebekulturtechniken werden in der Pflanzenzüchtung zur Erweiterung der genetischen Variabilität (Genpool), insbesondere im Hinblick auf Resistenz- und Qualitätseigenschaften, und zur Vermehrung und Erhaltung von Zuchtmaterial eingesetzt.

2.1 Methoden zur Erweiterung genetischer Variabilität

2.1.1 Antherenkultur

Ziel der Antherenkultur ist die Erstellung von doppelhaploiden, reinerbigen Pflanzen ausgehend von heterozygotem Ausgangsmaterial (F1-Kreuzungen).

Die Antherenkultur wird im folgenden am Beispiel der Erzeugung von doppelhaploiden Gerstenlinien behandelt.

Nach erfolgter Kreuzung der beiden ausgewählten Eltern und der Gewinnung der dabei entstehenden Kreuzungskörner werden diese unter kontrollierten Bedingungen zu Spenderpflanzen herangezogen. Die Kreuzungskörner werden in Multitopfplatten in Torfsubstrat zum Keimen ausgesät und entwickeln sich innerhalb von ein bis zwei Wochen zu kleinen, einblättrigen Pflanzen. Bei Wintergerste werden die Pflanzen anschließend bei 4°C für acht Wochen vernalisiert (Simulation des Winters). Bei Wintergetreide ist die Vernalisation zur Umstimmung von der vegetativen zur generativen Entwicklungsphase, d.h. zur Blütenbil-

derung, erforderlich. Sommergerste erfordert zwar keine Vernalisation, aber zur besseren Bestockung der Pflanzen (Anlage mehrerer Halme mit Ähren) werden auch die Sommergersten einer vierwöchigen Kältebehandlung bei 4°C ausgesetzt. Nach erfolgter Kältebehandlung werden die Pflanzen zunächst bei 8°C (6 Wochen) und anschließend für 4-6 Wochen bei 16°C kultiviert, bevor sie im Gewächshaus bei 18-20°C bis zur Gewinnung der Ähren zur Antherenentnahme kultiviert werden.

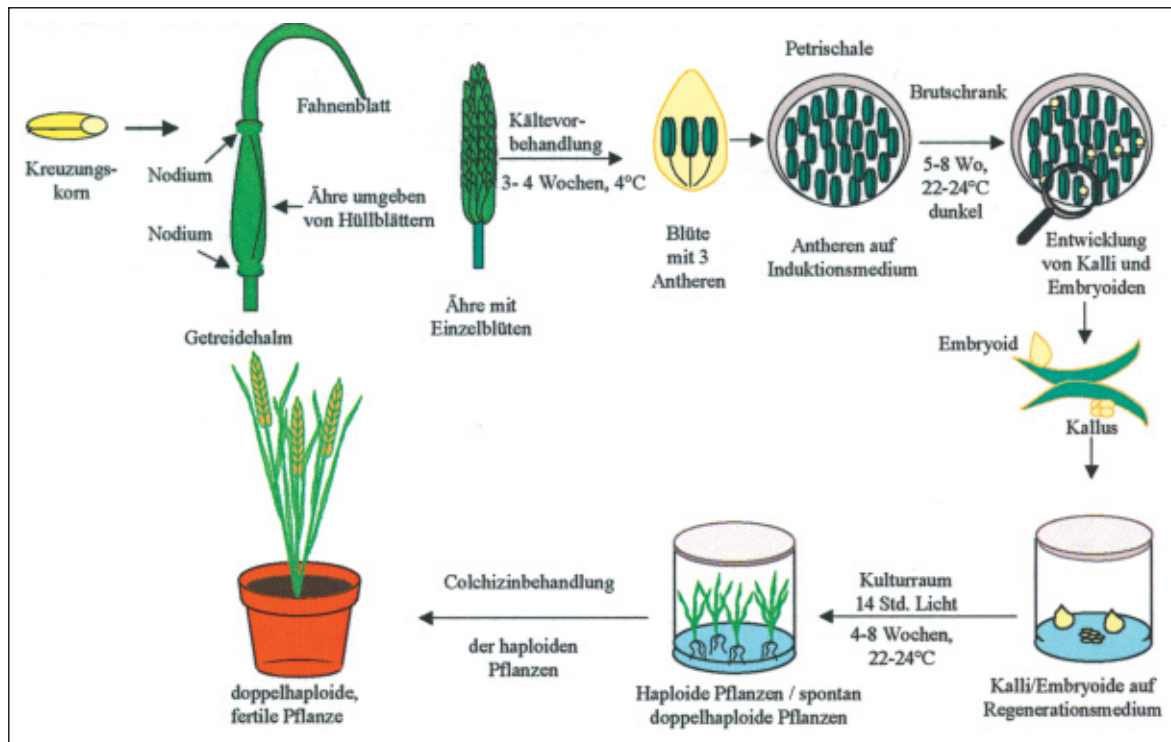


Abb. 2: Schema zur Antherenkultur

Der geeignete Zeitpunkt zur Ernte der Ähren und für die Antherenentnahme ist gegeben, wenn das Fahnenblatt voll entwickelt ist und die Blattscheide sich zu öffnen beginnt. Der Abstand vom Fahnenblatt zum obersten Nodium (Halmknoten) beträgt zu diesem Zeitpunkt zwischen 10 und 15 cm. Die Mikrosporen (unreife Pollenkörner) liegen zu diesem Zeitpunkt im mittleren bis späten Einkernstadium, kurz nach der Pollenmitose, vor. Eine genaue Bestimmung des Pollenstadiums (s. Abbildung 3) sollte vor Beginn des Ährenscheidens bei jedem Kreuzungsgenotyp vorgenommen werden, da sich die Mikrosporen unterschiedlich, abhängig vom Kreuzungsgenotyp, entwickeln können. Die geernteten Spenderähren werden unter sterilen Bedingungen (Reinluft-Werkbank) mit 70%-igem Alkohol oberflächendesinfiziert. Anschließend werden die Ähren aus der Blattscheide entnommen und in eine Hälfte einer geteilten Petrischale gelegt. In die andere Hälfte der Petrischale werden 2-3 ml destilliertes Wasser gegeben, um einem Vertrocknen der Ähren während der Kältevorbehandlung (3-4 Wochen bei 4°C) vorzubeugen. Nach erfolgter Kältevorbehandlung werden die jeweils drei Antheren pro Blütchen unter sterilen Bedingungen aus den einzelnen Blütchen entnommen und auf Induktionsmedium in Petrischalen übertragen. Die Petrischalen werden mit Folie verschlossen und in einem Kulturschrank bei 22-24°C in Dunkelheit für 4-8 Wochen aufgestellt. Nach etwa 3-6 Wochen platzt die Antherenwand auf und entlässt die von den einzelnen Mikrosporen gebildeten Kalli (blumenkohllartige Zellhaufen) und Embryoide die zygotischen Embryonen ähnlich sehen. Im nächsten Kulturschritt werden die Kalli bzw. Embryoide auf Regenerationsmedium in größere Kulturgefäße umgesetzt. Unter Lichtbe-

dingungen (14 Stunden Tag/ 10 Stunden Nacht) regenerieren in weiteren 6-8 Wochen aus den Kalli und Embryoiden 2-3 blättrige Pflanzen. Pflanzen, die sich aus Mikrosporen entwickeln, besitzen nur den einfachen Chromosomensatz, sie sind haploid. Ihre vegetativen Zellen weisen nur den einfachen Chromosomensatz ($2n=x=7$) auf.

