

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Resistenzgenetik, Grünbach

Protokoll für die effiziente Produktion von doppelhaploiden Gerste- und Weizenpflanzen

Protocol for the efficient production of doubled haploid wheat and barley plants

Von Bärbel Foroughi-Wehr

Zusammenfassung

Bei der Antherenkultur von Gerste und Weizen gelang es, die Nährmedien so zu verbessern und die Techniken so zu vereinfachen, daß die Nutzung Doppelhaploider, z. B. in der Resistenzzüchtung, jetzt wesentlich effizienter ist. Für Gerste wurde ein Festmedium entwickelt, das eine hohe Regenerationsrate induziert und für die praktische Anwendung eine preiswerte Alternative zu teuren Ficoll-haltigen Medien bietet.

Ein Gemisch aus Gerstenstärke und Gelrite mit 60 g/l Maltose brachte bei allen untersuchten Genotypen die größte Ausbeute an grünen Pflanzen. Beim Weizen liefert nach wie vor das Kartoffelextraktmedium gute Ergebnisse, aber auch synthetische Medien mit 90 g/l Maltose können mit Erfolg verwendet werden. Hier ist die Wechselwirkung zwischen Genotypen und Kulturbedingungen stärker ausgeprägt als bei der Gerste. Es gelingt jetzt auch das Weizengenom *in vitro* mit Colchizin zu verdoppeln.

Für Gerste und Weizen werden die einzelnen Kostenfaktoren für die Erzeugung von doppelhaploiden Linien unter Praxisbedingungen dargelegt.

Abstract

The improvement of the medium and the simplification of the techniques succeeded in an increased use of doubled haploids in resistance breeding of barley and wheat. A solid medium was developed which induced high regeneration rates in barley and for practical application it is much cheaper than liquid medium containing Ficoll. All genotypes tested showed the best results on a medium solidified with a mixture of barley starch and Gelrite and 60 g/l maltose.

For wheat anther culture the potato extract medium gives good results but synthetic media with 90 g/l maltose react equally successful. The interactions between different genotypes and culture conditions are more distinctly marked in wheat than in barley. The wheat genome can be doubled *in vitro* via colchicine treatment.

A calculation of the relative costs for the production of doubled haploid lines under practical conditions is given.

Einleitung

In-vitro-Techniken haben in den letzten Jahren Einzug in die praktische Züchtung vor allem im Bereich der Resistenzzüchtung gehalten. So findet in der Weizen- und Gerstenzüchtung die Antherenkulturmethode zur Erzeugung homozygoter doppelhaploider Linien (DH) zunehmend Anwendung. Bei der Beurteilung des Nutzens einer derartigen Methode sind heute in erster Linie ökonomische Gesichtspunkte ausschlaggebend,

d. h., die anfallenden Kosten für die eingesetzte Arbeitskraft und der Materialaufwand für die Erstellung einer DH-Linie – einer potentiellen neuen Sorten – finden generell Berücksichtigung. Im Speziellen muß die Optimierung des Arbeitsablaufes dann im jeweiligen Labor erfolgen. Dabei müssen vor allem die Einflußfaktoren Spenderpflanzenanzucht, Kulturbedingungen und Genotyp berücksichtigt werden. Eine weitere Einflußgröße für den Kulturerfolg stellt das Medium dar, über dessen Komponenten in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen für Gerste (SORVARI, 1986, HUNTER, 1987, SORVARI and SCHIEDER, 1987, KUHLMANN and FOROUGHI-WEHR, 1989, KNUDSON et al., 1989, FINNIE et al., 1989, ROBERTS-OEHLISCHLAGER et al., 1990, KAO et al., 1991, PICCIRILLI and ARCIONI, 1991, CAI et al., 1992) und für Weizen (SCHUMANN and HOFFMANN, 1989, HASSAWI et al., 1990, LAZAR et al., 1990, LAST and BRETTELL, 1990, ORCHINSKY et al., 1990, CHU et al., 1990, HAN-MIN et al., 1990, FADEL and WENZEL, 1990, CATTANEO and QIAO, 1991, LUCKETT et al., 1991, ZHOU et al., 1991, BALL et al., 1992) durchgeführt wurden.

