



Abschlussbericht des Forschungsvorhabens:

Entwicklung und Etablierung einer neuen Technik für die Produktion von doppelhaploiden Winterweizen-Zuchtstämmen zur Verbesserung der Konkurrenzfähigkeit bayerischer Saatzuchtunternehmen



Projektbericht

Projektförderung: Bayerisches Staatsministerium für Ernährung,
Landwirtschaft und Forsten
Förderkennzeichen: A/17/06
Geschäftszeichen: G2-7336-1/21.I
Projektlaufzeit: 01.01.2017 - 31.12.2019
Projektleiter: Dr. Martin Müller
Projektbearbeiter: Dipl.-Ing. Bärbel Eisenmann, Dr. Rebecca Seidenberger, Lisa Woyke, Arbeitsgruppe Gewebekulturtechniken, LfL-Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung (IPZ 1a)
Berichterstatter: Bärbel Eisenmann und Dr. Martin Müller
Herausgegeben im: April 2020

Veröffentlichung der Ergebnisse – auch in Auszügen – nur mit Genehmigung der Autoren gestattet!

Abschlussbericht des Forschungsvorhabens:

Entwicklung und Etablierung einer neuen Technik für die Produktion von doppelhaploiden Winterweizen-Zuchtstämmen zur Verbesserung der Konkurrenzfähigkeit bayerischer Saatzuchtunternehmen

Inhalt	Seite
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Verzeichnis der Bildautoren	7
Verzeichnis der Abkürzungen	7
1 Problemstellung, Zielsetzung und Vorgehensweise	8
2 Antherenkultur – Methodische Herangehensweise.....	10
2.1 Vorversuche mit Modellsorten	10
2.1.1 Auswahl der Modellsorten, Anzucht und Antherenkultur	10
2.1.2 Charakterisierung der Modellsorte Svilena	14
2.1.2.1 Bildung embryonaler Strukturen	14
2.1.2.2 Regenerationsraten - Grüne Pflanzen und Albinos	16
2.1.2.3 Spontane Aufdopplungsraten der regenerierten grünen Pflanzen	18
2.1.3 Erkenntnisse aus den Modellsorten-Versuchen.....	18
3. Screening des bayerischen Winterweizen-Genpools auf Antherenkultur-Tauglichkeit.....	21
3.1 Quellen des Winterweizen-Saatguts	21
3.2 1. Anbauphase (12/2018-05/2019), 2. Anbauphase (06/2019-10/2019) und Freilandversuch im Vergleich	21
3.3 Ökonomisch relevante Antherenkultur-Ergebnisse der Sorten und Zuchtlinien.....	25
4 Schlussfolgerungen und Ausblick	28
5 Zusammenfassung	29
6 Summary	30
7 Danksagung	31
8 Literaturverzeichnis	32
9 Anhang: Tabellen A – D.....	34

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Spenderähre $\frac{1}{3}$ aus Hüllblatt gewachsen (Eisenmann).....	11
Abb.2: Mikrosporenstadium unter dem Mikroskop (Eisenmann)	11
Abb.3: Mikroskop-Aufnahme der Mikrosporen in unterschiedlichen Positionen (Eisenmann).....	12
Abb.4: Grüne Pflanze und Albino in Regenerationsmedium 1 (Seidenberger)	13
Abb.5: Umsetzen der grünen Pflanzen von Regeneration 1 in Regeneration 2 (Eisenmann)	13
Abb.6: Vitale und non-vitale embryonale Strukturen an einer Anthere (Eisenmann).....	14
Abb.7: Entwicklung der embryonalen Strukturen im Flüssig-Induktionsmedium im Zeitraum von 6 Wochen (Eisenmann).....	15
Abb.8: Regenerierte grüne Pflanzen und Albinos je 100 aufgelegte Antheren der Sorte Svilena je Kalenderwoche der Jahre 2018/2019.....	17
Abb.9: Messaufbau Flowcytometer (Eisenmann).....	18
Abb.10:Einfluss verschiedener Prolinkonzentrationen auf die Regenerationsraten der Modellsorten Svilena, Florida und Pamier in Antherenkultur.....	19
Abb.11:Einfluss verschiedener Prolinkonzentrationen auf das Ploidiestadium der Modellsorten Svilena, Florida und Pamier in der Antherenkultur.....	20
Abb.12:Sortenanbau Freilandversuch 2019 (Eisenmann).....	22
Abb.13:Anzahl Regenerate je 100 Antheren ausgewählter Genotypen des 1. und 2. Gewächshaus-Anbaus im Vergleich.....	24
Abb.14:Anzahl Regenerate je 100 Antheren ausgewählter Genotypen aus dem Freiland-Anbau 2019.....	24
Abb.15:Sorten und Zuchtlinien aus dem 2. Gewächshaus-Anbau, die wirtschaftlich interessante Regenerationsraten bei der Antherenkultur erbracht habe.....	27
Abb.16:Ausgewählte Sorten aus dem 2. Gewächshaus-Anbau, die wirtschaftlich interessante Regenerationsraten bei der Antherenkultur erbracht haben.....	27

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1a:	Svilena (Modellpflanze in Vorversuchen, V3 und Kontrollpflanze bei Gewächshaus- und Freilandversuchen)- Embryoinduktion und Regeneration - Gebildete ES (Embryonale Strukturen), grüne- und Albino- Regenerate, sowie Regenerationsraten in Prozent bezogen auf ES und 100 Antheren.....	16
Tabelle 1b:	Embryoinduktion und Regeneration - Gebildete ES (Embryonale Strukturen), grüne- und Albino- Regenerate, sowie Regenerationsraten in Prozent bezogen auf ES und 100 Antheren.....	17
Tabelle 2:	Ergebnisse der Prolin-Versuche mit den Modellsorten Svilena, Florida und Pamier (verschiedenen Prolin-Konzentrationen im Induktionsmedium).....	19
Tabelle 3:	Ausgewählte Genotypen-Ergebnisse des 1. Gewächshaus-Anbaus	23
Tabelle 4:	Ausgewählte Genotypen-Ergebnisse des 2. Gewächshaus-Anbaus	23
Tabelle 5:	Ausgewählte Genotypen-Ergebnisse des Freilandversuches 2019	23
Tabelle 6:	Ergebnisse von 31 Sorten und Zuchtlinien mit ökonomischer Relevanz aus dem 2. Gewächshaus-Anbau (WS Hahn-Sorten aus Freilandanbau; Purino aus 1. GWH-Anbau)....	26
Tabelle A:	Ergebnisse der Sorten und Züchtungslinien des 1. Gewächshaus-Anbaus	34
Tabelle B:	Ergebnisse der Sorten und Züchtungslinien des 2. Gewächshaus-Anbaus.....	36
Tabelle C:	Ergebnisse des Freilandversuches 2019.....	38
Tabelle D:	Medienzusammensetzung für Induktion und Regeneration.....	40

Verzeichnis der Bildautoren

Bärbel Eisenmann (LfL): 1, 2, 3, 5, 6, 7, 11

Rebecca Seidenberger (LfL): 4

Verzeichnis der Abkürzungen

DH	Doppelhaploid
ES	Embryonale Struktur
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GWH	Gewächshaus
KW	Kalenderwoche
MW	Mittelwert
n	Anzahl Versuche
Nr.	Nummer
s	Standardabweichung
WP	Wertprüfung
WW	Winterweizen

1 Problemstellung, Zielsetzung und Vorgehensweise

Weizen gehört seit Jahrtausenden zu den wichtigsten Nutzpflanzen des Menschen. Nach Mais ist es das am meisten angebaute Getreide der Welt. Bereits tausende Jahre vor Christus wurden mit der sesshaften Ansiedlung von Menschen ertragreichere Ähren selektiert und weiter vermehrt. Heute existiert eine Vielzahl an Saatzuchtbetrieben, die neue Sorten entwickeln, die den aktuellen Anforderungen entsprechen. Dabei geht es um Widerstandsfähigkeit gegenüber den Folgen des Klimawandels, wie steigende Trockenheit und Hitzestress, oder um die Bekämpfung von Krankheiten (Befall von Viren, Bakterien, Nematoden, Pilzen, Insekten, Spinnen, etc.). In Deutschland sind 2019 „mit Voraussetzung des landeskulturellen Wertes“ 150 Sorten von Winterweichweizen zugelassen gewesen (*BUNDESSORTENAMT 2019*). Wichtigstes aktuelles Zuchtziel ist, neben dem Ertrag, eine hohe Toleranz bzw. Resistenz gegenüber abiotischem und biotischem Stress mit akzeptablen Endverbraucherqualitäten.

In der konventionellen Getreide-Züchtung hat sich neben der reinen Pedigree-Züchtung in den letzten Jahren die Züchtung mit doppelhaploiden Pflanzen zunehmend etabliert. Als doppelhaploide Pflanzen bezeichnet man zu hundert Prozent reinerbige (homozygote) Pflanzen, bei denen alle väterlichen und mütterlichen Gene identisch sind. Solche Pflanzen lassen sich im Labor ausschließlich aus den entweder männlichen oder weiblichen haploiden Keimzellen (Pollenvorläuferzellen/Mikrosporen, Eizellen) regenerieren. Der normale, bei allen höheren Organismen herrschende diploide Zellkern-Zustand, wird durch identische Verdopplung des Genoms erreicht. Entweder geschieht dies spontan oder etwa durch Applikation des Mitosegiftes Colchizin.

In der traditionellen Züchtung dauert es durchschnittlich sechs Generationen, bis eine ausreichend homozygote Population erhalten ist, mit der Screenings und Vorprüfungsversuche gemacht werden können (*TADESSE et al. 2013*). Die Doppelhaploiden-Methoden ermöglichen die Produktion von homozygoten Pflanzen in einer Generation. Schon 1922 hat ein Forscherteam von der Carnegie Institution of Washington (heutiger Name: Carnegie Institution for Science) von spontan gebildeten, haploiden Stechapfel-Pflanzen berichtet (*BLAKESLEE et al. 1922*). Weizen folgte vier Jahre später (*GAINS et al. 1926*). In den 60iger Jahren wurden die ersten Protokolle zur Entwicklung haploider Pflanzen im Labor über Antherenkultur veröffentlicht (*GUHA et al. 1964*). Die erste mittels Doppelhaploiden-Technik gezüchtete Getreidesorte, eine Gerste, kam 1980 auf den Markt (*HO et al. 1980*). Seit dieser Zeit werden drei verschiedene Ansätze der Doppelhaploiden-Produktion über *in vitro* Kulturen verfolgt, die Weizen x Mais-Methode, die Antherenkultur und die Mikrosporenkultur.

Bei der Weizen x Mais-Methode (interspezifische Kreuzung) werden die Ährchen einer Weizenähre, bevor eine Selbstbestäubung und Befruchtung eintritt, kastriert. Anschließend werden die Narben der weiblichen Blüten mit Maispollen bestäubt, es folgen die Befruchtung und erste Teilungen der Eizelle, die zu einer sofortigen und vollständigen Eliminierung der Maischromosomen führen. Die einsetzende Embryonalentwicklung wird dadurch nicht unterbrochen, es resultiert ein haploider Embryo, der sich über das Embryo-Rescue-Verfahren zu einem haploiden Keimling entwickelt. Die Pflanzen werden im 4–5 Blattstadium colchiziniert, d. h. chromosomal aufgedoppelt. Diese Methode wird im Institut für Pflanzenbau seit 2003 im Routinebetrieb angewandt.

Bei der Methode der Antherenkultur werden in einem unreifen Ährenstadium die Antheren/Staubbeutel mit den Mikrosporen entnommen und auf einem Embryo-Induktionsmedium kultiviert. Natürlicherweise entwickelt sich die haploide Mikrospore über mehrere Zellteilungen zum Pollen. Dieser Entwicklungsweg muss unterbrochen und in Richtung sekundäre Embryogenese gelenkt werden, wenn aus einer haploiden Mikrospore eine Pflanze regeneriert werden soll. Durch Einwirken von Stressfaktoren, wie z. B. Hitze oder Kälte kann die Mikrospore reprogrammiert werden und nun eine embryonale Entwicklung durchlaufen. Es bilden sich embryonale Strukturen, die zu Pflanzen kultiviert werden können. Hierbei werden sowohl haploide, als auch über Spontanaufdopplung, doppelhaploide Genome erzeugt. Diese Methode wird bisher nur begrenzt kommerziell genutzt.

Die Mikrosporenkultur ist von allen Haploidie-Methoden die effektivste. Hierbei wird nicht mit einzelnen Antheren gearbeitet, vielmehr werden die Mikrosporen mehrerer Ähren isoliert und auf ein Festmedium plattiert. Die Isolation der Mikrosporen beginnt mit der Freisetzung der Keimzellen aus Stress-induzierten Ähren in einem Homogenisiersystem und anschließender Filtration. Nach mehreren Zentrifugationsschritten werden vitale Mikrosporen über eine abschließende Gradientenzentrifugation von toten Zellen getrennt, auf einem Embryo-Induktionsmedium im Dunkeln kultiviert und nach einigen Wochen im Licht zur grünen Pflanze regeneriert. An der LfL wird diese Methode bisher ausschließlich bei Sommer- und Wintergerste eingesetzt.

Ziel dieses Forschungsprojektes war es, neben der Weizen x Mais-Methode eine zweite Haploidie-Methode für Winterweichweizen (*Triticum aestivum*, L.) zu etablieren. Hauptaugenmerk wurde auf die Antherenkultur gelegt. Anhand dreier Modellsorten sollte zunächst die Methode erarbeitet werden, um sie anschließend an möglichst vielen Sorten und Züchtungslinien aus dem bayerischen Genpool zu testen. Die Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising arbeitete mit verschiedenen Saatzuchtunternehmen zusammen (Saatzucht Bauer GmbH & Co. KG/ Obertraubling, Saatzucht Josef Breun GmbH & Co. KG/ Herzogenaurach, Secobra Saatzucht GmbH/ Feldkirchen und Saatzucht Streng GmbH & Co. KG/ Uffenheim), die Saatgut für dieses Projekt zur Verfügung stellten.

In zwei Gewächshaus-Anbauperioden 2018 und 2019 wurden 185 Genotypen inklusive der Modellsorten auf Antheren-Kulturtauglichkeit getestet. Das Saatgut setzte sich aus 60 registrierten Sorten und 125 Züchtungslinien (F1-Kreuzungen und Wertprüfungsstämme) zusammen. In einem zusätzlichen Freilandversuch 2019 wurden 27 Sorten und 3 Stämme aus den Gewächshausversuchen erneut angebaut, dazu kamen weitere 34 Sorten und 7 Stämme. Insgesamt wurden somit 226 Genotypen, davon 94 Sorten, untersucht.

2 Antherenkultur – Methodische Herangehensweise

2.1 Vorversuche mit Modellsorten

2.1.1 Auswahl der Modellsorten, Anzucht und Antherenkultur

Die Auswahl der Modellsorten erfolgte unter dem Aspekt, Sorten mit möglichst unterschiedlicher androgenetischer Gewebekulturtauglichkeit zu untersuchen. Die Winterweizensorte Svilena ist bekannt für ihre überdurchschnittlich gute Antherenkultur-Tauglichkeit (*LANTOS et al. 2013*). Bei der Sorte Florida (zugelassen am 07.08.1985; Saatzucht H. Schweiger/ Moosburg) wurden bereits Vorversuche am Institut durchgeführt, so dass die Antherenkultur-Tauglichkeit als befriedigend bis gut vorausgesetzt werden konnte. Die Sorte Pamier (zugelassen am 04.04.2008; Saatzucht Syngenta/ Bad Salzflun) ist eine neuere Winterweizensorte, von der noch keine Daten vorhanden waren.