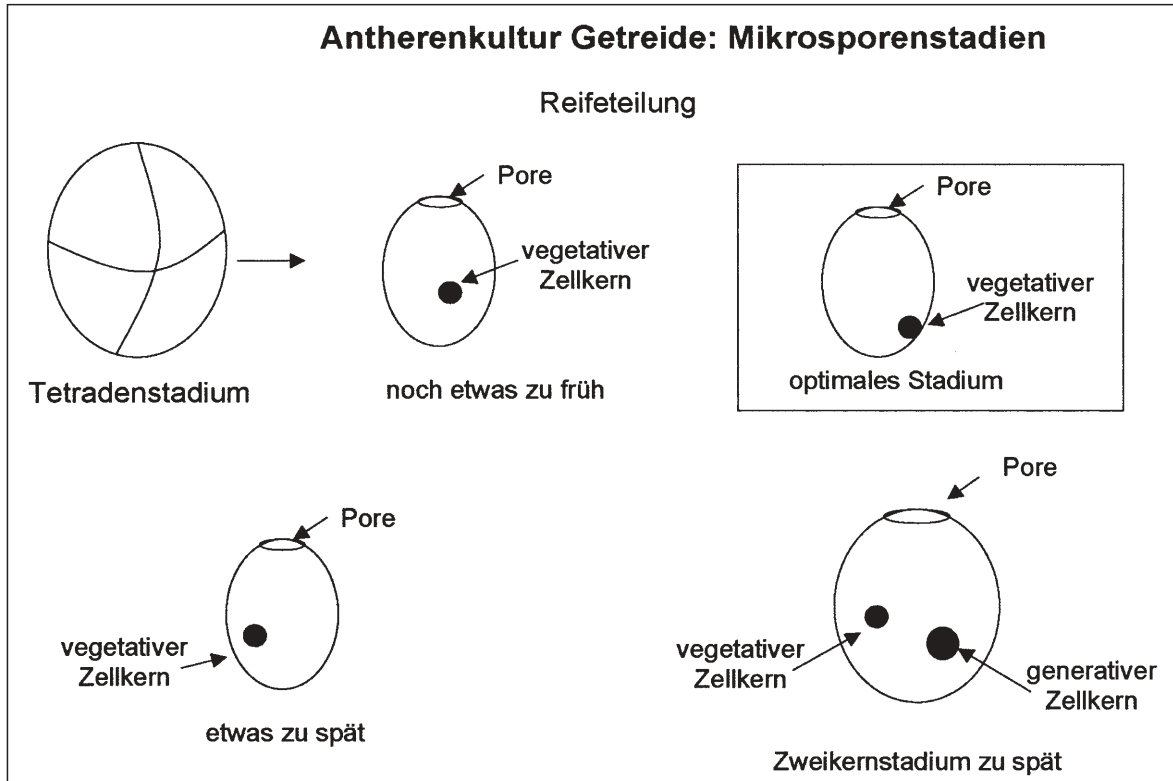


Abb. 3: Schema zur Mikrosporenentwicklung bei Getreide

Haploide Pflanzen können zwar Ähren bilden, aber die Geschlechtszellen der Blüten (Mikrosporen und Eizelle) können keine Reifeteilung durchlaufen und somit sind die Pflanzen steril, d.h. eine Kornbildung ist aufgrund fehlender Befruchtung der Eizelle nicht möglich. Eine Weiterverwendung der haploiden Pflanzen in der Züchtung wäre somit ausgeschlossen.

Nach der Überführung der Pflanzen aus der *in vitro* Kultur in Erde und einer Kulturdauer von 3-4 Wochen im Gewächshaus werden die haploiden Pflanzen einer Colchizinbehandlung (Abb. 4) unterzogen. Colchizin ist das Gift der Herbstzeitlosen. Colchizin, ein Zellgift, bewirkt, dass während der Mitose (vegetative Zellteilung) zwar eine Verdoppelung der Chromosomen stattfindet, die Spindelbildung und Zellteilung jedoch unterbleiben. Die neu gebildeten Zellen besitzen den identisch verdoppelten Chromosomensatz und bei weiteren Zellteilungen entwickeln sich Sprosse mit doppeltem Chromosomensatz. Die alten haploiden Sprosse sterben nach der Colchizinbehandlung ab und aus dem meristematischen Bereich der Wurzelkrone entwickeln sich neue doppelhaploide Sprosse, die den doppelten Chromosomensatz tragen. Die Pflanzen sind homozygot und fertil. Jede einzelne doppelhaploide Pflanze ist Ausgangspunkt einer Linie. Aufgrund der Homozygotie sind ihre Nachkommen identisch mit der doppelhaploiden Elternpflanze. Der Kornansatz der doppelhaploiden Pflanzen beschränkt sich, nach Aufregulierung des Chromosomensatzes durch Colchizinbehandlung, meist auf einige Körner pro Ähre. In der Regel ist daher vor einer Prüfung der Linie in Kleinparzellen eine Zwischenvermehrung erforderlich.



Abb. 4: Schema zur Colchizinbehandlung

Abweichend von dem bisher aufgezeigten Verlauf der Antherenkultur können auch doppelhaploide Pflanzen regenerieren, bei denen der Chromosomensatz während der Regenerationsphase spontan verdoppelt wurde. Ähren dieser spontan doppelhaploiden Pflanzen zeigen eine nahezu normale Einkörnigkeit, d.h. die Ähren sind voll eingekörnt. Das Auftreten von spontan doppelhaploiden Pflanzen wird stark vom Kreuzungsgenotyp und von den Anzuchtbedingungen der Spenderpflanzen und den in vitro-Kulturbedingungen beeinflusst. Bei Gerste beträgt der Anteil spontan doppelhaploider Pflanzen, je nach Genotyp zwischen 50 und 90% bezogen auf die Anzahl regenerierter Pflanzen. (Bei Weizen ist der Anteil an spontan doppelhaploiden Pflanzen selten höher als 20%).

Die Antherenkultur wird an der LfL bei Sommer- und Wintergerste und Winterweizen eingesetzt. Die durchschnittlich erzielten Regenerationsraten (Pflanzen pro 100 Antheren) sind für die verschiedenen Getreidearten in Tab. 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Regenerationsraten bei Gerste und Weizen (Ergebnisse mit Zuchtmaterial)

Kulturart	durchschnittliche Regenerationsrate*	Min	Max
Sommergerste	5	1	25
Wintergerste	10	1	80
Winterweizen	3	0	20

* Anzahl Pflanzen pro 100 Antheren

Der Einsatz der Antherenkultur im Rahmen von Zuchtprogrammen dient in erster Linie der Erstellung von Basiszuchtmaterial und der Erweiterung des Genpools im Bereich der Resistenz- und Qualitätszüchtung. Die Selektion erwünschter Genotypen wird durch die Homozygotie (Reinerbigkeit) der doppelhaploiden Pflanzen wesentlich erleichtert, da der Phänotyp der Pflanze unter den jeweils gegebenen Umwelten den Genotyp (Gesamtheit aller Gene eines Organismus) widerspiegelt.