Besonders der Einsatz von Ficoll (KAO, 1981) als Träger-substanz in flüssigen Nährmedien und der Ersatz von Saccharose durch Maltose (HUNTER, 1987) haben zu einer Erhöhung der Regenerationsraten geführt. Jedoch verteuern beide Substanzen, insbesondere Ficoll, die Medien erheblich. Es wurde deshalb nach billigeren Alternativen gesucht, die ähnlich hohe Regenerationsergebnisse liefern. Gleichzeitig wurde auch der methodische Ansatz sowohl für Gerste als auch für Weizen für die Anwendung in der Praxis weiter vereinfacht.

Material und Methoden

Gerste

Die Untersuchungen wurden mit genetisch divergierendem Ausgangsmaterial durchgeführt: F₁-Nachkommen von 'Igrí' × *Hordeum spontaneum* (*H. spontaneum*, Wildgerste, Sommer-ty) und von DH-Linie × 'Interbell' (Wintergerste) sowie 'Igrí'. Als Grundmedium fand das in KUHLMANN und FOROUGHI-WEHR (1989) publizierte Medium B Verwendung. Dabei wurden Festmedien mit unterschiedlichen Verfestigungsmitteln und Flüssigmedien mit 200 g/l Ficoll als Träger-substanz miteinander verglichen. Als Kohlenstoffquelle diente sowohl Maltose als auch Saccharose. Die Medien wurden entweder sterilfiltriert oder bei 121 °C und 1,5 bar 15 min sterilisiert.

Die Anzucht des Antherenspendermaterials erfolgte im wesentlichen wie bei FOROUGHI-WEHR und FRIEDT (1984)

beschrieben. Die Wintergerste wurde im Stadium 11–12 für 6 Wochen im Kurztag bei 5 °C vernalisiert. Die Weiterkultur bis Stadium 29 erfolgte ebenfalls im Kurztag bei einem Tag/Nachtwechsel von 12–14/10 °C in Klimakammern. Vom Stadium 30–31 bis zum Erreichen des Einkernstadiums der Mikrosporen benötigen die Pflanzen die höchste Lichtintensität, ist diese in den Wintermonaten nicht ausreichend, wird die Temperatur im Gewächshaus auf 14 °C am Tage und 10 °C in der Nacht abgesenkt. Die Tageslänge beträgt mindestens 14 h, und an besonders lichtarmen Tagen wird eine Zusatzbelichtung von 10 000–12 000 Lux gegeben. In den lichtreichen Sommermonaten erhalten die Spenderpflanzen bis zu 22 °C Tages- und 14–16 °C Nachttemperatur. Die Triebe werden etwa 35 cm lang mit 3–4 Blättern geschnitten, wenn sich die Mikrosporen in den Antheren im frühen bis mittleren Einkernstadium befinden. Sie werden dann entweder sofort *in vitro* kultiviert oder in Leitungswasser gestellt und bei 5 °C und Langtag mehrere Tage aufbewahrt.

Sobald die Blätter Chlorophyll-Abbau zeigen, sollten die Antheren nicht mehr kultiviert werden. Nach dem Entfernen des Fahnenblattes und der Grannen wird die Ähre einige Sekunden in 70%iges Äthanol getaucht, auf einem sterilen Objektträger werden die Antheren präpariert. Entweder werden 12 Antheren auf Flüssigmedium in einer Petrischale mit 3,5 cm Durchmesser kultiviert oder 30 Antheren auf Festmedium in einer Petrischale mit 5,5 cm Durchmesser (Detailangaben unter Ergebnisse). Nach dem Verschließen der Petrischalen mit Parafilm erfolgt die Kultur im Dunkeln bei 22–24 °C bis zum makroskopischen Sichtbarwerden der Embryoide oder Kalli.