Die Spenderpflanzen wurden bei 20°C in Multitopfplatten (Pikiererde Fruhstorfer-P) angekeimt und nach 8-10 Tagen bei 4°C für 8 Wochen vernalisiert (14 Std./ Tag Licht: Leuchtstoffröhren Osram L58 W20 hell weiß, 4 Leuchtstoffröhren pro m²). Zur weiteren Anzucht wurden die Pflanzen in 14er Töpfe umgesetzt und bei 8°C für 4-6 Wochen mit 14 Std./ Tag Licht (Halogen Metalldampfampe 400 Watt, 1 Lampe pro m²) kultiviert. Danach wurde für weitere 4-6 Wochen die Temperatur auf 16°C erhöht. Die darauf folgende weitere Anzucht erfolgte im Gewächshaus bei 20-22°C bei 16 Std. Licht pro Tag. Wenn das Außenlicht unter 55 kLux sankt, schaltete sich das Zusatzlicht ein (Halogen Metalldampfampe 250 Watt; 1 Stück pro m² + Hochdrucknatriumdampfampen Son-T; 2 Stück pro 5,5m²). Gedüngt wurde direkt nach der Vernalisierung mit Blaukorn (NPK-Mg+S, 12-12-17-2+8), das anschließend über das Gießwasser zugesetzt wurde (1‰ Kamasol Blau, NPK 8-8-6, Compo GmbH, Postfach 2107, 48008 Münster). Im Gewächshaus erfolgte die Düngung ebenfalls mit Blaukorn. Gegen Mehltau wurde Schwefel (Netzschwefler, nachts) eingesetzt, gegen Blattläuse bei Bedarf gespritzt (Pirimor Granulat, Firma Syngenta), sowie Nützlinge (Florfliegen (*Chrysoperla carnea*), Schlupfwespen (*Aphidius colemani*) und Raubmilben (*Phytoseiulus persimilis*), Firma Sautter&Stepper GmbH) ausgebracht. Die Dauer vom Einsetzen des Saatguts bis zur Ernte betrug durchschnittlich 23 Wochen.



Abb.1: Spenderähre $\frac{1}{3}$ aus Hüllblatt gewachsen

Für die Antherenkultur wurden Spenderähren von einer Donorpflanze entnommen (geschnitten), wenn etwa $\frac{1}{3}$ der Ähre aus dem Hüllblatt herausgewachsen war (siehe *Abb.1*). Der optimale Zeitpunkt zum Start der Antherenkultur, konnte mikroskopisch mit Orcein (essigsaurer Lösung aus Flechten der Gattung Rocella) als Färbemittel für Chromosomen und Chromatiden bestimmt werden. Als optimales Kernstadium der Mikrospore erwies sich das „4-5 Uhr“-Stadium (*Abb. 2*) (Mikroskop: Axio Lab A.1. Zeiss, 5 Okular und 16-er/ Objektiv 20). *LANTOS et al. 2013* beschreiben das „4-6 Uhr“- Stadium = frühes bis mittleres Einkernstadium als guten Zeitpunkt zur Antheren-Entnahme (siehe *Abb.2*).

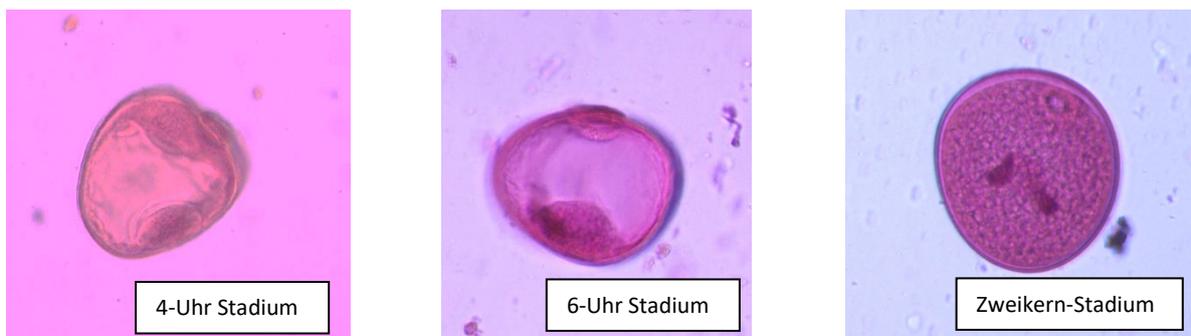


Abb.2: Mikrosporenstadium unter dem Mikroskop

In der Mikroskop Aufnahme in *Abb.3* sieht man, dass die Mikrosporen nicht immer optimal zur Bestimmung liegen. Auch sind die Reifezustände der Mikrosporen in einer Anthere nicht alle gleich. Ziel ist es, dass der Großteil der Mikrosporen das 4-5-Uhr-Stadium aufweist.

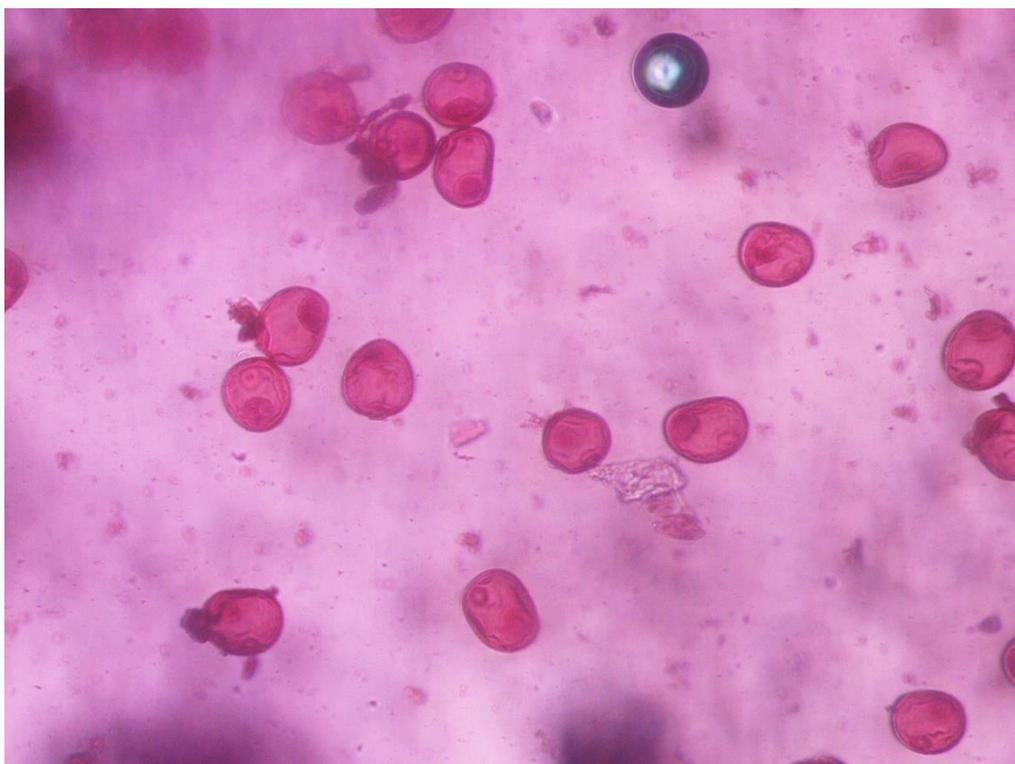


Abb.3: Mikroskop Aufnahme der Mikrosporen in unterschiedlichen Positionen (100-fache Vergrößerung)

Vorbereitend zum sterilen Auflegen der Antheren wurde die Ähre aus dem Hüllblatt entnommen und 15 min in einer 4%-igen Natrium-Hypochlorit Lösung (NaClO) mit Tween 80 sterilisiert. Als Induktionsmedium wurde 4 ml Ficoll-basiertes Flüssigmedium gemäß *OTANI und SHIMADA (1995)* verwendet. Es wurden Arabinogalactan-Proteine (AGPs) zugefügt, die wichtige Moleküle in verschiedenen Schritten des Reproduktionsprozesses in Pflanzen sind (*PEREIRA et al. 2015*), sowie die Aminosäure L-Prolin, die eine besondere Funktion in der Osmose Toleranz und Gestaltbildung als ein Hauptbestandteil des Zellwandstrukturproteins hat (*POLA et al. 2007; CHOWDHRY et al. 1993*). Das modifizierte Protokoll für das Induktionsmedium ist im Anhang aufgelistet. Je Induktionsgefäß (35x39 mm Runddosen, NeoLab Migge GmbH, Heidelberg bzw. Sarstedt AG & Co KG, Nürnbrecht) wurden aus 14 Ährchen je 3 Antheren = 42 Antheren aufgelegt. Dazu wurden 3-4 unreife Ovarien gegeben, um eine natürliche Umgebung für die Embryonen zu erzeugen und somit die Bildung von embryonalen Strukturen (ES) positiv zu beeinflussen (*LANTOS et al. 2016*) - die lebenden, unreifen Ovarien produzieren weibliche „Ammen“-Substanzen, (*LIU et al. 2002*). Die Gefäße wurden luftdicht mit Parafilm verschlossen (Firma Bemis, PM-996).

Die sekundäre Embryogenese der Mikrospore ist eines der eindrucksvollsten Beispiele der Zelltotipotenz. Sie kann durch verschiedene Stresseffektoren induziert werden. In den Versuchen wurden die Antheren 3 Tage einem Hitzestress ausgesetzt (Dunkelinkubation bei 32°C). Anschließend wurden sie für 6 Wochen im Klimaschrank bei 26°C weiterhin ohne Licht in-

kubiert. Kontrolle und Umsetzen der gebildeten ES fanden jeweils nach 4, 5 und 6 Wochen mit Hilfe eines Binokulars (Zeiss Stemi 2000-C) statt. Gebildete embryonale Strukturen wurden auf ein festes Regenerationsmedium 1 (Protokoll siehe Anhang, Petrischale 60x15 mm, Firma Greiner bio-one) mittels steriler Pinzetten umgesetzt. Nach 6 Wochen wurden einheitlich keine weiteren ES mehr umgesetzt. Die ES wurden für weitere 2 Wochen auf dem Regenerationsmedium 1 bei 26°C ohne Licht inkubiert, bevor sie in einen Licht-Klimaschrank (Firma polyklima GmbH, Modell M4Z-WLED; 20°C, 14 h Licht) überführt wurden, in dem die Chlorophyllbiosynthese einsetzte. Je nach Genotyp unterbleibt die Chlorophyllbildung bei einer variierenden Zahl an Regeneraten. Dieser Albinismus tritt auf, wenn die plastidäre DNA der Mikrosporen in einem frühen Stadium der Entwicklung beschädigt wird (ASAKAVIČIŪTĒ *et al.* 2005). Neben dem Genotyp beeinflusst auch die Vorbehandlung der Antheren und die Kulturbedingungen das Verhältnis von Albinos zu grünen Pflanzen (LANTOS *et al.* 2013; ASAKAVIČIŪTĒ *et al.* 2005).



Abb.4: Grüne Pflanze und Albino in Regenerationsmedium 1

Nach 2 Wochen im Lichtschrank wurden die grünen Pflanzen auf ein weiteres Regenerationsmedium (Regenerationsmedium 2) gesetzt (siehe Anhang; Becher 108x82 mm, 350 g Firma Wächter) und konnten sich ca. 2 weitere Wochen im Klimaschrank entwickeln.



Abb.5: Umsetzen der grünen Pflanzen von Regeneration 1 in Regeneration 2

Danach erfolgte entweder das Pikieren in eine Multitopfplatte (Substrat: Fruhstorfer Erde Typ P, Floraton 3) oder es wurde direkt die flowcytometrische Messung zur Bestimmung des Haploidiestadiums angeschlossen. Haploide Pflanzen sind steril, da die Fertilität auf der meiotischen Reduktion der diploiden Chromosomenzahl beruht (TADESSE *et al.* 2013). An anderen Forschungseinrichtungen wurden Experimente durchgeführt, durch Zusatzstoffe die Genotyp-abhängige stark variierende spontane Aufdopplung zu verbessern (HANSEN *et al.* 1998). Dieser Ansatz wurde hier nicht verfolgt. Bei weiterer Kultivierung im Gewächshaus wurden die Multitopfplatten zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit die ersten zwei Wochen abgedeckt (>80% Luftfeuchte). Nach weiteren drei Wochen ohne Abdeckung konnten die Pflanzen flowcytometrisch gemessen werden.

2.1.2 Charakterisierung der Modellsorte Svilena

Die Winterweizensorte Svilena weist aufgrund ihrer optimalen Antherenkultur-Tauglichkeit auch die höchste Mikrosporen-Regenerationsrate auf. In diesem Projekt diente Svilena zunächst als Modellsorte für die Vorversuche V1 – V3, siehe *Tab. 2*, zur Etablierung eines Antherenkultur-Protokolls - dafür wurden 254 Ähren bearbeitet. In allen weiterführenden Versuchen (227 bearbeitete Ähren, *Tab 1a*) wurde Svilena als ständig mitlaufende Kontrolle eingesetzt, um eventuelle Unregelmäßigkeiten beim Vegetationsverlauf der Versuchspflanzen aufzudecken.

2.1.2.1 Bildung embryonaler Strukturen

Bei den getesteten Winterweizenpflanzen zeigten fast alle entnommenen Antheren die Fähigkeit, in einem Induktionsmedium embryonale Strukturen (ES) zu entwickeln. Der große Unterschied lag in der Anzahl gebildeter ES und in ihrer Weiterentwicklung zu Pflanzen (Regeneration/Organdifferenzierung). Eine optimale Induktion ist gegeben, wenn die Farbe der gebildeten ES weißlich-perlmutterfarben und mit klaren Konturen ist.

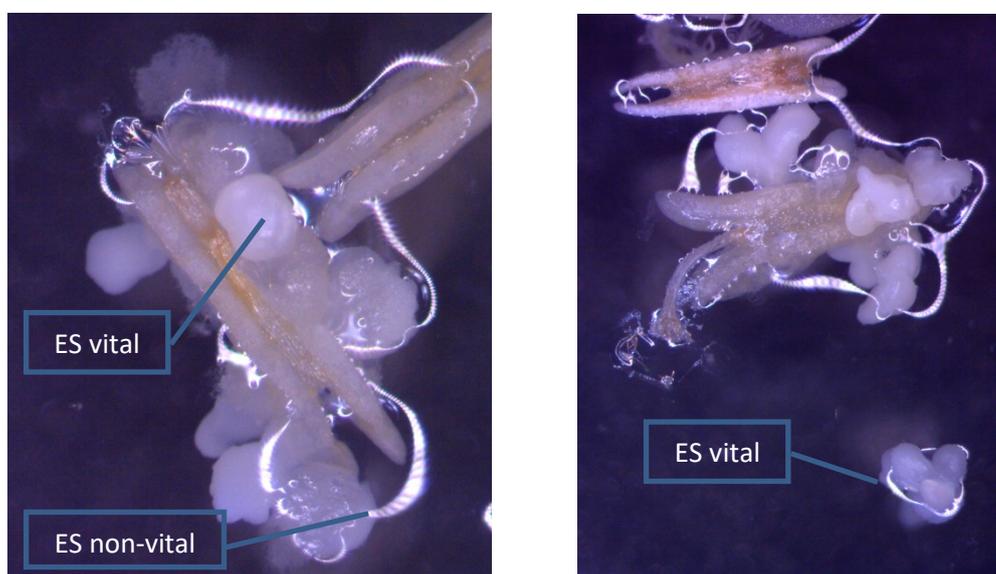


Abb.6: Vitale und non-vitale embryonale Strukturen an einer Anthere

Die ES sollen sich selbständig von der Anthere ablösen und gut auf dem Ficoll-basierten Induktionsmedium schwimmen. ES, die sich nicht weiter entwickeln, zeigen eine schwammige Kontur und sinken nach dem Ablösen von der Anthere ab (siehe *Abb.6*). Auch die Dauer der Produktion bzw. Vitalität der ES ist sehr unterschiedlich. Einige Weizensorten bilden nur innerhalb weniger Tage ES, die schon nach einigen Tagen zu Boden sinken. Hingegen produzieren die Antheren der Sorte Svilena mindestens über 5-6 Wochen ES, die sich gut ablösen, auf der Medienoberfläche schwimmen und weiter wachsen. In einer Bilderreihe wird die Entwicklung auf Induktionsmedium vom Auflegen der Antheren bis zum Ende der Flüssigkultur nach 6 Wochen gezeigt (*Abb.7*). Nach 7 Tagen sind erste Ausstülpungen an den Antheren sichtbar (Ausschnitt Svilena Tag 7), aus denen sich die ersten ES herausbilden. Im letzten Bild (Ausschnitt Svilena Tag 24) der Serie ist eine ES nach 24 Tagen zu sehen, die sich schon in Richtung Pflanzenspross entwickelt.