In der Sortenzüchtung wird die Antherenkultur ebenfalls eingesetzt. In Deutschland sind bereits einige Sorten, die unter Nutzung der Antherenkultur geschaffen wurden, zugelassen. Antherenkulturbürtige, doppelhaploide Pflanzen werden auch zur Markerentwicklung in der Genomanalyse verwendet.

Die Antherenkultur wird an der LfL auch in der Kartoffelzüchtung eingesetzt. Bei Kartoffel werden über die Antherenkultur aus tetraploiden Kartoffellinien ($2n=4x=28$) dihaploide Linien ($2n=2x=24$) erstellt, die anschließend über die Protoplastenfusion kombiniert werden können. Versuche an der LfL zur Antherenkultur bei Kartoffel haben gezeigt, dass ihr Einsatz zur Erzeugung von dihaploiden, trotz bisher geringerer Ausbeuten (unter 1% Regenerationsrate) eine Alternative zur „Phureja Methode“ sein kann.

2.1.2 Mikrosporenkultur

Die Mikrosporenkultur wurde 2004 an der LfL als Alternative zur Antherenkultur bei Gerste etabliert. Sie unterscheidet sich von der Antherenkultur insofern, dass bei ihr nicht die vollständigen Antheren auf Nährmedium kultiviert werden, sondern nur die aus den Antheren isolierten Mikrosporen. Eine Anthere enthält ca. 4000 Mikrosporen.

Die Spenderpflanzenanzucht, die Gewinnung der Spenderähren sowie die Kältevorbehandlung der Spenderähren wird in gleicher Weise wie in der Antherenkultur durchgeführt. In Abb. 5 wird der Ablauf der Mikrosporenkultur ab dem Zeitpunkt der Kältevorbehandlung schematisch dargestellt.

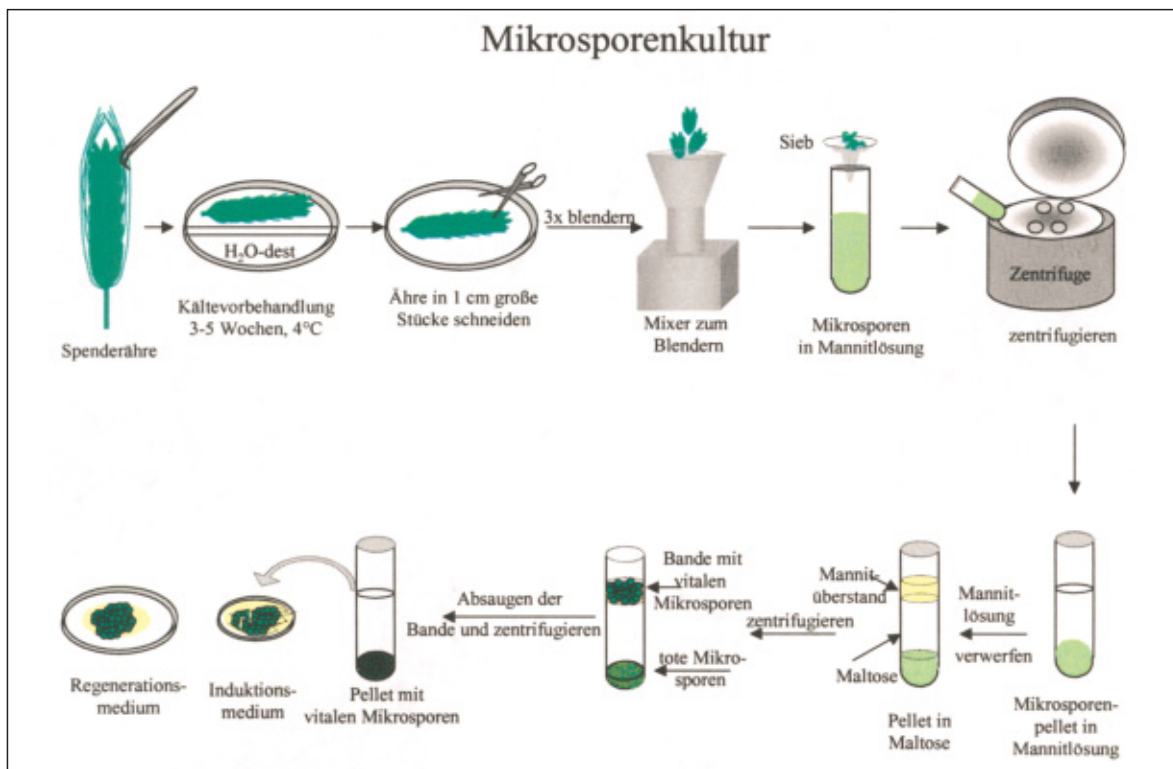


Abb. 5: Schema zum Ablauf der Mikrosporenkultur

Die Ährensegmente werden zur weiteren Zerkleinerung in einen Mixer (Blender) mit einem Zusatz von Mannitlösung gegeben und im Mixer dreimal zerkleinert und gemischt (geblendert). Nach dem ersten Blendern wird das Zellen-Mannitgemisch durch ein Sieb (100 µm) gefiltert und das Filtrat mit den Mikrosporen in einem autoklavierbaren Gefäß aufgefangen. Der im Sieb verbliebene Rest wird in zwei weiteren Durchgängen, nach Zugabe von weite-

rer Mannitlösung, in gleicher Art geblendet. Die im Filtrat aufgefangene Mikrosporenlösung wird anschließend bei 85 x g für 8 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand an Mannitlösung verworfen und das verbleibende Pellet, das tote, zerbrochene und lebende Mikrosporen enthält, mit 19%-iger Maltose aufgegonnen und vorsichtig gemischt. In einem weiteren Schritt wird die erhaltene Maltose-Mikrosporenmischung mit einer 0,3 molaren Mannitlösung überschichtet. Bei der Überschichtung ist darauf zu achten, dass die Mannitlösung sehr vorsichtig einpipettiert wird, damit sich eine klare, saubere Trennschicht bilden kann. Nach einer weiteren Zentrifugation von 15 Minuten bei 85 x g bildet sich in der Mitte des Zentrifugenröhrchens eine deutlich sichtbare Bande, in der sich die lebenden, vitalen Mikrosporen gesammelt haben. Auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens sammeln sich die toten Mikrosporen und Mikrosporenbruchstücke. Die Bande mit den lebenden Mikrosporen wird mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und nach Zugabe eines definierten Volumens von 10-13 ml (definiertes Volumen ist für die spätere Berechnung der Mikrosporendichte erforderlich) einer 0,3 M Mannitlösung erneut bei 85 x g acht Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wird ein Pellet mit lebenden Mikrosporen erhalten. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und dem Pellet anschließend das für die Mikrosporendichte (300.000 Mikrosporen/ 0,1 ml) berechnete Volumen an flüssigem Induktionsmedium zugegeben. Mit einer sterilen Pipette wird diese Mischung aus Nährmedium und Mikrosporen in Petrischalen (d = 3 cm) auf Festmedium ausplattiert. Die Petrischalen werden mit Parafilm verschlossen und unter den gleichen Bedingungen wie bei der Antherenkultur kultiviert.