Antheren auf Flüssigmedium werden dann unter Schwachlicht (2000–3000 Lux) kultiviert, bis nach 3–5 Wochen die ersten grünen Strukturen auf Regenerationsmedium umgesetzt werden können. Alle bis dahin nicht ergrüneten Strukturen werden mit Medium herauspipettiert und auf Festmedium übertragen und der Überschuss an Flüssigmedium abgesaugt. Auch die Embryoide und Kalli, die auf Festmedium entstehen, werden auf Regenerationsmedium umgesetzt. Die Zusammensetzung des Regenerationsmediums ist bei FOROUGHI-WEHR und FRIEDT (1984) beschrieben, doch ist die Saccharose durch 30 g/l Maltose ersetzt, verfestigt wird mit 4,5 g Agarose (Sigma Typ I). Regenerierte grüne Pflanzen werden auf ein Medium gleicher Zusammensetzung, jedoch mit 10 g/l Saccharose und 5 g/l Aktivkohle, verfestigt mit 3 g/l Gelrite, umgesetzt. Auf diesem Medium können die Pflanzen bereits *in vitro* vernalisiert werden (5–8 °C; Kurztag, 6 Wochen). Anderenfalls werden sie nach der Bewurzelung eingetopft, wobei sie bis zum Anwachsen hohe Luftfeuchtigkeit erhalten müssen.

Da durchschnittlich etwa 70 % der entstehenden Pflanzen während der *In-vitro*-Phase spontan ihr Genom verdoppeln, ist eine Colchizinierung und damit verbunden eine vorhergehende Ploidiebestimmung nur notwendig, wenn die Gesamtzahl der entstehenden Pflanzen zu niedrig ist. Im allgemeinen ist die Regenerationsrate jedoch hoch genug, so daß auf diesen aufwendigen und teuren Schritt unter praktischen Gesichtspunkten verzichtet werden kann und die Haploiden verworfen werden.

Weizen

Für die Untersuchungen fanden ausschließlich F₁-Pflanzen von Winterweizenkreuzungen mit aktuellen deutschen Sorten und DH-Linien Verwendung. Anzucht der Spenderpflanzen und Kultur der Antheren erfolgt ähnlich wie bei der Gerste beschrieben, deshalb sollen hier nur die prinzipiellen Unter-

schiede herausgestellt werden. Die Entwicklung vom Stadium 30–31 bis zum Erreichen des Einkernstadiums der Mikrosporen sollte bei etwas höheren Temperaturen erfolgen als bei der Gerste, d. h., in den lichtarmen Wintermonaten bei 12–14 °C Nacht- und 16–18 °C Tagestemperatur, im Sommer können die Nachttemperatur auf 18 °C und die Tagestemperatur auf Werte zwischen 20 und 26 °C ansteigen. Die Ähren werden vor der Präparation der Antheren 5 Minuten in Natriumhypochlorit (1,8 % aktives Chlor) oberflächensterilisiert und anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Kultur erfolgt ausschließlich auf flüssigen Nährmedien (1,5 ml in Petrischalen mit 3,5 cm Durchmesser; detaillierte Beschreibung unter Ergebnisse) im Dunkeln bei Temperaturen von 30 °C. Die regenerierenden Strukturen werden auf ein Regenerationsmedium nach CHUANG et al. (1978) überführt, das statt Saccharose 30 g/l Maltose enthält und mit Agarose verfestigt wird. Bis zur Differenzierung von Strukturen stehen die Petrischalen bei 24 °C im Dunkeln. Die Regenerate werden in Erlenmeyerkolben (100 ml) umgesetzt, wo sie sich bewurzeln.

Alle grünen Pflanzen werden ohne vorherige Ploidiebestimmung *in vitro* einer Colchizinbehandlung unterzogen. Dabei wird der Nährboden 3 Tage mit einer 0,02%igen Colchizininlösung überschichtet, und zwar soweit, daß der Wurzelhals von der Lösung bedeckt ist. Anschließend werden die Pflanzen mit sterilem Wasser gewaschen und für 2–3 Wochen zur weiteren Bewurzelung auf einen Nährboden gesetzt, der zusätzlich 5 g/l Aktivkohle enthält.

Die varianzanalytische Auswertung erfolgte mit dem Programm ANOVA von SAS. Für den Test der Mittelwerte wurde der Student-Newman-Keuls-Test verwendet.