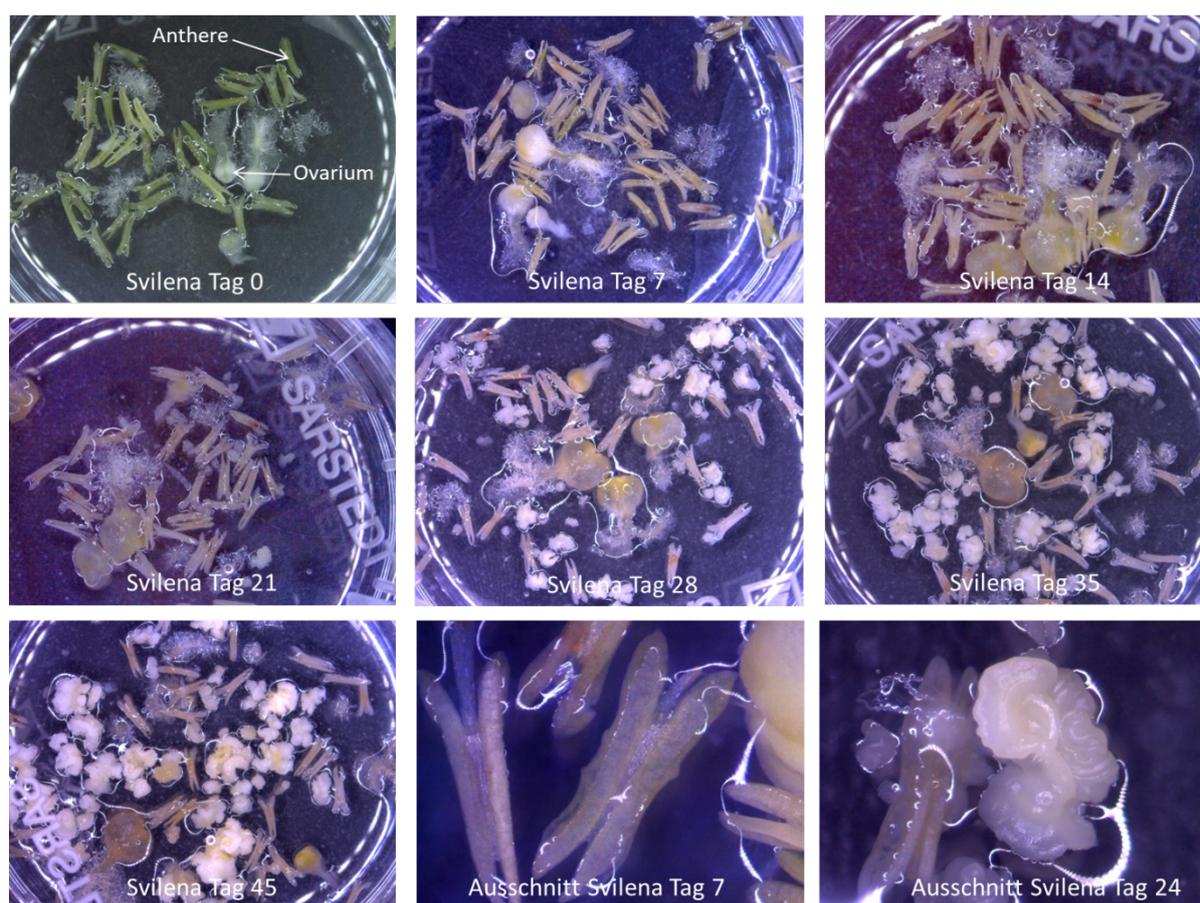


Abb.7: Entwicklung der embryonalen Strukturen im Flüssig-Induktionsmedium über einen Zeitraum von 6 Wochen

Bei Svilena bildeten sich mit optimiertem Antherenkultur-Protokoll über alle Versuche hinweg aus 17658 Antheren von insgesamt 288 Ähren im Mittel 146 ES pro 100 Antheren (*Tab 1a*), wobei die Einzelwerte stark schwankten. Das beste Durchschnitts-Ergebnis (233 ES/ 100 Antheren) konnte mit Feldpflanzen erzielt werden, wobei die Datengrundlage hier nur auf 6 bearbeiteten Ähren beruht. Als Kontrollpflanze im Gewächshaus wurde Svilena bei 57 Versuchen (Kalenderwochen, siehe auch *Abb.8*) mitgeführt. Für die Auswertung wurden 221 Ähren verwendet, 1 bis 7 Ähren pro Versuch (MW 3,9), davon konnten nur von 18 Ähren

(8 %) keine ES induziert werden. Im Mittel ergaben die Kontrollversuche mit Svilena 144 ES pro 100 Antheren mit einem Spitzenwert von 536 ES/100 Antheren, die mit einer individuellen Ähre induziert werden konnten. Das Minimum lag bei 1 ES/Ähre. *Tabelle 1b* zeigt vergleichsweise ES/100Antheren-Werte der Sorten Florida und Pamier, sowie verschiedener Genotypen zusammengefasst aus dem 1. und 2. Gewächshausanbau. Diese MW-Werte schwanken zwischen 14 und 62 ES/100 Antheren.

2.1.2.2 Regenerationsraten - Grüne Pflanzen und Albinos

Nach dem Umsetzen der ES auf das feste Regenerationsmedium 1 (siehe *Tab. D*), bildeten sich während der weiteren Inkubation im Dunkeln aus vielen, aber nicht allen ES, Pflanzen. So betrug die Regenerationsrate (Pflanze/ ES) bei der Modellsorte Svilena im Mittel 77,6 %, mit 69,5 % grünen Pflanzen und 8,1 % Albinos (*Tab. 1a*). Der maximale Wert für die Regeneration von grünen Pflanzen, der von einer individuellen Ähre erreicht wurde, betrug 395 grüne Pflanzen/ 100 Antheren. Die sehr gute Induktions- und Regenerationsrate der Sorte Svilena war ausschlaggebend, sie als Kontrolle zu den GWH-Versuchen mit den Züchtungen (Zuchtlinien) und Sorten des bayerischen Genpools (insgesamt 182 Genotypen) mitzuführen. Hier bildete Svilena im Mittel 102 grüne Regenerate pro 100 Antheren (*Tab 1a*). *Abb. 8* zeigt Regenerationswerte grüner Pflanzen pro 100 Antheren über zwei Gewächshausanbauperioden verteilt. Auffällig ist die hohe Varianz der Gesamtdaten, obwohl es sich um eine Pflanze mit homogener Genetik und optimaler Gewebekulturtauglichkeit handelt. Die Ursachen sind im komplexen Versuchssystem zu suchen, das keine identischen Bedingungen schaffen kann – mehrmonatige Aufzucht der Spenderpflanzen unter variablen Gewächshausbedingungen, keine konstant optimalen Ähren-Entnahmezeitpunkte, Infektionen (Befall mit Blattläusen und/oder Thripsen), Labor-, „Handling“, u. a.. Der Einflussfaktor Temperatur ist in der Grafik aufgeführt - eine erhöhte Anzahl an Spitzenwerten in der kühleren Jahreszeit wird deutlich.

Genotyp	Anzahl Ähren	ES	ES/100 Antheren	Grüne Pflanzen			Albinos		Pflanzen gesamt %(ES)
				Anzahl	%(ES)	/100 Antheren	Anzahl	%(ES)	
Svilena (V3) Σ / \emptyset	61	3709	145	2402	65	94	83	2	67
Svilena (mitlaufende Kontrolle) Σ / \emptyset	221	13362	144	9507	67	102	1306	10	81
Svilena (Freiland 2019) Σ / \emptyset	6	587	233	360	61	143	50	9	70
Summe	288	17658		12269			1439		
MW			146		69,5	101		8,1	77,6

Tabelle 1a: Svilena (Modellpflanze in Vorversuchen (V3) und Kontrollpflanze bei Gewächshaus- und Freilandversuchen) - Embryoinduktion und Regeneration - Gebildete ES (Embryonale Strukturen), grüne- und Albino- Regenerate, sowie Regenerationsraten in Prozent bezogen auf ES und 100 Antheren; dargestellt sind Mittelwerte (MW) und Summen im Vergleich; alle Versuche mit 300 mg Prolin/l Induktionsmedium; MW aus den Gesamtsummen berechnet.

Im Vergleich zu Svilena fallen die Regenerationswerte der zwei weiteren Modellsorten und der untersuchten 182 weiteren Genotypen (Zuchtlinien und Sorten) stark ab. Mit Florida

konnten in den Vorversuchen im Mittel 19 grüne Pflanzen/100 Antheren regeneriert werden. Pamier generierte im Mittel 2 grüne Pflanzen/100 Antheren (Tab. 1b).

Genotyp	Anzahl Ähren	ES	ES/100 Antheren	Grüne Pflanzen			Albinos		Pflanzen gesamt
				Anzahl	%(ES)	/100 Antheren	Anzahl	%(ES)	%(ES)
Florida (V3) Σ / \emptyset	46	1189	62	371	31	19	118	10	41
Pamier (V3) Σ / \emptyset	58	346	14	44	13	2	47	14	26
Züchtungen+Sorten 1. GWH-Anbau Σ / \emptyset	1355	8032	14	639	8	1	1194	15	23
Züchtungen+Sorten 2. GWH-Anbau Σ / \emptyset	814	7466	22	1891	25	6	1220	16	42

Tabelle 1b: Embryoinduktion und Regeneration - Gebildete ES (Embryonale Strukturen), grüne- und Albino- Regenerate, sowie Regenerationsraten in Prozent bezogen auf ES und 100 Antheren; dargestellt sind Mittelwerte und Summen aus allen Versuchen im Vergleich

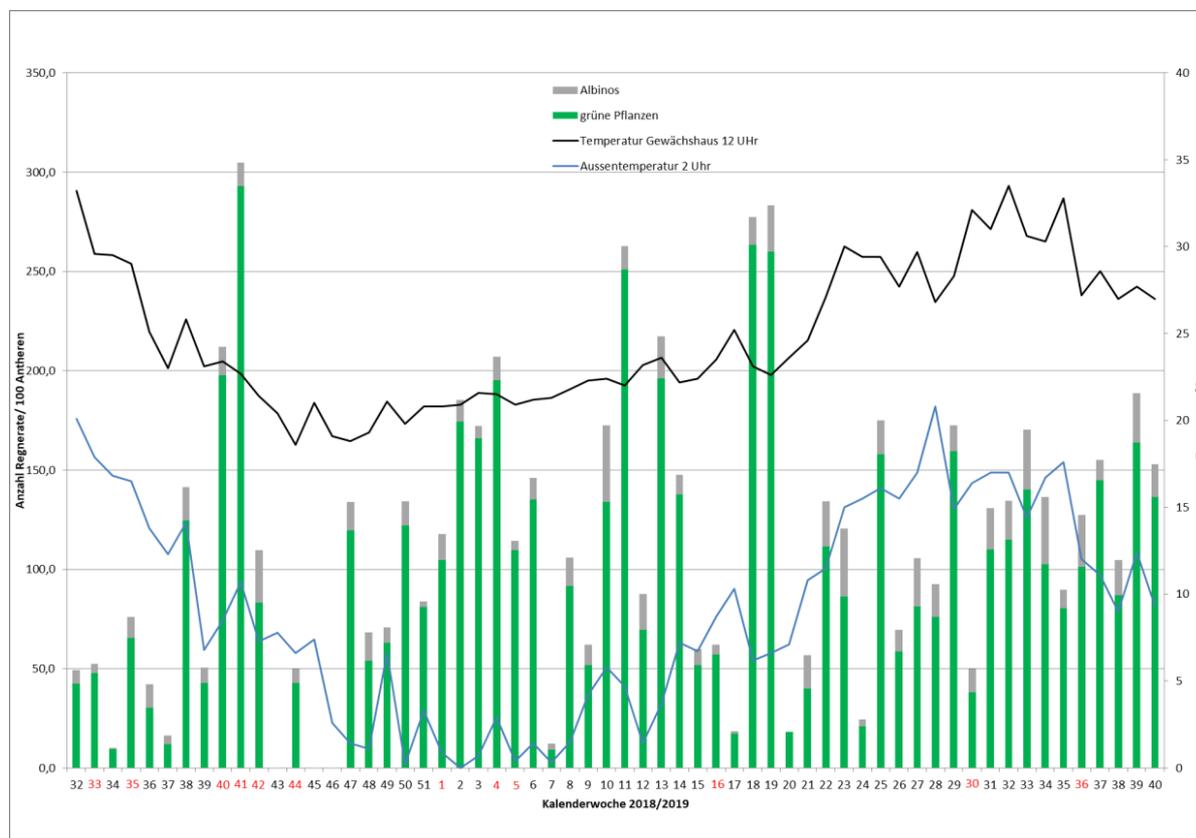


Abb.8: Regenerierte grüne Pflanzen und Albinos je 100 aufgelegte Antheren der Sorte Svilena je Kalenderwoche der Jahre 2018/2019. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus 2 bis 7 verwendeten Ähren, in den rot unterlegten Kalenderwochen lieferte nur 1 Ähre (42 Antheren) Daten (zum Teil standen nicht genug Spenderähren zur Verfügung, oder es gab Verluste durch Infektionen in den Medien).

2.1.2.3 Spontane Aufdopplungsraten der regenerierten grünen Pflanzen

Der Vorteil der DH-Entwicklung über Antherenkultur im Vergleich zur aktuell praktizierten Weizen x Mais-Methode ist die mögliche spontane Aufdopplung des Genoms. Je nach Genotyp kann man bis zu 40-50 % aufgedoppelte und damit vermehrungsfähige Pflanzen erhalten. Damit wäre eine weitere Effizienzsteigerung bei der Erzeugung von DH-Pflanzen zu erreichen, da der Arbeitsschritt „Colchizinierung“ (notwendig bei der Weizen x Mais Methode) nun entfallen kann.

Zur Messung des Haploidiestatus wurde ein Flowcytometer der Firma Sysmex (Cube 6) verwendet. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol). Zur Probenvorbereitung wurden 2-3 Blattspitzen der Pflanze in einer Petrischale unter Zugabe von 500 µl DAPI mechanisch mit einer Rasierklinge zerkleinert. Dabei werden die Zellkerne freigesetzt. Nach Zugabe weiterer 500 µl DAPI und Filtration der Suspension erfolgte die Messung. In *Abb.9* ist der Messaufbau dargestellt.



Abb.9: Messaufbau Flowcytometer

Von der Weizensorte Svilena konnten in den Versuchen zu den Modellsorten im Jahr 2018 7263 grüne Pflanzen erzeugt werden (*Tab.2*). Davon wurden 6471 grüne Pflanzen flowcytometrisch untersucht. Die Messung ergab, dass 46 % der Pflanzen ein doppelhaploides und 43 % ein haploides Genom besaßen. Mit 11 % der Pflanzen konnten keine auswertbaren Messungen durchgeführt werden.

2.1.3 Erkenntnisse aus den Modellsorten-Versuchen

Mit den ausgewählten Modellsorten Svilena, Florida und Pamier wurden im Januar 2018 mit Vorversuchen zur Etablierung eines optimalen Antherenkultur-Protokolls begonnen (Schneiden der Weizenähren und Auflegen der Antheren). Nach Literaturrecherche wurde ein auf Ficoll basiertes, modifiziertes W14-Induktionsmedium (*OTANI und SHIMADA 1995*) verwendet. Zusätzlich enthielt das Medium Arabinogalactan und Prolin. Die Prolinkonzentration wurde

dabei variiert und betrug bei V1 (=Kontrolle) 0 mg/l, bei V2 500 mg/l und bei V3 300 mg/l im Induktionsmedium. Um den Prolin-Einfluss auf die ES-Induktion und die Pflanzen-Regeneration zu messen, wurden aus einer Weizenähre je 42 Antheren in die Medien V1 und V2 oder V3 aufgelegt. Da die nutzbaren Spindelstufen je Ähre begrenzt sind, war die maximal mögliche Anzahl Antheren $2 \cdot (3 \cdot 14) = 84$.