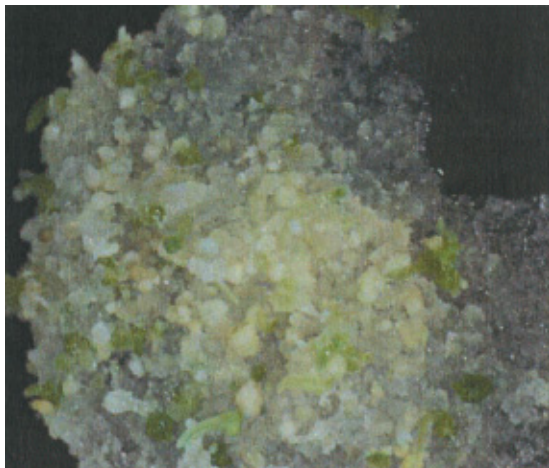


Abb. 6: Beginnende Pflanzenregeneration in der Mikrosporenkultur

Nach ca. einer Woche werden drei Tropfen pro Petrischale Flüssigmedium vorsichtig „zugefüttert“. Zu diesem Zeitpunkt sind unter dem Mikroskop erste Mikrosporenteilungen zu beobachten. Nach 2-3 Wochen, je nach Entwicklung der Mikrosporen, bilden sich sichtbare Kalli oder Embryoide. Diese werden mit dem vorhandenen Nährboden in größere Petrischalen (d = 6 cm) mit dem gleichen Medium übertragen und für weitere zwei Wochen kultiviert, bevor die Kalli/ Mikrosporen auf Regenerationsmedium in Kulturbecher umgesetzt werden. In Abbildung 7 wird die Entwicklung der Mikrosporen schematisch dargestellt.

Mikrosporenentwicklung zu haploiden/ doppelhaploiden Pflanzen

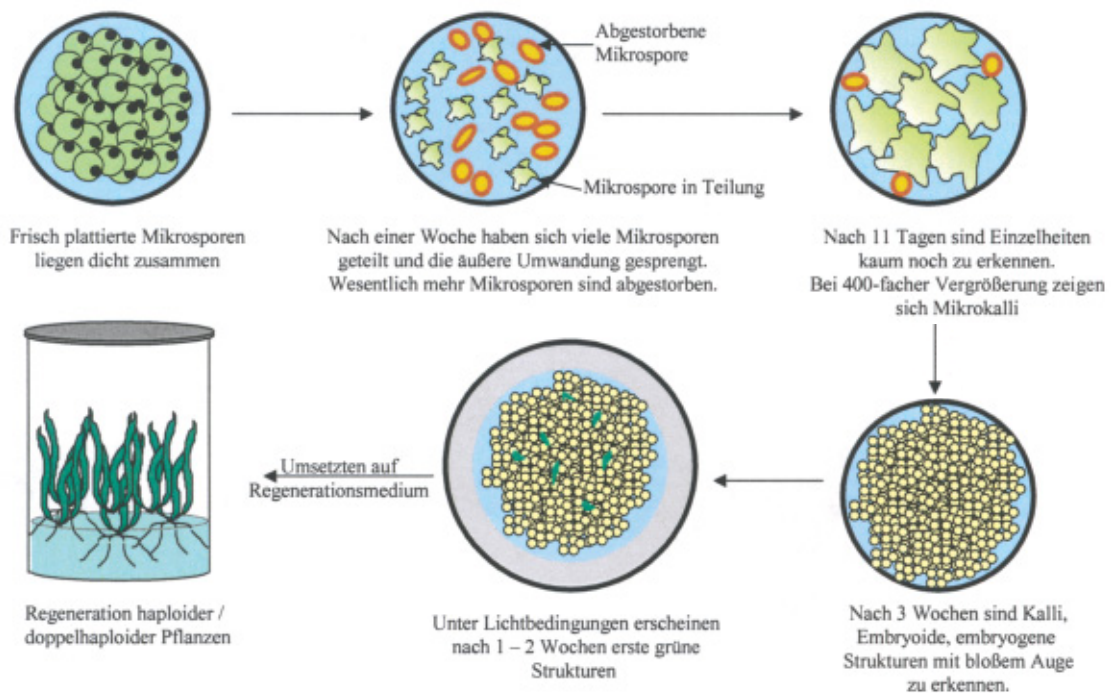


Abb. 7: Schema zur Entwicklung von Mikrosporen in Pflanzen

Ebenso wie in der Antherenkultur können in der Mikrosporenkultur sowohl haploide als auch doppelhaploide Pflanzen regenerieren. Haploide Pflanzen werden zur Erzeugung doppelhaploider Pflanzen in gleicher Weise wie bei der Antherenkultur mit Colchizin zur Verdoppelung des Chromosomensatzes behandelt.

Erste Ergebnisse bei Verwendung von F1- Kreuzungsmaterial zeigen, dass die Ausbeute an haploiden/doppelhaploiden Pflanzen mit der Mikrosporenkultur deutlich höher ist verglichen mit der in der Antherenkultur erzielten Ausbeute. Ein Einfluss der Kreuzungstypen auf die Regenerationsrate haploider/doppelhaploider Pflanzen pro Ähre ist auch bei der Mikrosporenkultur vorhanden. Von einem Kreuzungstyp konnten von zehn Spenderähren (entspricht ca. 400 Antheren) mehrere hundert Pflanzen regeneriert werden. Die Mikrosporenkultur wird seit Anfang 2005 an der LfL in der praktischen Züchtung eingesetzt.

2.1.3 Embryonenkultur

Die Embryonenkultur wird in der Getreidezüchtung in zwei Bereichen eingesetzt:

1. in der Kombinationszüchtung bei der Durchführung von „weiten Kreuzungen“ und
2. in der Haploidiezüchtung zur Erzeugung von haploiden bzw. homozygoten doppelhaploiden Pflanzen.