Ergebnisse

Gerste

Ein Ziel der Untersuchungen war es, eine billigere Alternative für das als Trägersubstanz in der Flüssigkultur verwendete Ficoll zu finden und dabei die Maltose- bzw. Saccharosekonzentration zu optimieren. Die einzelnen Versuche, dargestellt in Tabelle 1, wurden zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt. Maltose ist Saccharose deutlich überlegen. Während im flüssigen Medium 20 g/l Maltose ausreichen und 60 g/l sogar eine negative Tendenz aufweisen, sind im festen Medium 60 g/l notwendig. Ein Zusatz von 90 g/l Maltose gilt für Weizen als optimal, bewirkt aber bei der Antherenkultur der Wintergerste eine Verringerung der Androgeneserate.

Ein flüssiges Medium mit Ficoll als Trägersubstanz zeigt gegenüber einem Medium, das entweder mit einem Agarose-Stärke- oder einem Gelrite-Stärke-Gemisch verfestigt wurde, signifikant verringerte Regenerationsraten. Aus dem Vergleich der Reaktion von Genotyp F auf diesen beiden Medien deutet sich darüber hinaus die Überlegenheit des mit Gelrite und Gerstenstärke verfestigten Nährmediums mit 60 g/l Maltose an.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß eine Sterilfiltration des Grundmediums B keine signifikante Verbesserung der *In-vitro*-Regeneration bewirkt, wenn man diese mit der Regeneration auf einem hitzesterilisierten Medium vergleicht. Da Sterilfiltration einen erhöhten Arbeitsaufwand und vermehrte Kosten bedeutet, ist Autoklavieren vorzuziehen.

Weizen

Das für Weizen entwickelte Medium (anonymous, 1976) basiert auf einem Extrakt aus gekochten Kartoffeln. Es enthält also undefinierte organische und anorganische Bestandteile, deren Menge und Zusammensetzung in Abhängigkeit

Tab. 1. Der Einfluß unterschiedlicher Medienkombination auf die Androgeneserate der Gerstenmikrosporen

Medium B (Kuhlmann, Foroughi-Wehr 1989)	Anzahl grüne Pflanzen/100 Antheren					
	A	B	C	Genotyp**		
				D	E	F
Zusätze/l						
1. 200 g Ficoll*						
20 g Maltose	2,4	3,7b	2,0	1,7b***		
2. 4 g Agarose						
40 g Stärke						
20 g Maltose			1,3	1,8b		
3. 200 g Ficoll*						
60 g Maltose			1,2	0,9b		
4. 4 g Agarose						
40 g Stärke						
60 g Maltose			2,9	2,7a		3,7
5. 3 g Gelrite						
40 g Stärke						
60 g Saccharose	1,5	2,7b			0,9	0,6b
6. 3 g Gelrite*						
40 g Stärke						
60 g Maltose	9,2	7,2a			16,1	16,4a
7. 3 g Gelrite						
40 g Stärke						
60 g Maltose					10,1	19,3a
8. 3 g Gelrite*						6,1
40 g Stärke						
60 g Saccharose					2,2	0,2b

* Medium B sterilfiltriert

** etwa 3000 Antheren pro Medium und Genotyp

*** Zahlen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant auf dem Niveau von p = 0,05

von der verwendeten Kartoffelcharge schwankt. Es ist vielfach der Versuch unternommen worden, dieses Medium durch ein Medium definierter Zusammensetzung zu ersetzen, jedoch konnte lediglich eine Verbesserung des Kartoffelextraktmediums durch Erhöhung der Makronährstoffgehalte (CHUANG et al., 1978) und durch Zugabe von Glutamin (DE BUYSER und HENRY, 1980) erreicht werden. In den letzten Jahren hat, wie bei der Gerste, die Verwendung von Maltose an Stelle von Saccharose zu einer Erhöhung der Induktionsrate geführt. Hier wurde versucht, ein Medium zu finden, das für möglichst viele Genotypen reproduzierbar hohe Regenerationsraten liefert. In Tabelle 2 sind die wichtigsten Ergebnisse der Versuche mit Ficoll-haltigem Flüssigmedium zusammengefaßt. Alle vergleichenden Untersuchungen mit festen Medien in ähnlicher Zusammensetzung, wie sie für die Gerste eingesetzt werden, brachten schlechtere Ergebnisse als die hier angeführten Flüssigmedien.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß neben genotypischen Einflüssen auf die Reaktionsfähigkeit der Mikrosporen auch Medium-Genotyp-Interaktionen bestehen. So unterscheiden sich zwar alle Medien im Mittel aller Genotypen signifikant voneinander, jedoch zeigt das Potato-II-Medium mit 90 g/l Maltose (Medium E) bei allen Genotypen eine positive Reaktion, wobei die Unterschiede zu den synthetischen Medien (B + C) nur bei einigen Genotypen deutlich sind. Es läßt sich deshalb keine eindeutige Reihung zwischen den Medien durchführen.