Sorte	bearbeitete Ähren	aufgelegte Antheren	umgesetzte ES	Anzahl erzeugter grüner Pflanzen	Anzahl im Flow gemessener Pflanzen	regenerierte grüner Pflanzen/100 Antheren	Anzahl erzeugter Albinos	regenerierte Albinos/100 Antheren	Anzahl Pflanzen haploid	% haploid	Anzahl Pflanzen doppelhaploid	% doppelhaploid	Anzahl Pflanzen nicht wertbar	% nicht wertbar	grüne DH Pflanzen/100 Antheren
Svilena V1	129	5418	4545	3451	3077	64	190	4	1415	46	1297	42	365	12	23,9
Svilena V2	64	2688	1840	1410	1409	52	94	3	526	37	708	50	175	12	26,3
Svilena V3	61	2562	3709	2402	1985	94	83	3	1056	53	744	37	185	9	29,0
Svilena Σ	254	10668	10094	7263	6471		367		2997		2749		725		
Svilena \emptyset						68		3		46		42		11	25,8
Florida V1	119	4998	2446	1031	1061	21	150	3	511	48	474	45	76	7	9,5
Florida V2	77	3234	1307	721	729	22	85	3	324	44	329	45	76	10	10,2
Florida V3	46	1932	1189	371	358	19	118	6	161	45	158	44	39	11	8,2
Florida Σ	242	10164	4942	2123	2148		353		996		961		191		
Florida \emptyset						21		3		46		45		9	9,5
Pamier V1	147	6174	1041	208	215	3	131	2	159	74	52	24	4	2	0,8
Pamier V2	94	3948	569	103	114	3	89	2	72	63	37	32	5	4	0,9
Pamier V3	58	2436	346	44	41	2	47	2	27	66	12	29	2	5	0,5
Pamier Σ	299	12558	1956	355	370		267		258		101		11		
Pamier \emptyset						3		2		70		27		3	0,8

Tabelle 2: Ergebnisse der Prolin-Versuche mit den Modellsorten Svilena, Florida und Pamier (verschiedene Prolin-Konzentrationen im Induktionsmedium: V1: 0 mg Prolin/l = Kontrolle, V2: 500 mg Prolin/l, V3: 300 mg Prolin/l)

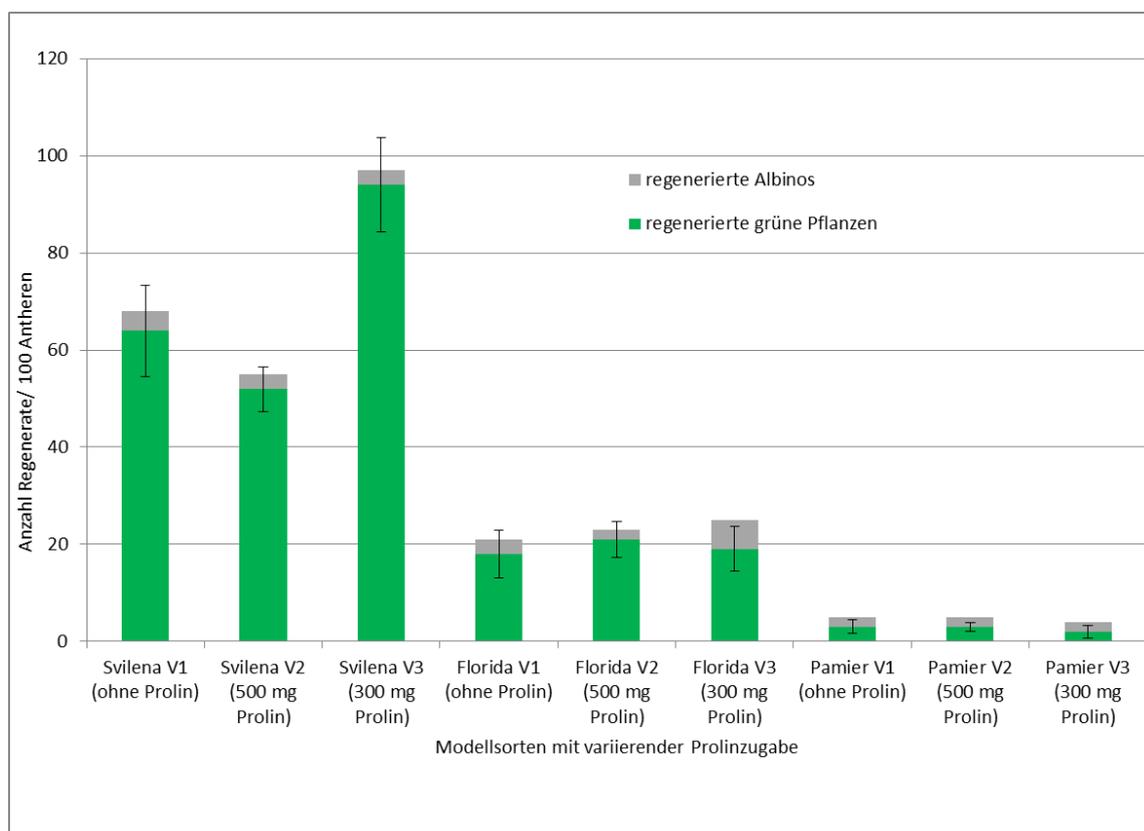


Abb.10: Einfluss verschiedener Prolinkonzentrationen auf die Regenerationsraten der Modellsorten Svilena, Florida und Pamier in Antherenkultur (V1: 0 mg Prolin/l = Kontrolle, V2: 500 mg Prolin/l, V3: 300 mg Prolin/l, Standardabweichung $s(n-1)$, bezogen auf Regenerationsrate grüner Pflanzen)

Bei Florida lagen die mittleren Regenerationswerte bei 21 grünen Pflanzen/ 100 Antheren. Die Sorte Pamier regenerierte im Schnitt 3 grüne Pflanzen/ 100 Antheren. Der Einfluss der Aminosäure Prolin auf die Induktions- und Regenerationsrate konnte nur bei Svilena verifiziert werden - optimale Prolinkonzentration bei V3 (siehe *Abb.10*). Bei Florida und Pamier konnte kein eindeutiger Einfluss der Prolinzugabe festgestellt werden. Im weiteren Versuchverlauf wurde deshalb mit einer Prolinkonzentration von 300 mg/l Induktionsmedium gearbeitet. Verglichen mit der am Institut für Pflanzenbau als Routine-Methode eingesetzten Weizen x Mais Methode lieferte neben Svilena auch Florida mit 21 grünen Pflanzen/ 100 Antheren (entsprechend 8,8 grünen Pflanzen/Ähre - die Bezugsgröße 100 Antheren ist in etwa mit 2 Ähren gleichzusetzen) ein ökonomisch interessantes Ergebnis. Die Weizen x Mais Methode erbrachte 2015 im Jahresmittel 4,4 grüne Pflanzen pro Ähre (Müller 2015), die zu 100 % haploid waren - der Weg über die Eizelle (gynogenetischer Weg) erzeugt ausschließlich haploide Pflanzen, d. h. es muss immer eine Colchizinierung zur chromosomalen Aufdopplung vorgenommen werden, was die Methode erheblich verteuert.

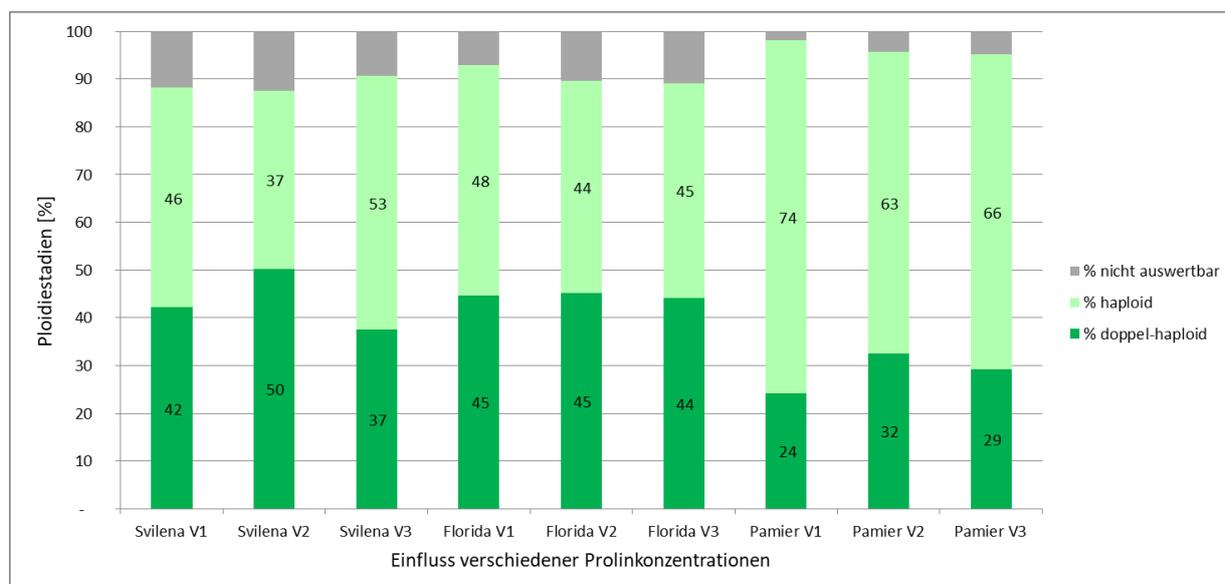


Abb.11: Einfluss verschiedener Prolinkonzentrationen auf das Ploidiestadium der Modellsorten Svilena, Florida und Pamier in der Antherenkultur (Kontrolle=V1: 0 mg Prolin/l, V2: 500 mg Prolin/l, V3: 300 mg Prolin/l)

Bei der androgenetischen DH-Methode (hier Antherenkultur) kommt es zur Spontanaufdopplung aller Chromosomen kurz nach den ersten Zellteilungen der Stress-induzierten Mikrospore. Wie aus *Abb. 11* ersichtlich wird, kann bei Florida mit einer Spontanaufdopplung bei über 40 % der Regenerate gerechnet werden kann. Die Ergebnisse der vergleichenden flowcytometrischen Messungen sind in Abbildung 11 prozentual dargestellt. Durchschnittlich lag die spontane Aufdopplung des Genoms bei Svilena und Florida mit 42 %, bzw. 45 % auf einem ähnlichen Niveau, Pamier lag mit durchschnittlich 27 % (*Tab. 2*) deutlich unter diesem Wert.

Als Resümee der Vorversuche kann festgehalten werden, dass die verwendete Methode einschließlich der Medien (siehe Anhang) sehr gut für die Antherenkultur geeignet ist. Der limitierende Faktor bei der Kommerzialisierung der Methode für Winterweizen ist der Genotyp (*GRAUDA et al. 2010; LANTOS et al. 2013; TADESSE et al. 2013*).

3. Screening des bayerischen Winterweizen-Genpools auf Antherenkultur-Tauglichkeit

3.1 Quellen des Winterweizen-Saatguts

Für den Anbau in Gewächshaus und Freiland stand dem Projekt Saatgut von 132 Zuchtlinien (Kornmaterial von F1-Kreuzungen und WP-Stämmen) und 94 Sorten zur Verfügung. Von Dr. Lorenz Hartl und Adalbert Bund vom LfL- Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung erhielten wir Saatgut von 65 Sorten und 21 Linienzüchtungen. Die Saatzeitung Bauer GmbH & Co. KG/ Obertraubling lieferte 8 Sorten und 27 Linien, die Saatzeitung Josef Breun GmbH & Co. KG/ Herzogenaurach 12 Sorten, die Saatzeitung Secobra GmbH/ Feldkirchen 9 Sorten und 33 Linien und die Saatzeitung Streng GmbH & Co. KG/ Uffenheim stellte 51 Linien zur Verfügung.

3.2 1. Anbauphase (12/2018-05/2019), 2. Anbauphase (06/2019-10/2019) und Freilandversuch im Vergleich

Hauptziel dieses Projektes war es, möglichst einen breiten Überblick über die Antherenkultur-Tauglichkeit der bayerischen Winterweizen-Zuchtlinien und Sorten zu erhalten. Dazu wurden 225 WW-Genotypen und 1 Hartweizen-Genotyp über zwei Gewächshaus-Anbauperioden und in einem Freilandversuch getestet.

Die ersten Ähren des 1. Anbaus wurden im Dezember 2018 geschnitten und auf ein Embryo-Induktionsmedium gelegt, die letzten Ähren wurden im Mai 2019 bearbeitet. Direkt im Anschluss erfolgte das Ährenschnitten des 2. Anbaus (Juni-Oktober 2019). Im Jahr 2019 wurden zudem 61 Sorten einschließlich der 3 Modellsorten Svilena, Florida und Pamier und 10 Stämme mit je 5-7 Ähren aus dem Freilandanbau untersucht. Dokumentiert wurde die Anzahl bearbeiteter Ähren, die Anzahl gebildeter embryonaler Strukturen, die Anzahl regenerierter grüner Pflanzen und Albino-Pflanzen (Albinos). Alle grünen Pflanzen wurden hinsichtlich des Zellkernzustands flowcytometrisch untersucht. Unterschieden werden konnte nach haploidem und doppelhaploidem Chromosomensatz. Einige Proben konnten keinem dieser Ploidie-Zustände eindeutig zugeordnet werden, bzw. waren nicht auswertbar. Das war dann der Fall, wenn keine eindeutige Peak-Zuordnung zu einem Ploidie-Level möglich war. Alle Ergebnisse des Gewächshausanbaus sind in den Gesamt-Tabellen A und B, die Ergebnisse des Freilandversuchs in Tabelle C im Anhang dargestellt.

Mit 9 Winterweizen-Genotypen (7 Sorten und 2 Stämme) ist ein Vergleich der Antherenkultur-Performance zwischen 1. und 2. GWH-Anbaus möglich (siehe Tabelle 3, 4 und Abb.13). Von allen Genotypen konnten in beiden Anbauperioden embryonale Strukturen aus den Antheren/ Mikrosporen entwickelt werden, von 5 Sorten doppelhaploide Pflanzen. Auffallend ist, dass im 2. Anbau die Entwicklung grüner Regenerate um ein Vielfaches gesteigert werden konnte. Die Sorte SU Selke entwickelte beispielsweise im ersten Anbau 1,4 grüne Pflanzen/ 100 Antheren, im zweiten Anbau 72, Atlantis 5,6 im ersten und 51 grüne Pflanzen/ 100 Antheren im zweiten Anbau. Diese Tendenz spiegelt sich auch wieder, wenn die Gesamtheit

aller Genotypen des 1. und 2. Anbaus verglichen wird (6-fache Steigerung beim 2. Anbau, siehe *Tab. 1b*). Als Ursache dieser verbesserten Antherenkultur in der 2. Anbauperiode können weniger veränderte Umweltbedingungen herangezogen werden, da die Kontrolle Svilena über diese zwei mehrmonatigen Zeiträume hinweg keine wesentlichen Unterschiede im Mittel zeigt, vielmehr dominieren hier sehr große wöchentliche Schwankungen (vergl. *Abb. 8*). Die Ursache dieser höheren Werte ist möglicherweise im früheren Antheren-Isolationszeitpunkt zu suchen. Die Ähren des 2. Anbaus wurden zu einem früheren Zeitpunkt geschnitten, zu dem die Zellkerne der Mikrosporen in der „4–6 Uhr“ Position gegenüber der Mikrospore lokalisiert waren, anstatt im späteren „6 Uhr“ Stadium (siehe *Abb. 2*). Die offensichtliche Verbesserung der Antherenkultur lässt sich tendenziell differenziert betrachten: die Regeneration und Organbildung im zweiten Anbau nahm bei den Sorten Boss, SU Selke, Atlantis und dem Mittel aller Genotypen stärker zu als die Bildung embryonaler Strukturen.