In der **Kombinationszüchtung** wird die **Embryonenkultur** zum Beispiel in der Weizenzüchtung mit dem Ziel eingesetzt, Resistenzgene aus Wildformen des Weizens in Kulturformen („weite Kreuzung“) zu übertragen. In gleicher Weise wie bei der Kreuzung von adaptiertem Zuchtmaterial beginnt die „weite Kreuzung“ mit der Anzucht der Kreuzungspartner. Im Fall einer „weiten Kreuzung, zum Beispiel Einkreuzung einer Mehlauresistenz bei Weizen, dient die Kulturform (*Triticum aestivum*) als Mutterelter und die Wildform

(z.B. *Triticum turgidum* var. *dicocoides*, Resistenzträger) als Vaterelter. Nach der Bestäubung der Mutterpflanze werden, im Gegensatz zu Kreuzungen von adaptiertem Zuchtmaterial, Karyopsen gebildet, die einen Embryo enthalten, aber deren Endosperm (Nährgewebe) nur unzureichend ausgebildet ist oder aufgrund einer Unverträglichkeit zwischen Embryo und Nährgewebe die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen nicht gewährleistet. Eine unzureichende Versorgung des Embryos mit Nährstoffen stört die Entwicklung des Embryos und der Embryo stirbt ab. Das Absterben des Embryos kann verhindert werden, wenn der gebildete Embryo im Alter von 16 –18 Tagen, bei einer Größe von ~ 2 - 5 mm, unter sterilen Bedingungen (Reinluftwerkbank) unter einem Stereomikroskop aus der Karyopse herauspräpariert und auf Nährmedium unter *in vitro* Bedingungen kultiviert wird. Der Kornansatz bei Abreife der embryobürtigen Pflanzen ist oft gering und hängt außer von der Vitalität der Pflanzen auch von der Verträglichkeit der Kreuzungspartner ab.

Die Embryonenkultur ist kein neues Zuchtverfahren, sondern lediglich eine biotechnologische Methode, die im Rahmen der Kombinationszüchtung eingesetzt werden kann. Die Auswahl der Kreuzungspartner sowie die Selektion erwünschter Genotypen und deren Einbau in komplexe Zuchtprogramme bleibt in der Verantwortung des Züchters.

In der **Haploidiezüchtung** wird die **Embryonenkultur** an der LfL bei Winterweizen seit 2004 routinemäßig zur Erstellung von haploiden/doppelhaploiden Pflanzen eingesetzt. Die Embryonenkultur im Rahmen der Haploidiezüchtung ist schematisch in Abb. 8 dargestellt.

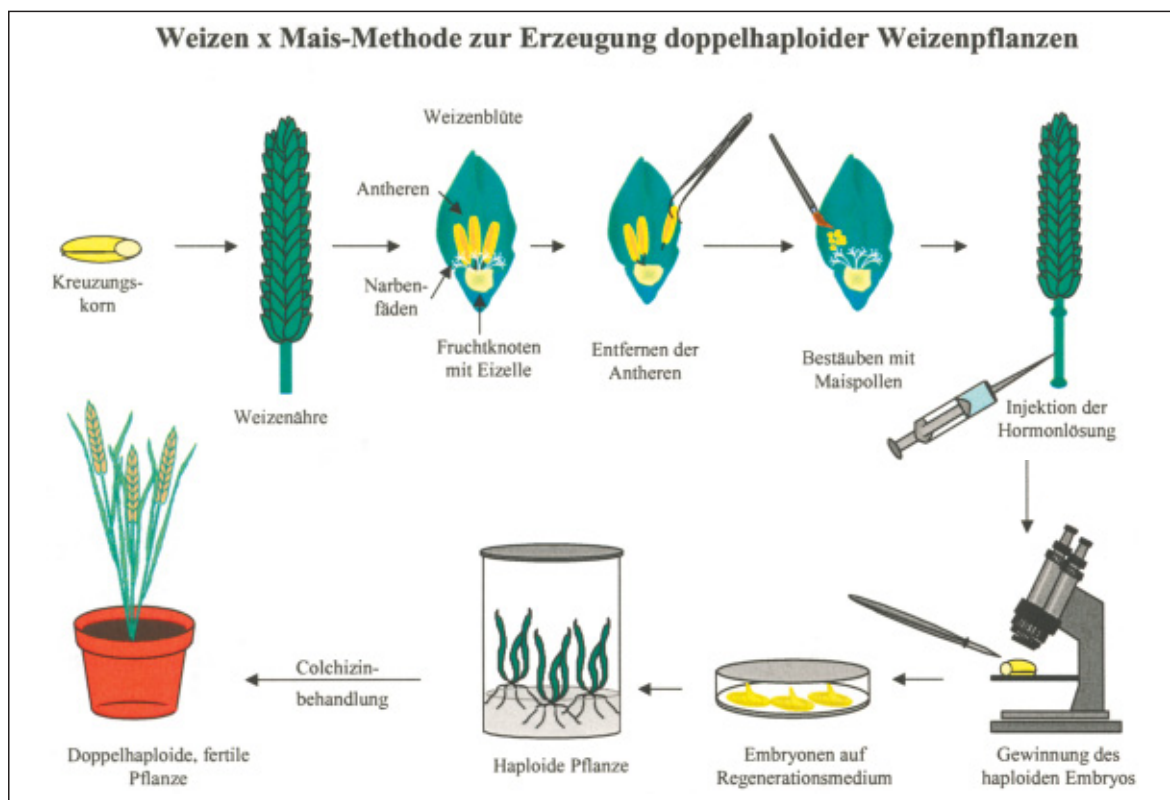


Abb. 8: Schema zur Weizen x Mais-Methode

Anzucht der Spenderpflanzen bei Weizen

Ausgehend von Kreuzungskörnern werden die Spenderpflanzen des Weizens herangezogen. Da es sich um Winterweizen handelt, werden die Pflanzen 1-2 Wochen nach der Keimung bei 4°C für 8 Wochen vernalisiert (Simulation des Winters s. Spenderpflanzenanzucht Antherenkultur). Nach erfolgter Vernalisation werden die Pflanzen für ca. 4 Wochen in einem Kulturraum bei 16°C kultiviert, sofern dies zur Synchronisation mit der Maisblüte erforder-

lich ist. Bis zur Bestäubung der Weizenähren mit Zuckermaispollen werden die Weizenpflanzen bei 22-24°C im Gewächshaus kultiviert.

Anzucht der Pollenspenderpflanzen bei Zuckermais

Zuckermaiskörner werden zur Anzucht der Pollenspenderpflanzen ca. 10 Wochen vor der erwarteten Weizenblüte ausgesät und im Gewächshaus bei 22-24°C herangezogen.