Gleichzeitig ist festzustellen, daß offenbar die Umweltbedingungen die Spenderpflanzen unterschiedlich dispositionieren, was aus der abweichenden Reaktion der Genotypen in den beiden Wiederholungen deutlich wird. Zwar ist Genotyp 3 über alle Medien den Genotypen 1 und 2 signifikant überlegen, jedoch deuten sich in den beiden Wiederholungen unterschiedliche Reaktionen der Genotypen auf den verschiedenen Medien an. Ganz allgemein kann aus den Versuchsergebnis-

sen jedoch geschlossen werden, daß auch synthetische Medien mit einer Maltosekonzentration von 90 g/l dem Kartoffelextraktmedium vergleichbare Regenerationsraten bringen.

Etwa 20 % der entstehenden Pflanzen verdoppeln in der In-vitro-Kultur spontan die Chromosomenzahl (2n = 6x = 42), der Rest bleibt haploid (n = 3x = 21). In Anlehnung an die Versuche von BARNABAS und KOVACS (1990) wurde Colchizin während der In-vitro-Entwicklung appliziert. Dabei ergab eine dreitägige 0,02%ige Colchizinbehandlung von jungen Pflanzen eine Aufdopplungsrate – je nach Genotyp – von 70 bis 90 %. Die gleiche Behandlung von embryogenem Kallus führte zu keinem positiven Ergebnis. Es wurden jeweils 150 Kalli für 3 Tage auf colchizinhaltiges Medium gesetzt, nach dieser Behandlung erhielten sie colchizinfreies Regenerationsmedium. Dabei regenerierten keine Pflanzen, während die colchizinfreien Kontrollen 15 grüne Pflanzen pro 150 Kalli bildeten.

Kosten

Unter praktischen Gesichtspunkten müssen jedoch nicht allein die Regenerationsraten auf den verschiedenen Medien von Interesse sein, sondern auch die Frage nach den Kosten für die Durchführung der verschiedenen Methoden. Die Kosten für das Grundmedium sind relativ niedrig, sie belaufen sich etwa auf 0,18 DM/l Medium. Das Kartoffelextraktmedium ist nur etwa halb so teuer, jedoch ist die Herstellung hier besonders aufwendig. Entscheidend für die Kosten sind also vor allem die Zusätze, das heißt die Kohlenstoffquelle und die Träger-substanz, darüber hinaus spielen jedoch auch Arbeitsaufwand und Handhabung eine Rolle. In Tabelle 3 ist ein Kostenver-

Tab. 2. Regeneration grüner Weizenpflanzen pro 100 Antheren von F₁-Nachkommen auf Flüssigmedium mit 100 g/l Ficoll (Anz. kultivierter Antheren: 3000–5000 pro Genotyp und Medium)

Genotyp	Medium B Tab. 1		Kartoffelextrakt-Medium		
	120 g/l	90 g/l	90 g/l* Maltose	72 g/l**	90 g/l
1. Wdhlg.					
1	0,4	2,1	2,7	1,0	3,2
2	0,6	2,0	1,8	1,1	3,5
3	1,7	5,6	3,5	1,9	6,3
gesamt	0,9	3,2	2,7	1,3	4,3
2. Wdhlg.					
1	0,9	3,1	2,0	1,5	3,0b***
2	0,4	2,5	2,2	1,3	4,0b
3	2,0	5,2	2,7	2,5	7,0a
gesamt	1,1c	3,6b	3,3c	1,8d	4,7a