Abb. 12: Sortenanbau Freilandversuch 2019

Die Antheren von 53 Genotypen aus dem Freilandversuch entwickelten mindestens eine embryonale Struktur, bei 38 Genotypen wuchsen daraus Albinos und bei 24 Genotypen wuchs mindestens eine grüne Pflanze (*Tab. C* im Anhang). 6 Sorten regenerierten mehr als 10 grüne Pflanzen von ca. 250 aufgelegten Antheren. Neben den Sorten Svilena, Florida und Atlantis, waren dies die drei Sorten WS Hahn mit jeweils variierender 1RS Translokation. *Tabelle 5* und *Abb. 14* zeigen die bereits in *Tab. 3* und *4* dargestellten 9 ausgewählten Genotypen zum Vergleich. Daneben sind noch die 3 WS Hahn Sorten aufgeführt. Lediglich diese Translokationssorten und Atlantis repräsentieren Genotypen mit guter Antherenkultur-Tauglichkeit. Die Freilandbedingungen waren offensichtlich für die Modellsorten Svilena (143 grüne Pflanzen/ 100 Antheren, siehe *Tab. C* und *Tab. 1a*) und Florida (35 grüne Pflanzen/ 100 Antheren, *Tab. C*) optimal.

Genotyp (Sorte)	Anzahl Ähren	Anzahl ES	ES/100 Antheren	grüne Pflanzen	Grüne Pflanzen/ ES (%)	grüne Pflanzen /100 Antheren	Albinos	Albinos/ 100 Antheren	Pflanzen haploid	Pflanzen DH	grüne DH Pflanzen / 100 Antheren
Petrus	7	94	32	2	2	0,7	16	5,4	1	1	0,3
Forum	6	16	6	0	0	0,0	0	0,0	0	0	0,0
Boss	7	32	11	10	31	3,4	6	2,0	4	3	1,0
SU Selke	5	9	4	3	33	1,4	1	0,5	2	1	0,5
220	12	33	7	0	0	0,0	8	1,6	0	0	0,0
LG Akkurat	6	16	6	0	0	0,0	3	1,2	0	0	0,0
Atlantis	6	139	55	14	10	5,6	44	17,5	5	4	1,6
SU Anapolis	6	39	15	1	3	0,4	16	6,3	0	1	0,4
226	6	19	8	0	0	0,0	1	0,4	0	0	0,0

Tabelle 3: Ausgewählte Genotypen - Ergebnisse des 1. Gewächshausanbaus

Genotyp (Sorte)	Anzahl Ähren	Anzahl ES	ES/100 Antheren	grüne Pflanzen	Grüne Pflanzen/ ES (%)	grüne Pflanzen /100 Antheren	Albinos	Albinos/ 100 Antheren	Pflanzen haploid	Pflanzen DH	grüne DH Pflanzen / 100 Antheren
Petrus	7	71	24	21	30	7,1	28	9,5	13	8	2,7
Forum	6	72	29	17	24	6,7	8	3,2	13	4	1,6
Boss	7	79	27	37	47	12,6	7	2,4	23	13	4,4
SU Selke	4	176	105	121	69	72,0	6	3,6	56	51	30,4
220	7	132	45	51	39	17,3	18	6,1	34	14	4,8
LG Akkurat	6	85	34	26	31	10,3	7	2,8	19	6	2,4
Atlantis	6	191	76	129	68	51,2	14	5,6	59	63	25,0
SU Anapolis	6	52	21	33	63	13,1	0	0,0	22	10	4,0
226	6	46	18	16	35	6,3	3	1,2	13	2	0,8

Tabelle 4: Ausgewählte Genotypen - Ergebnisse des 2. Gewächshausanbaus

Genotyp (Sorte)	Anzahl Ähren	Anzahl ES	ES/100 Antheren	grüne Pflanzen	Grüne Pflanzen/ ES (%)	grüne Pflanzen/100 Antheren	Albinos	Albinos/ 100 Antheren	Pflanzen haploid	Pflanzen DH	grüne DH Pflanzen / 100 Antheren
Petrus	5	18	9	2	11	1,0	2	1,0	2	0	0,0
Forum	6	48	19	2	4	0,8	3	1,2	0	2	0,7
Boss	6	32	13	2	6	0,8	6	2,4	2	0	0,0
SU Selke	6	56	22	2	4	0,8	3	1,2	1	1	0,4
220	6	21	8	1	5	0,4	9	3,6	0	1	0,4
LG Akkurat	6	45	18	7	16	2,8	14	5,6	6	1	0,4
Atlantis	6	93	37	24	26	9,5	13	5,2	7	13	4,7
SU Anapolis	7	57	19	7	12	2,4	5	1,7	2	5	1,6
226	6	23	9	0	0	0,0	0	0,0	0	0	0,0
WS Hahn 1RS-WR	6	114	45	95	83	37,7	14	5,6	50	41	14,9
WS Hahn 1RS-RW	6	129	51	74	57	29,4	0	0,0	45	17	6,2
WS Hahn 1RS-WW	5	25	12	17	68	8,1	0	0,0	7	4	1,7

Tabelle 5: Ausgewählte Genotypen - Ergebnisse des Freilandversuches 2019

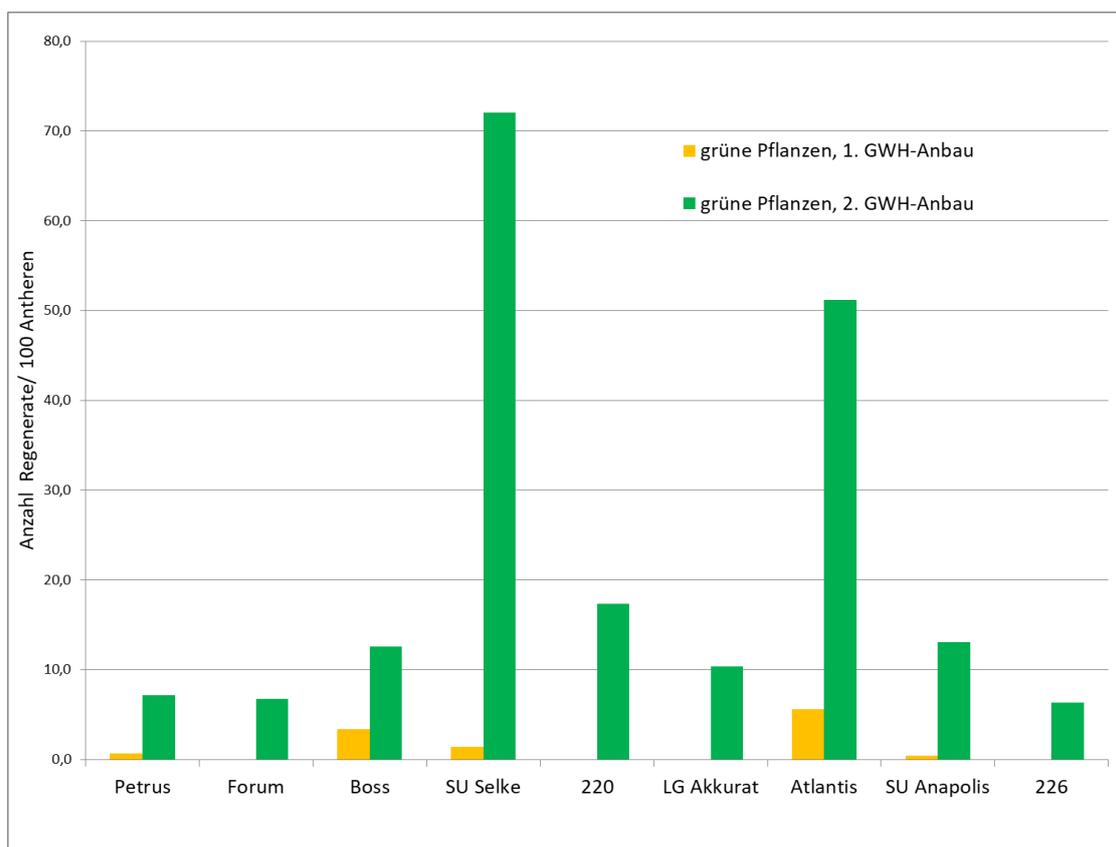


Abb. 13: Anzahl Regenerate je 100 Antheren ausgewählter Genotypen des 1. und 2. Gewächshausanbaus im Vergleich

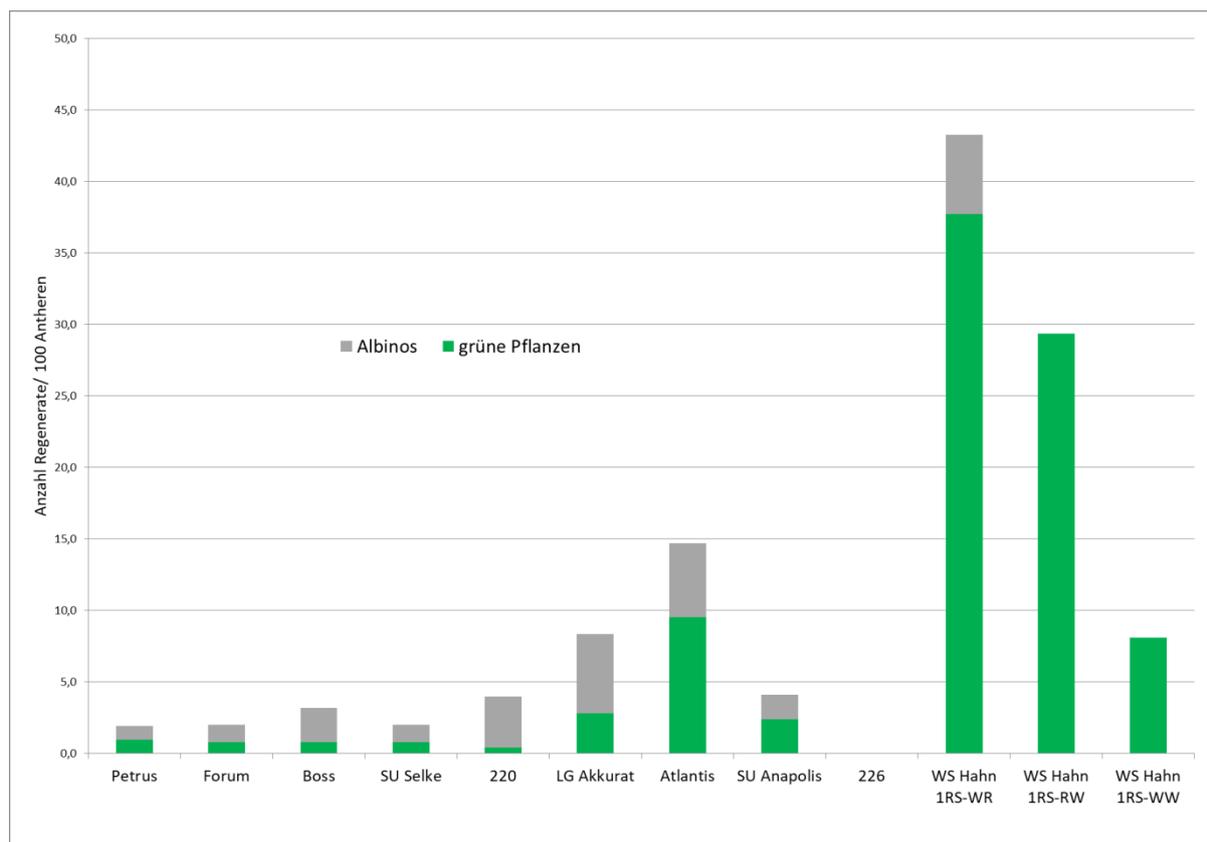


Abb. 14: Anzahl Regenerate je 100 Antheren ausgewählter Genotypen aus dem Freilandanbau 2019

3.3 Ökonomisch relevante Antherenkultur-Ergebnisse der Sorten und Zuchtlinien

In *Tab. 6* und *Abb. 15* sind 31 Genotypen herausgestellt, die mit Ausnahme der zwei WS Hahn-Sorten (Feldanbau) und der Sorte Purino (1. GWH Anbau) aus dem 2. Gewächshausanbau stammen und mindestens 9 grüne Pflanzen/ 100 Antheren, bzw. 4 grüne Pflanzen/ Ähre über die Antherenkultur produziert haben. Damit erreichen diese Genotypen (10 Sorten und 21 Linien aus bayerischen Zuchtprogrammen) ein ökonomisch relevantes Antheren/ Mikrosporen-Regenerations-Niveau, womit die Antherenkultur-Methode zur Produktion doppelhaploider Pflanzen der Weizen x Mais LfL-Routine Methode überlegen wäre. Die W x M Methode liefert im langjährigen Jahresmittel über alle Genotypen hinweg zwischen 4 und 6 grüne haploide Pflanzen pro Ähre (siehe *Müller In: IPZ-Jahresberichte 2008 - 2015*). Diese Regenerate müssen zusätzlich mit Colchizin behandelt werden, um eine Genom-Aufdopplung zu erreichen. Die 31 Genotypen bildeten in der Antherenkultur im Schnitt 20 embryonale Strukturen, 6 Albinos und 22 grüne Pflanzen pro 100 Antheren, was 9 grünen Pflanzen pro Ähre entspricht. Die Regenerationsrate, bezogen auf ES, errechnet sich auf 46 % im Durchschnitt. Bei einer gemessenen mittleren chromosomalen Aufdopplungsrate von 36 % beträgt die mittlere Produktion an DHs 8 doppelhaploide Pflanzen pro 100 Antheren, entsprechend 3,3 spontan aufgedoppelten DHs/Ähre. Rechnet man die Modellsorten Svilena und Florida noch dazu, so lassen sich 15 % der 226 untersuchten Genotypen (inklusive 1 Hartweizensorte) als Antherenkultur tauglich charakterisieren. Mit diesem Wissen wäre es möglich die Antherenkultur-Tauglichkeit für Winterweizen in ein zukünftiges Zuchtprogramm mit aufzunehmen. *Abb. 16* zeigt die 10 ermittelten Sorten mit guter Antherenkultur-Tauglichkeit im Vergleich. Die Sorte SU Selke erreicht einen Spitzenwert von 30 grünen Pflanzen pro Ähre (72 grüne Pflanzen/ 100 Antheren) mit einer mittleren Aufdopplungsrate von 42 %. Die maximale Aufdopplungsrate von 63 % wurde bei Ikarus gemessen. Das Minimum lag bei 23 % (LG Akkurat). JB Asano zeigte die von den 10 grafisch dargestellten Sorten geringste Mikrosporen-Regenerationsfähigkeit (3,7 grüne Pflanzen/Ähre = 8,7 grüne Pflanzen/100 Antheren).