Ein bis zwei Tage vor der Anthese (Reife und Schüttung der Pollen) der Weizenblütchen werden sie durch Entfernung der Antheren kastriert. Die kastrierten Ähren werden mit einer lichtdurchlässigen Pergamenttüte eingehüllt, um eine Bestäubung durch reife Weizenähren in der Nachbarschaft zu vermeiden. Zwei Tage nach der Kastration werden die Weizenblütchen mit frischem Zuckermaispollen bestäubt. Die bestäubten Ähren werden, um ein Austrocknen der Narbenfäden zu verhindern, wiederum mit Pergamenttüten eingehüllt. Durch die Befruchtung der Eizelle des Weizens mit Zuckermaispollen wird eine Zygote gebildet. Am nächsten Tag wird in den Halm der Weizenähre in das letzte obere Internodium mit einer Injektionsspritze eine Hormonlösung, bestehend aus Benzylaminopurin (20 mg/l) und Dicamba (100 mg/l), injiziert. Die Hormonlösung unterstützt die Entwicklung der Zygote zum Embryo. Während den ersten Zellteilungen der Zygote werden die Chromosomen des Zuckermais eliminiert und bei Zellneubildung enthalten die Zellen des sich entwickelnden Embryos nur noch die Chromosomen des Weizens und sind haploid. Aufgrund unvollständiger Entwicklung von Nährgewebe (Endosperm) kann der Embryo nicht mit Nährstoffen versorgt werden und würde nach einiger Zeit absterben. Wird der Embryo jedoch innerhalb einer Zeitspanne von 14 bis 16 Tagen nach der Bestäubung der Weizenblüte aus der Karyopse präpariert und auf Nährmedium kultiviert (in vitro-Kultur), regeneriert der Embryo zu einer haploiden Pflanze. Die regenerierten haploiden Pflanzen sind steril und werden, wie bei der Antherenkultur beschrieben, zur Verdoppelung des Chromosomensatzes einer Colchizinbehandlung unterzogen. Die mit der „Weizen x Mais“-Methode erzielten Regenerationsraten an haploiden Pflanzen pro Ähre liegen deutlich über den Regenerationsraten, die bei Weizen mit der Antherenkultur erhalten werden.



Abb. 9 : Regenerierende Embryonen

Zusammenfassung

Zur Erweiterung der genetischen Variabilität, eine Voraussetzung für Fortschritte in der Resistenz- und Qualitätszüchtung, werden die Antherenkultur, die Mikrosporenkultur und die Embryokultur an der LfL erfolgreich eingesetzt. In der Gersten- und Weizenzüchtung zeichnet sich ab, dass die Antherenkultur zur Erzeugung von haploiden bzw. doppelhaploiden Pflanzen, durch die Mikrosporenkultur (Gerste) und die Weizen x Mais-Methode abgelöst wird. Der erforderliche höhere Arbeitsaufwand bei der Mikrosporenkultur und der Weizen x Mais-Methode gegenüber der Antherenkultur wird durch die höhere Regenerationsraten pro Ähre ausgeglichen. Die Produktionskosten pro doppelhaploider Pflanze verringern sich durch den Einsatz der Mikrosporenkultur und Weizen x Mais-Methode.

2.2 Methoden zur Vermehrung und Erhaltung von Zuchtmaterial

Zur Vermehrung und Erhaltung stehen in der pflanzlichen Zell- und Gewebekultur die

- Meristemkultur
- die Sprossspitzen- und Nodienkultur
- die Schnelle Vermehrung und
- die *in vitro* – Langzeitlagerung

zur Verfügung.

2.2.1 Meristemkultur

Meristeme sind teilungsfähige Zellverbände in den Wachstumszonen der Sprosse, Wurzeln und Seitenknospen (Abb. 10). Mit einer Größe von nur wenigen Millimetern sind sie sehr klein und ihre Inkulturnahme erweist sich meist als sehr schwierig.

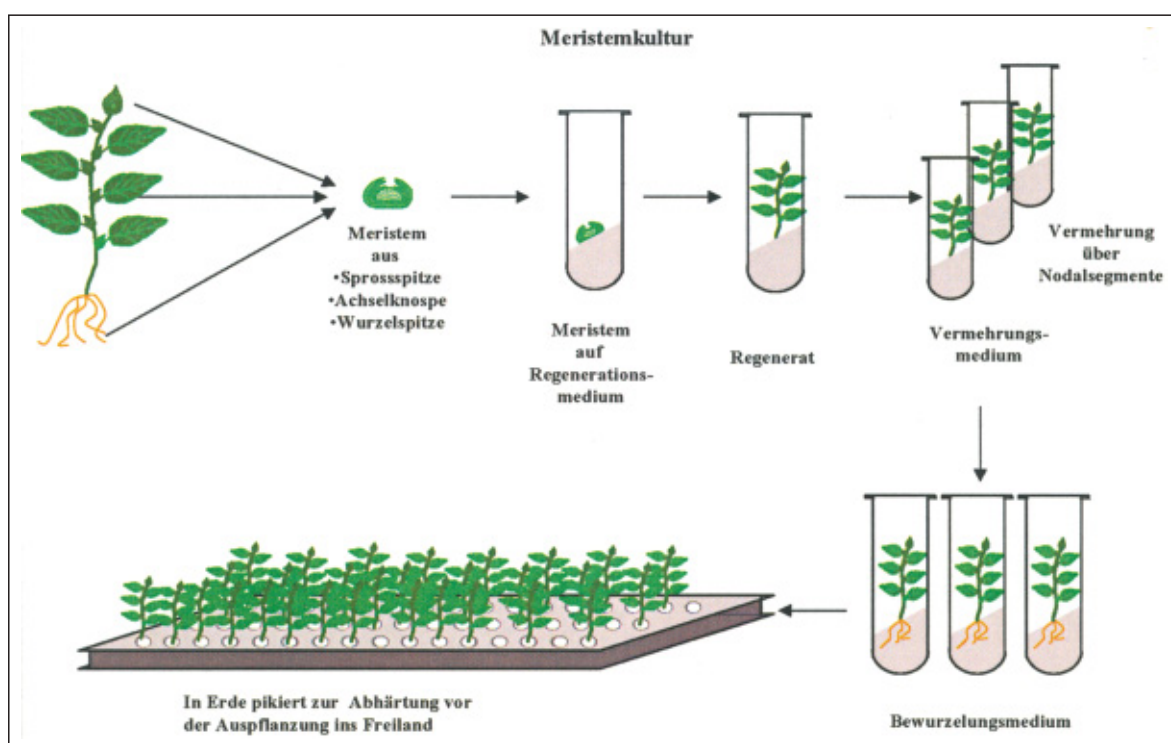


Abb. 10: Schema zur Meristemkultur

Aus den meristematischen Zellen können *in vitro* vollständige Pflanzen regenerieren. Am häufigsten werden Meristeme der Sprossspitze und der Achselknospen zur Pflanzenregeneration kultiviert. Ein großer Vorteil der Meristemkultur besteht darin, dass die meristematischen Zellen grundsätzlich frei von Viren und Bakterien sind und deshalb zur Sanierung von krankheitsbefallenen Pflanzen genutzt werden können. Zunächst werden die Sprosse mit Natriumhypochlorid (5 %-ig) für 5-10 Minuten oberflächensterilisiert und anschließend dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Im nächsten Schritt werden die Meristeme unter dem Binokular unter sterilen Bedingungen (Reinluft-Werkbank) aus den Sprossspitzen und Seitenknospen herauspräpariert und in Kulturröhrchen oder Petrischalen auf Nährmedium platziert. Zunächst wird in Dunkelheit bei 22 – 24°C im Brutschrank kultiviert. Nach ca. 2-3 Wochen werden die bereits differenzierten Gewebe auf frischem Nährmedium in größeren Kulturgefäßen bei 22-24°C unter Lichtbedingungen bis zur Regeneration von Pflanze weiter kultiviert.