* 75 mg Gerstenstärke pro Petrischale

** Fadel und Wenzel (1990)

*** Zahlen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant auf dem Niveau von p = 0,05.

Tab. 3. Medien- und Materialkosten für das Ansetzen von 1000 Gerstenantheren

Medium-Variante (Tab. 1)	Medium-menge ml	Anzahl Petrischalen	Anz. Anth./Petrischalen	Kostenfaktor	Mittl. Anz. Pfl.
1 fl.	125	83	12	7,4	24,5
2	500	33	30	1,5	15,5
3 fl.	125	83	12	7,5	10,5
4	500	33	30	1,9	31,0
5 + 8	500	33	30	1,0	14,3 + 12,0
6 + 7	500	33	30	1,5	122,3 + 118,3

gleich der in Tabelle 1 für Gerste verwendeten Medien ange stellt. Dabei wurde als Bezugsgröße der Aufwand für den Einsatz von 1000 Antheren verwendet. Die Saccharose-haltigen Festmedien sind am kostengünstigsten, während die Flüssigmedien mit Ficoll um ein 7,5faches teurer sind. Die letzte Spalte enthält die Anzahl Pflanzen pro 1000 Antheren, wobei hier über alle Versuche und alle Genotypen gemittelt wurde. Die Überlegenheit der Medien 6 und 7 wird deutlich.

Für Weizen liegen die Kosten für 1 l Medium unter denen für Gerste-Flüssigmedien, weil nur die halbe Ficoll-Menge benötigt wird, dafür ist der Maltoseanteil etwas höher. Der Kostenfaktor für 1000 Antheren liegt bei 5 im Vergleich zu dem preiswertesten Festmedium für Gerste. Für Weizen konnte bisher kein Festmedium mit ähnlich hohen Regenerationsraten gefunden werden.

Für die Kultur auf flüssigem Medium wurden in jedem Fall Petrischalen von 3,5 cm Durchmesser verwendet, die 1,5 ml Medium enthielten, von den Festmedien wurden 15 ml in Petrischalen mit 6,5 cm Durchmesser abgefüllt. Die Arbeitszeit für das Aufsetzen der Antheren auf Flüssigmedium dürfte etwas niedriger liegen, weil hier die Antheren zusammen auf das Medium gelangen, während sie auf dem Festmedium möglichst gleichmäßig verteilt werden. Auch beim Umsetzen der Kalli und Embryonen vom Flüssigmedium ist der Arbeitsaufwand geringer, weil die Strukturen mit einer Pipette zusammen abgesaugt und übertragen werden können. Aus der Tabelle 3 läßt sich in etwa der relative Kostenaufwand für die im eigenen Labor entwickelte Technik ablesen. Unter den angegebenen Bedingungen sollte man in der Antherenkultur der Wintergerste Medium 7 mit der folgenden Zusammensetzung den Vorzug geben:

NH_4NO_3 165 mg; KNO_3 1900 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg; KH_2PO_4 170 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16,9 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,6 mg; H_3BO_3 6,2 mg; KJ 0,82 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mg; $\text{FeNa}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 40 mg; Thiamin-HCl 0,4 mg; Myo-Inositol 100 mg; NES 2,0 mg; BAP 1 mg; Maltose 60 000 mg; Gerstenstärke 40 000 mg; Gelrite 3000 mg.

Für Weizen sollten Flüssigmedien mit 100 g/l Ficoll und 90 g/l Maltose verwendet werden, wobei durch eine Erhöhung der Anzahl Antheren/Petrischale die Kosten noch etwas reduziert werden können.

Diskussion

In der Antherenkultur der Gerste wurde durch HUNTER (1987) Saccharose im Induktionsmedium mit Erfolg durch Maltose ersetzt.

Zahlreiche Untersuchungen über den Einfluß der Kohlenstoffquelle sowohl im flüssigen als auch im festen Medium bestätigen seine Ergebnisse, die zunächst mit den hochgewebekulturtauglichen Sorten 'Igri' und 'Sarbalis' erzielt wurden (FINNIE et al., 1989; CAI et al., 1992). ROBERTS-OEHLSCLAGER et al. (1990) führen die positive Wirkung von Maltose auf den gegenüber Saccharose verzögerten Abbau zurück. Als Abbauprodukt von Saccharose übt Fruktose eine hemmende Wirkung auf die Mikrosporenenentwicklung aus. Die positive Wirkung von Maltose konnte in den vorliegenden Versuchen weitgehend bestätigt werden, jedoch scheint die Wirkung noch durch den Zusatz von Gerstenstärke im Medium (KUHLMANN und FOROUGH-WEHR et al., 1989) verstärkt zu werden. Stärke wird ebenfalls über Amylose und Amylopektin zu Glukose und Maltose abgebaut.