Genotyp	Anzahl Ähren	Anzahl ES	Albinos	grüne Pflanzen	ES/Ähre	grüne Pflanzen/ Ähre	Albinos/ 100 Antheren	grüne Pflanzen/ 100 Antheren	DHs	Aufdopplungsrate (%)
SU Selke	4	176	6	121	44	30,3	3,6	72,0	51	42
197	6	253	34	145	42	24,2	13,5	57,5	54	37
Atlantis	6	191	14	129	32	21,5	5,6	51,2	63	49
104	5	126	7	90	25	18,0	3,3	42,9	47	52
WS Hahn 1RS-WR	6	114	14	95	19	15,8	5,6	37,7	41	43
203	4	116	12	54	29	13,5	7,1	32,1	19	35
168	3	41	0	37	14	12,3	0,0	29,4	10	27
WS Hahn 1RS-RW	6	129	0	74	22	12,3	0,0	29,4	17	23
190	4	106	13	48	27	12,0	7,7	28,6	17	35
191	6	119	12	68	20	11,3	4,8	27,0	28	41
188	8	143	9	71	18	8,9	2,7	21,1	18	25
Purino	17	571	80	136	34	8,0	11,2	19,0	61	45
206	6	74	5	45	12	7,5	2,0	17,9	22	49
220	7	132	18	51	19	7,3	6,1	17,3	14	27
163	6	82	15	39	14	6,5	6,0	15,5	8	21
114	5	41	4	31	8	6,2	1,9	14,8	11	35
SU Anapolis	6	52	0	33	9	5,5	0,0	13,1	10	30
110	6	75	11	32	13	5,3	4,4	12,7	11	34
Boss	7	79	7	37	11	5,3	2,4	12,6	13	35
139	6	134	18	30	22	5,0	7,1	11,9	13	43
210	6	86	12	27	14	4,5	4,8	10,7	4	15
LG Akkurat	6	85	7	26	14	4,3	2,8	10,3	6	23
194	6	78	11	26	13	4,3	4,4	10,3	11	42
Ikarus	7	194	16	30	28	4,3	5,4	10,2	19	63
199	5	48	9	21	10	4,2	4,3	10,0	4	19
228	6	151	58	23	25	3,8	23,0	9,1	6	26
161	6	109	32	22	18	3,7	12,7	8,7	11	50
169	6	132	20	22	22	3,7	7,9	8,7	6	27
JB Asano	6	109	38	22	18	3,7	15,1	8,7	8	36
115	5	50	4	18	10	3,6	1,9	8,6	8	44
222	7	76	6	25	11	3,6	2,0	8,5	12	48
MW (n=31)					20	9	6	22		36
s(n-1)					9	7	5	16		11

Tabelle 6: Ergebnisse von 31 Genotypen (Sorten und Zuchtlinien) mit ökonomischer Relevanz aus dem 2. Gewächshaus-Anbau (WS Hahn-Sorten aus Freilandanbau; Purino aus 1. GWH-Anbau) DH = Doppelhaploid, MW = Mittelwert, s = Standardabweichung, ES = Embryogene Strukturen

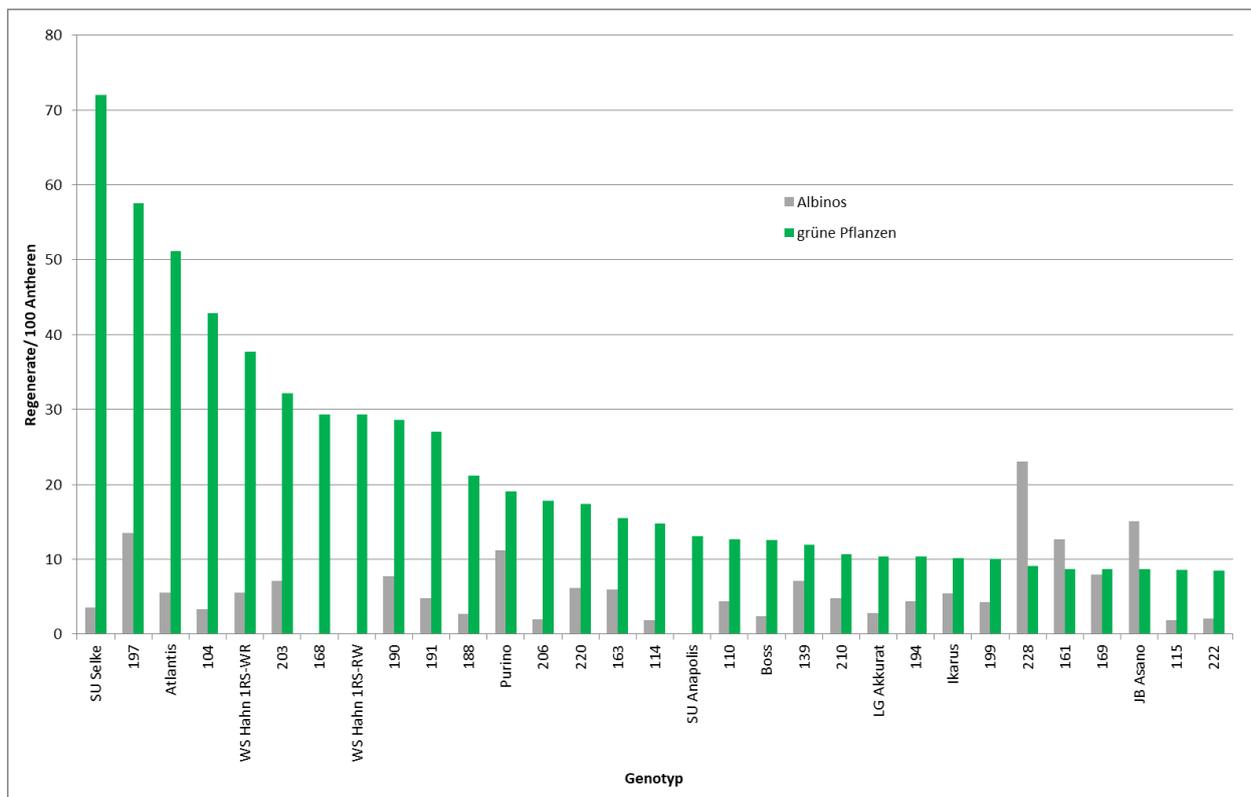


Abb. 15: Sorten und Zuchtlinien aus dem 2. Gewächshaus-Anbau, die wirtschaftlich interessante Regenerationsraten bei der Antherenkultur erbracht haben (WS Hahn-Sorten aus Freilandanbau; Purino aus 1. GWH-Anbau)

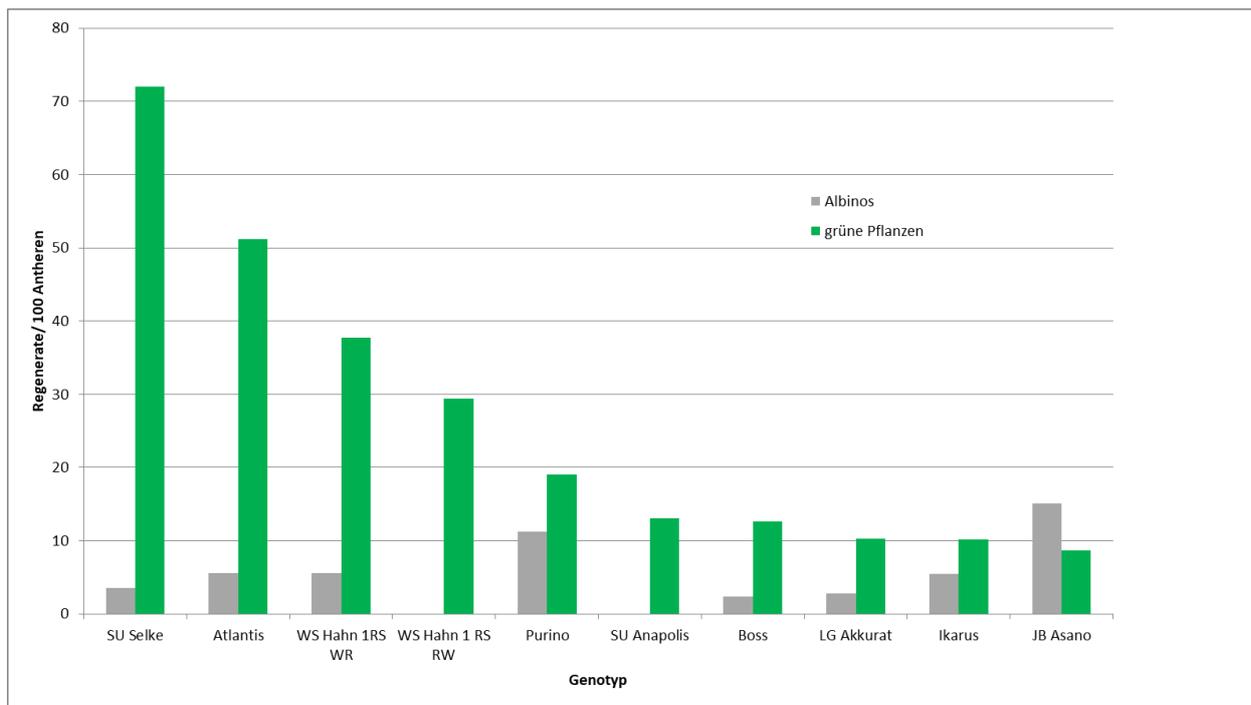


Abb. 16: Ausgewählte Sorten aus dem 2. Gewächshaus-Anbau, die wirtschaftlich interessante Regenerationsraten bei der Antherenkultur erbracht haben (WS Hahn-Sorten aus Freilandanbau; Purino aus 1. GWH-Anbau)

4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Antherenkultur ist eine sehr effektive und elegante Methode zur Beschleunigung der Züchtung homozygoter F1-Winterweizenpflanzen. Sie hat das Potential die an der LfL seit 16 Jahren im Routine Betrieb angewandte Weizen x Mais-Methode abzulösen. Allerdings ermöglichen die sehr Genotyp-abhängigen Regenerationsraten noch keine allgemeine Anwendung. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen aber, dass schon jetzt 33 (31 plus 2 Modellsorten), d. h. 15 % der untersuchten 226 Genotypen Regenerationsraten von mindestens 4 grünen Pflanzen pro Ähre bzw. 8 bis 10 grünen Pflanzen pro 100 Antheren erzielen. Damit kann die Weizen x Mais Methode durch die Antherenkultur-Methode ersetzt werden. Eine Zunahme an Antherenkultur tauglichen Genotypen kann prognostiziert werden, wenn in Zukunft zunehmend Weizen-DH-Linien aus der Antherenkultur in den Züchtungsprozess der bayerischen Züchter Eingang finden. Dadurch würden sich die für die Antherenkultur entscheidenden Gene im allgemeinen Weizengenpool etablieren. In weiteren Versuchen sollte der vorteilhafte frühere Schneidezeitpunkt der Donorähren nochmals überprüft und angewandt werden. In Zukunft sind an der LfL Kreuzungsversuche mit mehreren Genotypen mit unterschiedlicher Antherenkultur-Tauglichkeit geplant (in Kooperation mit der Weizenzüchtungsgruppe des Instituts). Hierbei sollen Informationen über die Vererbbarkeit der Antherenkultur-Fähigkeit gesammelt werden.

5 Zusammenfassung

Doppelhaploide (DH) Pflanzen werden sehr häufig in der Pflanzensortenzüchtung eingesetzt, sie verkürzen den Zuchtgang um einige Jahre. DH-Pflanzen sind zu hundert Prozent reinerbige (homozygote) Pflanzen, bei denen alle väterlichen und mütterlichen Gene identisch sind. Solche Pflanzen lassen sich im Labor ausschließlich aus den entweder männlichen oder weiblichen haploiden Keimzellen (Pollenvorläuferzellen/Mikrosporen, Eizellen) regenerieren. Der normale, bei allen höheren Organismen herrschende diploide Zellkern-Zustand, wird durch identische Verdopplung des Genoms erreicht. Entweder geschieht dies spontan oder etwa durch Applikation des Mitosegiftes Colchizin.

Ziel dieses Projektes war es, an der LfL, neben der bestehenden und als Routine-Methode eingesetzten Weizen x Maismethode (gynogenetische Methode), bei der der doppelhaploide Zustand ausschließlich künstlich erzeugt werden muss, die effizientere und kostengünstigere (androgetische) Antherenkultur-Methode zur Produktion von doppelhaploidem Winterweizen (*Triticum aestivum* L.) zu etablieren. Bei dieser Methode werden die in den Antheren befindlichen haploiden Mikrosporen zum Zeitpunkt eines bestimmten Zellkern-Stadiums einem Hitzestress unterzogen und dadurch in ihrer Entwicklung reprogrammiert. Anstatt die normale Entwicklung zum Pollen zu durchlaufen, werden die Mikrosporen embryogen und sind in der Lage grüne Pflanzen zu regenerieren. Bei einem Teil der Mikrosporen kommt es während der ersten Zellteilungen zur Spontanaufdopplung des Chromosomensatzes, so dass sich natürlicherweise eine doppelhaploide Pflanze bilden kann. Da die Antherenkultur-Tauglichkeit sehr stark von der Genetik der jeweiligen Pflanzensorte oder Zuchtlinie abhängt, wurden zunächst Vorversuche mit Sorten durchgeführt, deren Antherenkultur-Tauglichkeit bekannt war. Mit den Modellsorten Svilena, Florida und Pamier konnte ein sehr praktikables Protokoll für die Antherenkultur bei Winterweizen erarbeitet werden, mit dem in der Folge 222 Winterweizen-Genotypen (132 Zuchtlinien und 90 Sorten) aus bayerischen Zuchtprogrammen auf die Fähigkeit getestet wurden, doppelhaploide Pflanzen über diese Methode entwickeln zu können.

Mit Svilena wurden im Durchschnitt 42 grüne Pflanzen pro Ähre aus den Antheren regeneriert, der Maximalwert lag bei 166 grünen Regeneraten pro Ähre. Florida entwickelte über die Antherenkultur im Mittel 8 grüne Pflanzen pro Ähre und Pamier nur 0,8 pro Ähre. Die chromosomale Aufdopplungsrate lag bei diesen drei Sorten im Mittel bei knapp 40 %. Um die bisherige DH-Produktionsmethode (Weizen x Maismethode) durch die Antherenkultur zu ersetzen, ist es notwendig mit dieser Methode mindestens 4 grüne Pflanzen pro Ähre zu erzeugen. Die Ergebnisse des Screenings des in Bayern verwendeten Genpools weisen 31 Genotypen (21 Zuchtlinien und 10 Sorten) auf, die dieses Kriterium erfüllen. Im Schnitt regenerierten sie 9 grüne Pflanzen pro Ähre über die Antherenkultur. Die Sorte SU Selke erreichte einen Spitzenwert von 30 grünen Pflanzen pro Ähre.

Offensichtlich besitzen 15 % aller getesteten Genotypen das komplexe Merkmal Antherenkultur-Tauglichkeit. Es wäre wünschenswert, dass die Weizenzüchter ein Augenmerk auf die Einkreuzung von „Antherenkultur-affinen“ Sorten legen, um die Vorteile der DH-Pflanzen in Zukunft noch besser nutzen zu können.

6 Summary

Double haploid (DH) plants are often employed in plant breeding, because they shorten the breeding process by several years. DH plants are completely homozygous plants with identical male and female alleles. Such plants derive in the lab exclusively either from male or female haploid gametes (microspores or egg cells.). The diploid state, common to all higher organisms, will be reached through identical duplication of the genome. This can happen spontaneously or via application of the mitosis poison colchicine. At the Bavarian State Research Center for Agriculture (LfL) so far double haploid winter wheat plants (*Triticum aestivum* L.) have routinely been developed by the gynogenic wheat x maize (W x M) method, that involves the application of colchicine, because 100 % haploid regenerates are delivered by this method.

The goal of this project was to establish a new lab protocol for anther culture of winter wheat, which can possibly substitute for the less efficient and cost intensive W x M method. The crucial point of the androgenic DH-production method is the application of a heat-stress treatment to the anthers at a certain state of the microspore cell nuclei inside the anthers. Through this treatment the microspores are reprogrammed and thus prevented from developing into pollen, but rather into embryogenic structures followed by the regeneration of green plantlets. Apart from the efficiency another advantage of microspore derived plants is to a certain extent the spontaneous duplication of the chromosomes.

The capability of wheat plants for anther culture strongly depends on the genotype, therefore preliminary trials have been performed with model varieties of known anther culture capability. With the aid of the varieties Svilena, Florida and Pamier a very practicable protocol for anther culture of winter wheat has been established. Subsequently, 222 winter wheat genotypes (132 breeding lines and 90 varieties) from Bavarian breeding programs have been screened for anther culture capability.

On average Svilena regenerated 42 green plants per ear from anthers with a maximum at 166 green regenerates per ear, the mean values for Florida were 8 green plants per ear and for Pamier 0,8 green plants per ear. The average spontaneous diploidisation rate was around 40 % for the three model varieties. In order to replace the so far used W x M method by the more efficient anther culture method in future, it is necessary to be able to generate at least 4 green plants per ear with this method. In the present screening of representative genotypes used in Bavarian breeding programs this criterion was met by 31 genotypes (21 breeding lines and 10 varieties). On average they regenerated 9 green plants per ear by anther culture with the variety SU Selke reaching a peak value of 30 green plants per ear.

Evidently, there are 15 % of the tested genotypes, who share the complex trait anther culture capability. For the future it would be desirable that the wheat breeders focus on the introgression of anther culture affine varieties, in order to fully exploit the advantages of plant breeding by employing double haploid plants.