Wird die Meristemkultur zur Sanierung von Krankheiten eingesetzt, können bereits die regenerierten Pflanzen auf Virus- und/oder Bakterienfreiheit getestet werden. Sind die Regenerate gesund kann über eine Nodalsegmentvermehrung eine große Anzahl identischer Pflanzen vermehrt werden. Im anderen Fall ist erneut eine Meristemkultur anzulegen. Gegebenenfalls kann dabei eine Wärmetherapie (35-38°C) der Spenderpflanze durchgeführt werden. Soweit erforderlich, werden die *in vitro*-Regenerate zur Bewurzelung auf ein Medium mit speziellen Phytohormnen überführt und nach erfolgter Bewurzelung in Erdkultur pikiert und im Gewächshaus abgehärtet, bevor sie ins Freiland ausgepflanzt werden.

2.2.2 Sprossspitzen- / Nodienkultur

Sprossspitzen- und Nodienkultur werden in erster Linie zur Vermehrung und Erhaltung von Zuchtmaterial eingesetzt. Ziel ist die identische vegetative Vermehrung von Pflanzen bei gleichzeitiger Erhaltung des Genotyps. Wie bereits bei der Meristemkultur angedeutet, können von den über die Meristemkultur regenerierten Pflanzen zur identischen Vermehrung Sprossspitzen- und Nodienkulturen angelegt werden.

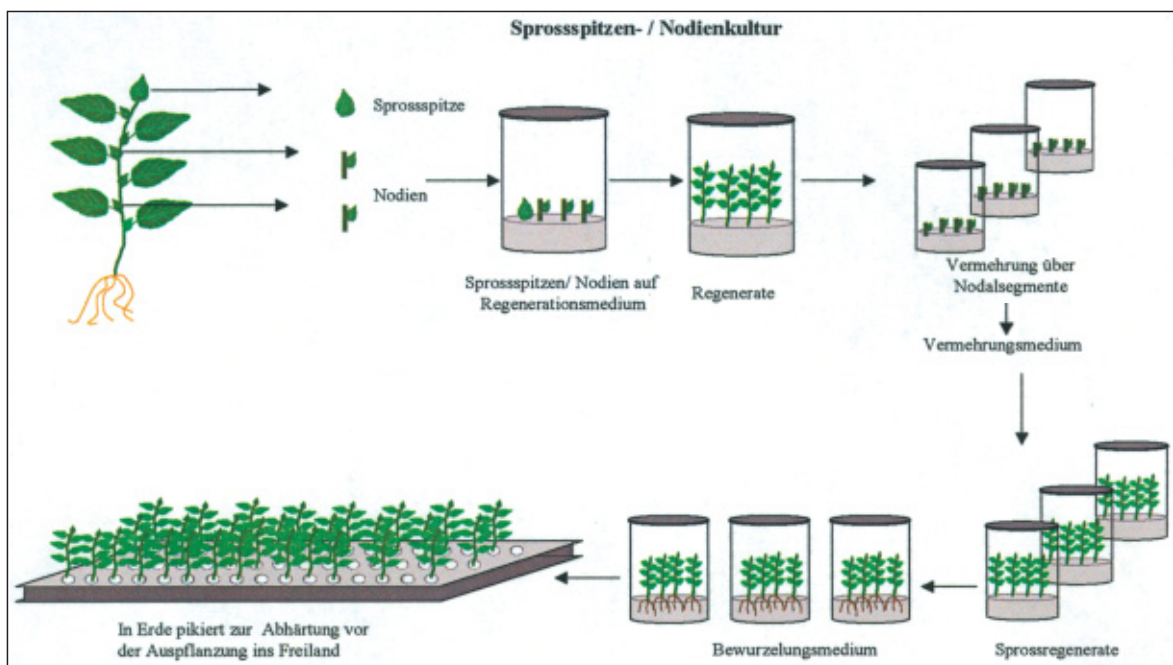


Abb. 11: Schema zur Sprossspitzen-/Nodienkultur

Für die Anlage von Sprossspitzen- und Nodienkulturen, ohne Vorschaltung der Meristemkultur, ist es zunächst erforderlich, die Oberfläche der Triebe der Spenderpflanzen zu desinfizieren. Die Triebe werden hierzu, je nach Alter und Pflanzenart, unter Reinluftbedingungen („Reinluft-Werkbank“) einer 5%-igen Natrium-Hypochloridlösung ausgesetzt und anschließend dreimal mit destilliertem Wasser gründlich gespült. Die Sprosse werden nachfolgend mit einem Skalpell in Sprossspitze und Sprossabschnitte mit Nodien (Gewebeanteile mit Seitenknospenanlagen, Nodalsegmente) zerteilt. Die Sprossabschnitte mit einer Größe zwischen 1–3 cm, und die Sprossspitzen werden auf Vermehrungsmedium in größeren Kulturschalen bei 20-22°C und 12-14 Stundentag kultiviert.

Aus dem Gewebe der Sprossspitzen und den Knospenanlagen regenerieren in einem Zeitraum von 4-5 Wochen Sprosse, die wiederum in Form von Nodalsegmenten weitervermehrt werden können. Sobald die gewünschte Anzahl an Regeneraten erreicht ist, werden die Re-

generate, soweit erforderlich, auf Bewurzelungsmedium kultiviert und nach erfolgter Wurzelbildung in Erdkultur überführt.

Eine besondere Form der Nodienkultur stellt die *in vitro*-Langzeitlagerung von Pflanzen dar. Nach der Regeneration von Sprossen und deren Vermehrung können Sprosskulturen unter Schwachlichtbedingungen und niedrigen Temperaturen (8-10°C) *in vitro* über längere Zeiträume (4-10 Monate) platzsparend und ohne Witterungseinflüsse kultiviert werden. Nach 4-10 Monaten werden die Pflanzen *in vitro* vermehrt und auf frisches Nährmedium überführt. Dieses Verfahren wird in der Erhaltungszüchtung von Zuchtmaterial eingesetzt. An der LfL werden Klone von Arnika-Elitepflanzen bereits 14 Jahre in der Langzeitlagerung erhalten.

Zusammenfassung

Die Meristemkultur nimmt als Ausgangspunkt in der vegetativen *in vitro*-Vermehrung wertvollen Pflanzenmaterials und als Methode zur Sanierung virus- oder bakterienbefallener Pflanzen in der Erhaltungszüchtung einen wichtigen Platz ein.

Die Sprossspitzen- und Nodienkultur als Verfahren zur *in vitro*-Vermehrung von Pflanzen in großer Stückzahl hat sowohl im Vorfeld von Züchtungsprogrammen (Pflanzenmaterial für Polycross-Anlagen) als auch in der Erhaltungszüchtung ihren Platz.