KA● (1981) hat Ficoll in einem Flüssigmedium für die Gerstenantherenkultur verwendet. Die jungen Gerstenanthe-

ren schwimmen normalerweise auf einem flüssigen Medium, sie platzen vielfach auf, entlassen ihre Mikrosporen ins Medium, die dann auf den Grund der Petrischale absinken. Das gleiche geschieht mit entstehendem Kallus oder Embryonen. Unter Luftabschluß entwickeln sich die meisten dieser Strukturen nicht weiter. Ficoll erhöht die Viskosität des Mediums, so daß die Antheren sich nicht öffnen, die Mikrosporen teilen sich zunächst innerhalb der Anthere und werden erst als mehrzellige Strukturen ins Medium entlassen, wo sie sich an der Oberfläche zu Kalli oder Embryonen entwickeln. Das umgebende Mikroklima – genügend Gasaustausch, jedoch Verhindern des Austrocknens – ist entscheidend für die Entwicklung. Das hier entwickelte Festmedium hat die gleichen Vorteile wie ein Ficoll-haltiges Medium, es hat eine feuchte Oberfläche, durch langsamen enzymatischen Abbau der Stärke werden darüber hinaus Glukose und Maltose verfügbar. Bei allen untersuchten F_1 -Kreuzungen war das Festmedium mit einem Gelrite-Stärke-Gemisch dem Medium mit Ficoll überlegen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Antherenkultur der Weizensorte Pavon 76 erzielt, hier konnte Ficoll durch Maisstärke ersetzt werden (SIMONSON und BAENZIGER, 1992).

Die Wechselwirkung zwischen Genotypen und den verschiedenen Einflußgrößen für den Regenerationserfolg der Mikrosporen bei Weizen ist von LAZAR et al. (1990) intensiv untersucht worden. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß einzelne Genotypen auf gleiche Kulturbedingungen unterschiedlich reagieren und daß dieser Einfluß bei Genotypen mit schlechter Gewebekulturtauglichkeit besonders deutlich ist. Ein Phänomen, das sich wohl ganz allgemein mit der Plastizität einer Sorte erklären läßt. Was für Sorten gilt, muß natürlich erst recht auf eine heterogene F_2 -Mikrosporenpopulation zutreffen, die in praktischen Züchtungsprogrammen verwendet wird. So können die Untersuchungen vor allem dazu beitragen, die In-vitro-Reaktion der Mikrosporen generell zu verbessern.

Der positive Einfluß des Kartoffelextraktmediums ist ebenfalls in mehreren vergleichenden Untersuchungen mit synthetischen Medien bestätigt worden (FADEL und WENZEL, 1990; ZIEGLER et al., 1990; CATTANEO und QIAO, 1991; PAUK et al., 1991). In den Untersuchungen von SCHUMANN und HOFFMANN (1989) war jedoch nur bei der hochgewebekulturtauglichen Sorte 'Centurk' das Kartoffelextraktmedium dem N6-Medium (CHU, 1978) überlegen. Die eigenen Untersuchungsergebnisse mit Flüssigmedien mit 100 g/l Ficoll bestätigen diese Ergebnisse. Wirkungen, die von einzelnen Medienkomponenten ausgehen, modifizieren den Genotypeneffekt. Es bestehen also Interaktionen zwischen Genotypen und Umweltfaktoren, vor allem den Anzuchtbedingungen der Spenderpflanzen und den Kulturbedingungen in vitro. Auch die hier dargestellten Ergebnisse können deshalb nur Richtwerte sein, die Adaption der Methode muß unter den gegebenen Bedingungen erfolgen.