7 Danksagung

Wir danken den bayerischen Saatzuchtunternehmen Saatzucht Bauer GmbH & Co. KG/ Obertraubling; Saatzucht Josef Breun GmbH & Co. KG/ Herzogenaurach; Secobra Saatzucht GmbH/ Feldkirchen; Saatzucht Streng GmbH & Co. KG/ Uffenheim für die Bereitstellung von Saatgut. Den Kollegen der Arbeitsgruppe Gewebekulturtechnik am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der LfL Freising danken wir für die personelle und technische Unterstützung, insbesondere, Frau Lisa Woyke, Frau Jutta Beer, Frau Elke Schultheiß, Frau Brigitte Sperrer und Frau Christine Schöffmann. Für sämtliche Fragen zu Weizen und die logistische Durchführung der Freilandversuche und Bereitstellung von Saatgut danken wir recht herzlich Herrn Dr. Lorenz Hartl und Herrn Adalbert Bund von IPZ 2 (Getreide) an der LfL Freising. Das Projekt wurde freundlicherweise von dem Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (A/17/06) finanziert.

8 Literaturverzeichnis

- Asakavičiūtė R., Jacquard C., Clement C. (2006). Study of Chlorophyll a and b in etiolated and androgenic plants of barley (*hordeum vulgare* L.). *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, Vol. 2, No. 1, pp. 10-15
- Bundessortenamt, Osterfelddamm 80, 30627 Hannover. (2019). Beschreibende Sortenliste 2019: Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte.
- Blakeslee, A.F., J. Belling, M.E. Farhnam and Bergner A.D. (1922). A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55: 646–647
- Chowdhry C.N., Tyagi A.K., Maheshwari & Maheshwari S.C. (1993). Effect of L-proline and L-tryptophane on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 357-361
- Gains, E.F. and Aase, H.C. (1926). A haploid wheat plant. *Am. J. Bot.* 13, 373–385
- Grauda D., Lepse N., Strazdiņa V., Kokina I., Lapiņa L., Miķelsone A. Ļubinskis L. and Rashal I. (2010). Obtaining of doubled haploid lines by anther culture method for the Latvian wheat breeding. *Agronomy Research* 8 (Special Issue III), 545–552
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204, 497
- Hansen N.J.P. and Andersen S.B. (1998). Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM. *Plant Breeding* 117, 401-405
- Ho, K.M. and Jones, G.E. (1980) Mingo barley. *Can. J. Plant Sci.* 60, 279–280
- Lantos C., Weyen J., Orsini J.M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihály R., Broughton S. and Pauk J. (2013). Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breeding* 132, 149-154
- Lantos C. and Pauk J. (2016). Anther Culture as an Effective Tool in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Breeding. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 52, No. 8, pp. 794–801
- Liu W., Zheng M.Y., Polle E.A. and Konzak C.F. (2002). Highly Efficient Double-Haploid Production in Wheat (*Triticum aestivum* L.) via Induced Microspore Embryogenesis. *Crop Sci.* 42:686-692
- Müller, M (2015) IPZ Jahresbericht 2015,
https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ipz/dateien/jb_ipz_15.pdf
- Otani, M. and Shimada T. (1995). Effect of synthetic medium on pollen embryo formation of common wheat and tetraploid wheat species. *Bull. RIA, Ishikawa Agr. Coll.* 4:45-51

Pereira A.M., Pereira L.G. and Coimbra S. (2015). Arabinogalactan proteins: rising attention from plant biologists. *Plant Report* 28:1-15

Pola S., Saradamani N. and Ramana T. (2007). Enhanced shoot regeneration in tissue culture studies of *Sorghum bicolor*. *Journal of Agricultural Technology* 3(2): 275-286.

Tadesse W., Tawkaz S., Inagaki M.N., Picard E. and Baum M. (2013): A Technical Manual: Methods and Applications of Doubled Haploid Technology in Wheat Breeding. *International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)*

9 Anhang: Tabellen A – D

Sorte/Stamm	Labor- nummer	Anzahl Ähren	Anzahl ES	grüne Pflanzen	Albinos	Anzahl grüne Pflanzen/100 Antheren	Flowcytometrische Messung			Aufdopplungs- rate (%)
							Pflanzen haploid	Pflanzen doppelhaploid	nicht aus- wertbar	
W18003	18003	6	193	2	35	0,8	0	2	0	100
W18004	18004	6	67	5	14	2,0	3	1	1	20
W18053	18053	3	6	0	2	0,0	0	0	0	
W18095	18095	4	0	0	0	0,0	0	0	0	
W18096	18096	6	12	3	4	1,2	3	0	0	0
W18097	18097	6	38	0	9	0,0	0	0	0	
W18102	18102	7	65	0	7	0,0	0	0	0	
W18103	18103	7	0	0	0	0,0	0	0	0	
W18119	18119	4	0	0	0	0,0	0	0	0	
W18120	18120	6	15	0	4	0,0	0	0	0	
Impression	1	7	16	2	1	0,7	1	1	0	50
Kometus	4	8	38	6	4	1,8	0	4	2	67
Spontan	80	7	10	2	1	0,7	2	0	0	0
Axioma	9	7	0	0	0	0,0	0	0	0	
Apostel	13	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
Kamerad	17	7	12	2	1	0,7	2	0	0	0
Boss	18	7	32	10	6	3,4	4	3	3	30
Informer	23	4	9	3	1	1,8	3	0	0	0
Asory	25	7	4	0	3	0,0	0	0	0	
Chaplin	26	6	40	4	4	1,6	3	0	1	0
Argument	30	6	19	2	5	0,8	2	0	0	0
239	38	7	54	1	17	0,3	0	1	0	100
WS Hahn 1RS WW	47	5	0	0	0	0,0	0	0	0	
WS Hahn 1RS WR	48	6	12	1	6	0,4	0	0	1	0
WS Hahn 1RS RW	49	6	5	0	4	0,0	0	0	0	
SU Selke	1001	5	9	3	1	1,4	2	1	0	33
220	1002	12	33	0	8	0,0	0	0	0	
Ikarus	1003	7	35	17	1	5,8	10	7	0	41
Architekt	1004	4	27	0	6	0,0	0	0	0	
LG Vertikal	1005	8	24	0	4	0,0	0	0	0	
LG Akkurat	1006	6	16	0	3	0,0	0	0	0	
221	1007	6	7	0	3	0,0	0	0	0	
222	1008	8	28	3	1	0,9	0	2	1	67
100	1009	6	3	0	0	0,0	0	0	0	
223	1010	10	0	0	0	0,0	0	0	0	
224	1011	5	8	0	1	0,0	0	0	0	
101	1012	5	37	0	4	0,0	0	0	0	
102	1013	6	35	0	9	0,0	0	0	0	
103	1014	6	3	0	0	0,0	0	0	0	
104	1015	8	9	4	0	1,2	3	1	0	25
105	1016	8	17	0	7	0,0	0	0	0	
161	1017	8	0	0	0	0,0	0	0	0	
162	1018	8	8	0	1	0,0	0	0	0	
163	1019	8	36	0	1	0,0	0	0	0	
164	1020	8	0	0	0	0,0	0	0	0	
165	1021	6	4	1	1	0,4	1	0	0	0
Ambition	1022	7	0	0	0	0,0	0	0	0	
Amigos	1023	7	17	0	1	0,0	0	0	0	
Bussard	1024	6	7	0	4	0,0	0	0	0	
Event	1025	7	0	0	0	0,0	0	0	0	
Format	1026	7	0	0	0	0,0	0	0	0	
Julius	1027	9	22	0	1	0,0	0	0	0	
225	1028	10	0	0	0	0,0	0	0	0	
Potential	1029	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
119	1030	6	50	0	0	0,0	0	0	0	
120	1031	6	40	4	0	1,6	0	4	0	100
121	1032	7	15	0	1	0,0	0	0	0	
122	1033	6	19	0	4	0,0	0	0	0	
123	1034	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
124	1035	7	14	0	3	0,0	0	0	0	
125	1036	4	0	0	0	0,0	0	0	0	
126	1037	6	62	0	12	0,0	0	0	0	
166	1038	6	57	0	6	0,0	0	0	0	
210	1039	6	132	18	4	7,1	10	6	2	33
167	1040	6	2	0	0	0,0	0	0	0	
168	1041	7	161	5	6	1,7	4	1	0	20
169	1042	6	61	0	5	0,0	0	0	0	
170	1043	6	89	2	11	0,8	0	0	2	0
171	1044	6	9	0	0	0,0	0	0	0	
172	1045	6	3	0	0	0,0	0	0	0	
Atlantis	1046	6	139	14	44	5,6	5	4	5	29
Petrus	1047	7	94	2	16	0,7	1	1	0	50
Forum	1048	6	16	0	0	0,0	0	0	0	
Rebell	1049	6	25	6	0	2,4	4	2	0	33
SU Anapolis	1050	6	39	1	0	0,4	0	1	0	100
226	1051	6	19	0	1	0,0	0	0	0	
Sarmund	1052	6	44	7	3	2,8	4	3	0	43
LG Kopermikus	1053	6	14	0	0	0,0	0	0	0	
Leandrus	1054	6	14	2	1	0,8	2	0	0	0
227	1055	6	2	0	0	0,0	0	0	0	
Elvis	1056	6	29	1	0	0,4	0	0	1	0
JB Diego	1057	6	10	0	0	0,0	0	0	0	
JB Asano	1058	6	37	0	7	0,0	0	0	0	
Trapez	1059	6	1	0	0	0,0	0	0	0	
Inspiration	1060	6	2	0	0	0,0	0	0	0	
Dichter	1061	6	3	0	0	0,0	0	0	0	
Kompass	1062	6	2	0	1	0,0	0	0	0	

Tabelle A-1: Ergebnisse der Sorten und Züchtungslinien des 1. Gewächshaus-Anbaus

Sorte/Stamm	Labor- nummer	Anzahl Ähren	Anzahl ES	grüne Pflanzen	Albinos	Anzahl grüne Pflanzen/100 Antheren	Flowcytometrische Messung			Aufdopplungs- rate (%)
							Pflanzen haploid	Pflanzen doppelhaploid	Messung nicht aus- wertbar	
Sherpa	1063	6	7	0	0	0,0	0	0	0	
173	1064	8	141	23	12	6,8	19	2	1	9
174	1065	6	61	0	8	0,0	0	0	0	
175	1066	6	112	1	11	0,4	1	0	0	0
176	1067	6	23	0	0	0,0	0	0	0	
177	1068	5	6	0	0	0,0	0	0	0	
178	1069	6	29	0	2	0,0	0	0	0	
179	1070	6	72	1	5	0,4	1	0	0	0
180	1071	6	44	0	12	0,0	0	0	0	
Campesino	1072	8	1	0	0	0,0	0	0	0	
228	1073	8	172	4	42	1,2	2	2	0	50
229	1074	6	3	0	0	0,0	0	0	0	
Pep	1075	6	60	0	2	0,0	0	0	0	
Foxx	1076	6	1	0	0	0,0	0	0	0	
230	1077	9	0	0	0	0,0	0	0	0	
106	1078	6	51	7	11	2,8	7	0	0	0
107	1079	6	19	0	4	0,0	0	0	0	
127	1080	6	86	0	20	0,0	0	0	0	
128	1081	6	5	0	1	0,0	0	0	0	
129	1082	6	20	1	6	0,4	1	0	0	0
130	1083	6	9	2	4	0,8	0	2	0	100
131	1084	6	133	6	29	2,4	1	4	2	67
132	1085	7	116	10	20	3,4	6	4	0	40
133	1086	8	62	1	9	0,3	0	1	0	100
134	1087	6	32	0	3	0,0	0	0	0	
181	1088	9	21	1	4	0,3	1	0	0	0
182	1089	6	17	1	4	0,4	1	0	0	0
183	1090	9	14	6	11	1,6	3	1	2	17
184	1091	12	369	1	44	0,2	0	1	0	100
185	1092	6	29	8	4	3,2	4	2	2	25
211	1093	9	101	17	19	4,5	11	3	3	18
186	1094	10	140	2	10	0,5	1	1	0	50
187	1095	7	105	1	22	0,3	0	1	0	100
108	1096	7	21	2	11	0,7	1	1	0	50
109	1097	8	5	0	2	0,0	0	0	0	
110	1098	6	32	3	6	1,2	2	0	1	0
111	1099	7	7	1	0	0,3	1	0	0	0
112	1100	7	6	1	3	0,3	1	0	0	0
113	1101	7	15	0	2	0,0	0	0	0	
114	1102	7	19	7	0	2,4	4	2	1	29
115	1103	7	39	5	2	1,7	1	4	0	80
135	1104	6	42	2	6	0,8	2	0	0	0
136	1105	6	63	0	20	0,0	0	0	0	
137	1106	7	28	1	5	0,3	1	0	0	0
138	1107	7	151	7	37	2,4	6	1	0	14
139	1108	7	34	0	7	0,0	0	0	0	
140	1109	7	55	1	19	0,3	0	1	0	100
141	1110	6	38	0	12	0,0	0	0	0	
142	1111	8	14	1	4	0,3	0	1	0	100
188	1112	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
189	1113	6	34	0	1	0,0	0	0	0	
190	1114	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
191	1115	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
192	1116	6	8	0	4	0,0	0	0	0	
193	1117	6	34	2	8	0,8	1	1	0	50
194	1118	6	30	1	5	0,4	0	1	0	100
195	1119	5	9	0	1	0,0	0	0	0	
143	1120	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
144	1121	7	7	0	0	0,0	0	0	0	
145	1122	7	0	0	0	0,0	0	0	0	
146	1123	12	213	3	19	0,6	3	0	0	0
147	1124	11	125	0	6	0,0	0	0	0	
148	1125	7	11	0	3	0,0	0	0	0	
149	1126	17	22	3	0	0,4	3	0	0	0
150	1127	22	93	7	11	0,8	0	6	1	86
196	1128	6	15	6	2	2,4	4	2	0	33
197	1129	10	273	51	44	12,1	24	23	4	45
198	1130	6	57	4	4	1,6	1	3	0	75
199	1131	6	60	9	12	3,6	7	2	0	22
200	1132	10	1	0	1	0,0	0	0	0	
201	1133	13	82	6	19	1,1	4	2	0	33
202	1134	10	55	3	15	0,7	1	2	0	67
203	1135	15	421	72	25	11,4	40	23	9	32
151	1136	15	151	11	35	1,7	7	1	3	9
152	1137	17	115	3	18	0,4	1	2	0	67
Purino	1138	17	571	136	80	19,0	68	61	7	45
154	1139	17	19	0	1	0,0	0	0	0	
155	1140	15	2	0	1	0,0	0	0	0	
156	1141	16	88	0	9	0,0	0	0	0	
157	1142	17	11	0	1	0,0	0	0	0	
158	1143	7	112	3	20	1,0	2	0	1	0
Brentano	1144	17	21	0	0	0,0	0	0	0	
Maradona	1145	17	21	0	5	0,0	0	0	0	
Terence	1146	17	7	0	2	0,0	0	0	0	
116	1147	12	10	0	0	0,0	0	0	0	
117	1148	6	18	10	1	4,0	5	2	3	20
118	1149	7	5	1	0	0,3	0	1	0	100
Gentleman	1150	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
Komponist	1151	6	3	0	0	0,0	0	0	0	
204	1152	6	125	21	13	8,3	13	6	2	29
205	1153	6	149	19	31	7,5	6	12	1	63
206	1154	7	42	7	6	2,4	3	3	1	43
207	1155	6	104	0	10	0,0	0	0	0	
208	1156	6	11	2	2	0,8	2	0	0	0
209	1157	6	31	2	14	0,8	1	0	1	0