Die *in vitro*-Langzeitlagerung, eine Form der Nodienkultur, ermöglicht es, wertvolle Elitepflanzen ohne Witterungseinflüsse bei geringem Platzbedarf über einen längeren Zeitraum ohne genetische Veränderung zu erhalten und bei Bedarf für Züchtungszwecke zur Verfügung zu stellen.



Abb. 12: *In vitro*-Langzeitlagerung von *Arnica montana*

3 Züchtungsfortschritt durch Zell- und Gewebekultur

3.1 Sortenzüchtung

Die Entwicklung einer neuen Gersten- oder Weizensorte, ausgehend von der Ausgangskreuzung bis zur Sortenzulassung durch das Bundessortenamt, ist sehr langwierig. In der Regel vergehen 12 – 15 Jahre bis das Produkt der Kreuzung als Sorte dem Landwirt zum Anbau

zur Verfügung steht. In Abb. 13 wird der konventionelle Zuchtgang und der Zuchtgang unter Einbeziehung der Haploidentechniken gegenübergestellt.

Haploidentechnik		Konventioneller Zuchtgang	
		Homozygotiegrad	
1. Jahr	Kreuzung	1. Jahr	F_0 Kreuzung
2. Jahr	Über Antherenkultur oder Weizen x Mais-Methode werden innerhalb eines Jahres homozygote, doppelhaploide Pflanzen erzeugt.	2. Jahr	0 F_1 alle Pflanzen gleich
		3. Jahr	50 F_2 Spaltungsgeneration
		4. Jahr	75 F_3 Nachkommen selektierter Einzelpflanzen
3. Jahr	ca. 100 – 150 DH-Linien: Reihensaat mit 1. Selektion	5. Jahr	87,5 F_4 4 –6 Nachkommen pro Kreuzung
4. Jahr	Anbau in Parzellen mit 1. Ertragsprüfung	6. Jahr	93,7 F_5 1. Ertragsprüfung in Parzellen
5. Jahr	Mehrortiger Anbau in Parzellen mit Ertrags-, Qualitäts-, und Resistenzprüfung	7. Jahr	96,8 F_6 Mehrortiger Anbau in Parzellen
6. Jahr	Mehrortiger Anbau in Parzellen mit Ertrags-, Qualitäts-, und Resistenzprüfung	8.-9. Jahr	98,4 F_7 Ertrags-, Qualitäts- und Resistenzprüfung ähnlich F_6
			99,2 F_8
7.-9. Jahr	Wertprüfung durch Bundessortenamt Sortenschutz und Zulassung Sorte vertriebsfähig	10.-12. Jahr	99,6 F_9 Wertprüfung durch Bundessortenamt Sortenschutz und Zulassung
			99,8 F_{10} Sorte vertriebsfähig
10.-12. Jahr	Prüfung in Landessortenversuchen auf regionale Anbauwürdigkeit	13.-15. Jahr	99,9 F_{11} Prüfung in Landessortenversuchen auf regionale Anbauwürdigkeit

Abb. 13: Vergleich „konventionelle Züchtung“ und Züchtung unter Einbeziehung der Haploidentechniken.

Durch den Einsatz der Antherenkultur und der Weizen x Mais-Methode kann die Entwicklung einer Sorte um zwei bis drei Jahre verkürzt werden. Im konventionellen Zuchtgang verzögert die mangelnde Ausgeglichenheit in den Nachkommenschaften, bedingt durch die fehlende 100%-ige Homozygotie, den Zeitraum bis zur Wertprüfung und Sortenzulassung. Eingebunden in die klassische Züchtung leisten die Antherenkultur und die Weizen x Mais-Methode einen wichtigen Beitrag zur schnelleren Entwicklung von resistenten, qualitativ hochwertigen und ertragreichen Sorten. Über Kooperationen zwischen dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung und mittelständischen bayerischen Züchtern finden die Ergebnisse aus Forschung und Entwicklung auf kürzestem Weg Eingang in die Praxis.

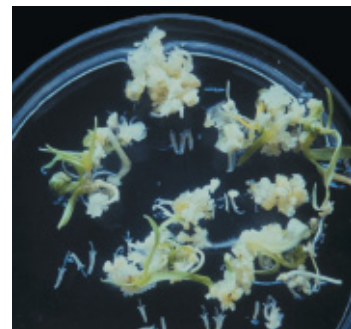


Abb. 14: Induktion Antherenkultur

3.2 In *vitro*-Vermehrung und in *vitro*-Erhaltung von Pflanzen im Rahmen von Zuchtprogrammen

Die *in vitro*-Vermehrung und *in vitro*-Erhaltung von Pflanzen werden in der Züchtung bei Fremdbefruchtern zur Erzeugung von Klonpflanzen eingesetzt. Beispielhaft wird ihr Einsatz in der Züchtung von *Arnica montana* erläutert.

Die Blüten von *Arnica montana* werden für die Herstellung von über 200 Arzneispezialitäten verwendet. Im Hinblick auf die strengen Qualitätsvorschriften der Pharmaindustrie entspricht die Qualität der Rohware aus Wildsammlungen oft nicht den Anforderungen. Daher bestand seitens der Pharmafirmen der Wunsch Rohware aus gezieltem Anbau zu erhalten. Die LfL (Arbeitsgruppe Heil- und Gewürzpflanzen, Prof. Dr. U. Bomme) begann daher 1984 Saatgut verschiedener Herkünfte im Feldanbau auf ihre Anbaueignung und die Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe zu prüfen. Von geeigneten Herkünften wurden einzelne Elitepflanzen (Genotypen) selektiert und *in vitro* über Meristemkultur und Sprossspitzenkultur etabliert und in einem weiteren Schritt zu Pflanzen regeneriert. Anschließend wurden die *in vitro*-Pflanzen unter aseptischen Bedingungen in größerer Stückzahl vermehrt. Die so erhaltenen Klone (durch vegetative Vermehrung erhaltene erbgleiche Pflanzen) der verschiedenen Elitepflanzen wurden in Leistungsprüfungen weiter geprüft. Im Folgenden wurden die besten Klone in einer Polycross-Anlage frei abblühend kombiniert und die Samen der einzelnen Pflanzen getrennt geerntet und im Folgejahr isoliert angebaut und zu Linien entwickelt. Die einzelnen Linien wurden im Hinblick auf Anbauwürdigkeit und Inhaltsstoffzusammensetzung selektiert. Eine dieser Linien wurde von der Bayerischen Pflanzenzuchtgesellschaft beim Bundessortenamt zur Sortenzulassung angemeldet und weltweit als erste Arnikasorte mit dem Namen ‚Arbo‘ 1998 zugelassen. Ohne Einbeziehung der *in vitro*-Techniken zur Schaffung des Klonmaterials hätte sich die Sortenentwicklung bei dem Fremdbefruchter *Arnica montana* um einige Jahre verlängert. Die wertvollsten Arnika-Klone werden seit 1991 in der *in vitro*-Langzeitlagerung erhalten.



Abb. 15: Steriler Arbeitsplatz



Abb. 16: Arnikapflanzen aus *in vitro* in Erde überführt