Tabelle A-2: Ergebnisse der Sorten und Züchtungslinien des 1. Gewächshaus-Anbaus

Sorte/Stamm	Labor- nummer	Anzahl Ähren	Anzahl ES	grüne Pflanzen	Albinos	Anzahl grüne Pflanzen/100 Antheren	Flowcytometrische Messung			Aufdopplungs- rate (%)
							Pflanzen haploid	Pflanzen doppelhaploid	nicht aus- wertbar	
W18003	18003	0								
W18004	18004	0								
W18053	18053	0								
W18095	18095	0								
W18096	18096	0								
W18097	18097	0								
W18102	18102	0								
W18103	18103	0								
W18119	18119	0								
W18120	18120	0								
Impression	1	5	19	2	2	1,0	2	0	0	0
Kometus	4	6	125	5	9	2,0	3	2	0	40
Spontan	80	6	54	0	2	0,0	0	0	0	
Axioma	9	5	0	0	0	0,0	0	0	0	
Apostel	13	6	7	1	0	0,4	0	1	0	100
Kamerad	17	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
Boss	18	7	79	37	7	12,6	23	13	1	35
Informier	23	7	0	0	0	0,0	0	0	0	
Asory	25	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
Chaplin	26	10	76	5	3	1,2	2	3	0	60
Argument	30	6	16	1	3	0,4	1	0	0	0
239	38	6	26	1	10	0,4	1	0	0	0
WS Hahn 1RS WW	47	0								
WS Hahn 1RS WR	48	0								
WS Hahn 1RS RW	49	0								
SU Selke	1001	4	176	121	6	72,0	56	51	14	42
220	1002	7	132	51	18	17,3	34	14	3	27
Ikarus	1003	7	194	30	16	10,2	10	19	1	63
Architekt	1004	0								
LG Vertikal	1005	4	13	5	1	3,0	5	0	0	0
LG Akkurat	1006	6	85	26	7	10,3	19	6	1	23
221	1007	7	24	2	4	0,7	1	1	0	50
222	1008	7	76	25	6	8,5	13	12	0	48
100	1009	6	5	2	0	0,8	1	1	0	50
223	1010	6	4	0	0	0,0	0	0	0	
224	1011	6	18	0	2	0,0	0	0	0	
101	1012	6	72	11	15	4,4	4	5	2	45
102	1013	6	31	0	7	0,0	0	0	0	
103	1014	6	6	0	1	0,0	0	0	0	
104	1015	5	126	90	7	42,9	39	47	4	52
105	1016	7	53	4	36	1,4	2	2	0	50
161	1017	6	109	22	32	8,7	9	11	2	50
162	1018	6	28	16	3	6,3	12	4	0	25
163	1019	6	82	39	15	15,5	30	8	1	21
164	1020	8	129	25	39	7,4	16	8	1	32
165	1021	6	15	3	4	1,2	3	0	0	0
Ambition	1022	6	14	12	1	4,8	2	10	0	83
Amigos	1023	6	11	5	3	2,0	5	0	0	0
Bussard	1024	5	36	9	10	4,3	4	4	1	44
Event	1025	7	4	0	1	0,0	0	0	0	
Format	1026	5	0	0	0	0,0	0	0	0	
Julius	1027	2	6	0	2	0,0	0	0	0	
225	1028	6	107	5	19	2,0	2	3	0	60
Potential	1029	6	9	0	1	0,0	0	0	0	
119	1030	5	87	2	18	1,0	0	2	0	100
120	1031	6	74	7	11	2,8	2	5	0	71
121	1032	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
122	1033	6	7	0	3	0,0	0	0	0	
123	1034	6	19	12	3	4,8	7	5	0	42
124	1035	8	77	5	16	1,5	2	3	0	60
125	1036	7	72	7	19	2,4	1	3	3	43
126	1037	6	165	11	37	4,4	7	4	0	36
166	1038	6	11	3	0	1,2	3	0	0	0
210	1039	6	86	27	12	10,7	22	4	1	15
167	1040	6	26	1	2	0,4	1	0	0	0
168	1041	3	41	37	0	29,4	26	10	1	27
169	1042	6	132	22	20	8,7	13	6	3	27
170	1043	6	127	8	13	3,2	4	4	0	50
171	1044	6	40	5	0	2,0	5	0	0	0
172	1045	6	39	5	6	2,0	3	1	1	20
Atlantis	1046	6	191	129	14	51,2	59	63	7	49
Petrus	1047	7	71	21	28	7,1	13	8	0	38
Forum	1048	6	72	17	8	6,7	13	4	0	24
Rebell	1049	5	30	0	2	0,0	0	0	0	
SU Anapolis	1050	6	52	33	0	13,1	22	10	1	30
226	1051	6	46	16	3	6,3	13	2	1	13
Sarmund	1052	0								
LG Kopernikus	1053	6	44	7	8	2,8	5	1	1	14
Leandrus	1054	6	5	1	0	0,4	1	0	0	0
227	1055	0								
Ellvis	1056	6	22	3	1	1,2	3	0	0	0
JB Diego	1057	6	23	1	3	0,4	0	1	0	100
JB Asano	1058	6	109	22	38	8,7	11	8	3	36
Trapez	1059	6	5	2	0	0,8	2	0	0	0
Inspiration	1060	6	19	7	5	2,8	6	1	0	14
Dichter	1061	5	0	0	0	0,0	0	0	0	
Kompass	1062	7	16	2	7	0,7	1	1	0	50

Tabelle B-1: Ergebnisse der Sorten und Züchtungslinien 2. Gewächshaus-Anbaus

Sorte/Stamm	Labor- nummer	Anzahl Ähren	Anzahl ES	grüne Pflanzen	Albinos	Anzahl grüne Pflanzen/100 Antheren	Flowcytometrise Messung			Aufdopplungs- rate (%)
							Pflanzen haploid	Pflanzen doppelhaploid	nicht aus- wertbar	
Sherpa	1063	4	8	1	1	0,6	0	1	0	100
173	1064	6	25	8	3	3,2	6	1	1	13
174	1065	6	15	0	3	0,0	0	0	0	
175	1066	6	75	9	15	3,6	6	3	0	33
176	1067	5	32	6	7	2,9	2	4	0	67
177	1068	6	9	0	1	0,0	0	0	0	
178	1069	7	48	5	11	1,7	5	0	0	0
179	1070	4	26	0	6	0,0	0	0	0	
180	1071	5	76	1	14	0,5	1	0	0	0
Campesino	1072	0								
228	1073	6	151	23	58	9,1	15	6	2	26
229	1074	7	12	5	1	1,7	3	2	0	40
Pep	1075	6	28	0	8	0,0	0	0	0	
Foxx	1076	6	32	0	7	0,0	0	0	0	
230	1077	6	40	3	3	1,2	3	0	0	0
106	1078	6	61	13	10	5,2	9	4	0	31
107	1079	6	49	3	14	1,2	0	2	1	67
127	1080	0								
128	1081	0								
129	1082	0								
130	1083	0								
131	1084	0								
132	1085	0								
133	1086	0								
134	1087	0								
181	1088	6	9	2	4	0,8	0	2	0	100
182	1089	6	73	13	19	5,2	6	7	0	54
183	1090	4	1	1	0	0,6	1	0	0	0
184	1091	4	21	4	6	2,4	3	1	0	25
185	1092	6	30	4	5	1,6	0	4	0	100
211	1093	5	15	2	7	1,0	2	0	0	0
186	1094	3	0	0	0	0,0	0	0	0	
187	1095	8	130	22	22	6,5	11	9	2	41
108	1096	6	61	1	32	0,4	0	0	1	0
109	1097	5	32	0	5	0,0	0	0	0	
110	1098	6	75	32	11	12,7	21	11	0	34
111	1099	6	12	1	1	0,4	1	0	0	0
112	1100	1	20	7	0	16,7	0	7	0	100
113	1101	6	71	7	13	2,8	7	0	0	0
114	1102	5	41	31	4	14,8	20	11	0	35
115	1103	5	50	18	4	8,6	8	8	2	44
135	1104	5	112	6	13	2,9	0	6	0	100
136	1105	7	136	19	17	6,5	13	5	1	26
137	1106	6	43	4	19	1,6	4	0	0	0
138	1107	5	135	14	44	6,7	7	5	2	36
139	1108	6	134	30	18	11,9	16	13	1	43
140	1109	6	60	6	1	2,4	4	2	0	33
141	1110	4	51	4	14	2,4	3	1	0	25
142	1111	0								
188	1112	8	143	71	9	21,1	48	18	5	25
189	1113	8	61	6	7	1,8	4	2	0	33
190	1114	4	106	48	13	28,6	29	17	2	35
191	1115	6	119	68	12	27,0	39	28	1	41
192	1116	6	30	1	2	0,4	0	1	0	100
193	1117	4	15	7	1	4,2	6	1	0	14
194	1118	6	78	26	11	10,3	15	11	0	42
195	1119	6	23	2	0	0,8	2	0	0	0
143	1120	0								
144	1121	0								
145	1122	0								
146	1123	0								
147	1124	0								
148	1125	0								
149	1126	0								
150	1127	0								
196	1128	3	19	10	2	7,9	6	4	0	40
197	1129	6	253	145	34	57,5	81	54	10	37
198	1130	0								
199	1131	5	48	21	9	10,0	17	4	0	19
200	1132	6	7	2	0	0,8	2	0	0	0
201	1133	4	2	2	0	1,2	1	1	0	50
202	1134	6	77	20	19	7,9	14	5	1	25
203	1135	4	116	54	12	32,1	32	19	3	35
151	1136	0								
152	1137	6	60	4	11	1,6	4	0	0	0
Purino	1138	0								
154	1139	6	6	0	1	0,0	0	0	0	
155	1140	0								
156	1141	6	88	8	7	3,2	6	1	1	13
157	1142	6	5	4	0	1,6	4	0	0	0
158	1143	5	57	8	8	3,8	3	3	2	38
Brentano	1144	5	5	4	0	1,9	4	0	0	0
Maradona	1145	6	0	0	0	0,0	0	0	0	
Terence	1146	6	2	1	1	0,4	1	0	0	0
116	1147	4	3	1	1	0,6	1	0	0	0
117	1148	6	33	18	6	7,1	16	2	0	11
118	1149	7	7	6	1	2,0	6	0	0	0
Gentleman	1150	5	0	0	0	0,0	0	0	0	
Komponist	1151	4	9	0	0	0,0	0	0	0	
204	1152	2	69	38	3	45,2	17	19	2	50
205	1153	6	121	17	32	6,7	5	11	1	65
206	1154	6	74	45	5	17,9	22	22	1	49
207	1155	5	140	10	21	4,8	4	6	0	60
208	1156	0								
209	1157	2	16	9	2	10,7	4	4	1	44

Tabelle B-2: Ergebnisse der Sorten und Züchtungslinien 2. Gewächshaus-Anbaus

Sorte/Stamm	Anzahl Ähren	Anzahl ES	Grüne Pflanzen	Grüne Pflanzen/100 Antheren	Albinos	Pflanzen haploid	Pflanzen doppelhaploid	nicht auswertbar
Svilena	6	587	360	143	50	122	202	36
Florida	6	215	87	35	35	49	34	4
Atlantis	6	93	24	10	13	7	13	4
Petrus	5	18	2	1	2	2	0	0
Pamier	6	39	6	2	13	6	0	0
Forum	6	48	2	1	3	0	2	0
Rebell	6	23	0	0	5	0	0	0
Winnetou	6	11	0	0	3	0	0	0
SU Anapolis	7	57	7	2	5	2	5	0
226	6	23	0	0	0	0	0	0
Alfons	6	25	0	0	2	0	0	0
LG Kopernikus	6	0	0	0	0	0	0	0
Apostel	12	0	0	0	0	0	0	0
Leandrus	7	15	2	1	1	1	1	0
227	6	0	0	0	0	0	0	0
231	5	0	0	0	0	0	0	0
Safari	6	0	0	0	0	0	0	0
Asory	13	19	2	0	6	1	0	1
WS Hahn 1RS-WW	5	25	17	8	0	7	4	6
WS Hahn 1RS-WR	6	114	95	38	14	50	41	4
WS Hahn 1RS-RW	6	129	74	29	0	45	17	12
Chevignon	6	6	0	0	0	0	0	0
Tonnere KM 16-75	6	1	0	0	0	0	0	0
237	6	0	0	0	0	0	0	0
Campesino	13	17	1	0	3	1	0	0
KWS Scimitar	6	3	0	0	1	0	0	0
Safari	6	0	0	0	0	0	0	0
234	6	0	0	0	0	0	0	0
235	6	2	0	0	1	0	0	0
236	6	2	0	0	1	0	0	0
232	9	19	7	2	5	0	0	7
238	6	13	0	0	1	0	0	0
Elixer	6	0	0	0	0	0	0	0
RGT Reform	7	3	0	0	3	0	0	0
Kerubino	6	0	0	0	0	0	0	0
Patras	6	10	0	0	2	0	0	0
Spontan	6	0	0	0	0	0	0	0
Axioma	6	0	0	0	0	0	0	0
Faustus	7	9	1	0	1	1	0	0
Moschus	6	0	0	0	0	0	0	0
Nordkap	4	1	0	0	0	0	0	0
Boss	6	32	2	1	6	2	0	0
Informer	6	0	0	0	0	0	0	0
KWS Talent	6	34	0	0	0	0	0	0
Beryll	7	0	0	0	0	0	0	0
KWS Emerick	5	0	0	0	0	0	0	0
Argument	6	0	0	0	0	0	0	0
Chaplin	7	52	0	0	4	0	0	0
LG Initial	6	80	1	0	0	0	1	0
Lemmy	6	24	1	0	1	1	0	0
Himalaya	6	0	0	0	0	0	0	0
Viki	6	1	0	0	0	0	0	0
RGT Depot	6	0	0	0	0	0	0	0
SU Selke	6	56	2	1	3	1	1	0
LG Akkurat	6	45	7	3	14	6	1	0
Activus	6	1	0	0	0	0	0	0
Meister	6	0	0	0	0	0	0	0
Ponticus	6	7	0	0	1	0	0	0
Sheriff	6	3	0	0	0	0	0	0
RGT Aktion	7	3	0	0	1	0	0	0
Wintergold *)	6	26	0	0	0	0	0	0
Julius	6	33	1	0	2	1	0	0
Genius	5	0	0	0	0	0	0	0
Kamerad	6	31	4	2	6	2	2	0
220	6	21	1	0	9	0	1	0
Architekt	6	133	0	0	15	0	0	0
Akteur	6	0	0	0	0	0	0	0
Tobak	9	8	0	0	0	0	0	0
Gourmet	7	32	0	0	5	0	0	0
KWS Loft	6	2	0	0	0	0	0	0
KWS Trinity	6	2	1	0	1	1	0	0

*) Hartweizen

Tabelle C: Ergebnisse des Freilandversuches 2019

Antherenkultur bei Winterweizen - Versuch 2018/2019			
	Induktionsmedium	Regeneration 1	Regeneration 2
Makronährstoffe	Konzentration	Konzentration	Konzentration
	im Medium mg/l	im Medium mg/l	im Medium mg/l
KNO ₃	2000	2000	1900
NH ₄ H ₂ PO ₄	380	380	165
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200	200	370
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	140	140	440
K ₂ SO ₄	700	700	
KH ₂ PO ₄			170
Mikronährstoffe	Konzentration	Konzentration	Konzentration
	im Medium mg/l	im Medium mg/l	im Medium mg/l
H ₃ BO ₃	3	3	6,2
MnSO ₄ x H ₂ O	6,06	6,06	16,9
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	3	3	8,6
KJ	0,5	0,5	0,83
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	0,025	
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	0,025	0,025
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	0,005	0,005	0,25
	Konzentration	Konzentration	Konzentration
	im Medium mg/l	im Medium mg/l	im Medium mg/l
Thiamin	2	2	0,4
Kinetin	0,5	0,5	
Pyridoxin	0,5	0,5	
Nicotinsäure	0,5	0,5	
2,4-D	2		
L-Glutamin			750
Glycin	2	2	
Insoit			100
Eisen(III)-Natrium-EDTA	40	42.1	40
Prolin	V1:0/ V2:500/ V3:300		
Arabinogalactan	50	50	
Maltose	93680		
Saccharose		30000	20000
Ficoll	100000		
Agar		8000	
Gelrite			3000
pH	5,8	5,8	5,6

Tabelle D: Medienzusammensetzung für Induktion und Regeneration