Ploidieuntersuchungen an den grünen Regeneraten erlauben die sichere Trennung von haploiden und während der In-vitro-Phase spontan verdoppelten diploiden Pflanzen. Die Haploiden sind steril, und ihr Genom muß durch Colchizinbehandlung verdoppelt werden. Bisher erfolgte die Colchizinierung an Pflanzen im Stadium 21–29 im Gewächshaus. Die DH-Weizenpflanzen aus unterschiedlichen Kreuzungen wurden im 1–2-Blatt-Stadium in vitro einer Colchizinbehandlung ausgesetzt. Die Aufdoppelungsrate lag mit 70–100 % zwar etwas unter der bei der herkömmlichen Methode erzielten, jedoch entfällt die Ploidiebestimmung, und die notwendige Colchizindosis kann reduziert werden. In den DH-Nachkommen fand

sich keine Erhöhung der Pflanzenzahl mit gestörter Meiose oder mit morphologischen Abweichungen.

Mit der hier dargestellten Methodik konnten in einem Zuchtprogramm mit rekurrenter Selektion und wiederholten Haploidschritten (FÖRÖUGHİ-WEHR und WENZEL, 1990) Virusresistenzen aus japanischen Sommergersten mit vertretbarem Aufwand in drei Jahren in deutsche Wintergersten eingelagert werden. Die Ausbeute ist auch beim Weizen groß genug, um genügend doppelhaploide Linien für eine erfolgreiche Selektion auf praktische Zuchtziele zu erzeugen.

Danksagung

Für die exakte praktische Durchführung der Versuche möchte ich mich bei Frau R. STEIN bedanken. Bei der statistischen Auswertung hat Dipl.-Ing. S. ZÜCHNER entscheidend geholfen.

Literatur

- ANONYMOUS, 1976: A sharp increase of the frequency of pollen plant induction in wheat with potato medium. *Acta Genet. Sin.* **3**, 30–31.
- BALL, S. T., H. ZHOU and C. F. KONZAK, 1992: Sucrose concentration and its relationship to anther culture in wheat. *Crop Sci.* **32**, 149–154.
- BARNABAS, B. and G. KOVACS, 1990: Comparison of different methods for production of dihaploid plants from *T. aestivum* L. anther cultures. Abstracts VII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture; Amsterdam. A7–9; p. 194.
- CAI, Q., I. SZAREJKO, K. POŁOK and M. MALUSZYNSKI, 1992: The effect of sugars and growth regulators on embryoid formation and plant regeneration from barley anther culture. *Plant Breed.* **109**, 218–226.
- CATANEO, M. and Y. M. QIAO, 1991: Anther culture in Italian wheat cultivars and F₁ hybrids: Genotype and culture medium effects on callus development and plantlet regeneration. *J. Genet. and Breed.* **45**, 197–206.
- CHU, C. C., R. D. HILL and A. L. BRULE-BABEL, 1990: High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Sci.* **66**, 255–262.
- CHUANG, C. C., J. OUYANG, H. CHIA, S. M. CHOU and C. K. CHING, 1978: A set of potato media for wheat anther culture. in: Proc. China-Australian Plant Tissue Cult. Symp., Peking, 51–66.
- DE BUYSER, J. and Y. HENRY, 1980: Comparaison de différents milieux utilisés en culture d'anthers in vitro chez le blé tendre. *Can. J. Botan.* **58**, 997–1000.
- FADEL, F. and G. WENZEL, 1990: Medium-genotype-interaction on androgenetic haploid production in wheat. *Plant Breed.* **105**, 278–282.
- FINNIE, S. J., W. POWELL and A. F. DYER, 1989: The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breed.* **103**, 110–118.
- FÖRÖUGHİ-WEHR, B. and W. FRIEDT, 1984: Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. *Theor. Appl. Genet.* **67**, 377–382.
- FÖRÖUGHİ-WEHR, B. and G. WENZEL, 1990: Recurrent selection alternating with haploid steps – a rapid procedure for combining agronomic traits in inbreeders. *Theor. Appl. Genet.* **80**, 564–568.
- HAN-MIN, Y., V. D. KEPPEPPE, P. S. BAENZIGER, T. BERKE and G. H. LIANG, 1990: Effect of genotype and medium on wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **21**, 253–258.
- HASSAWI, D. S., J. QI and G. LIANG, 1990: Effects of growth regulators and genotype on production of wheat and triticale polyhaploids from anther culture. *Plant Breed.* **104**, 40–45.
- HUNTER, C. P., 1987: Plant generation method. European Patent Application Nr. 87200773.7. Publication nr. 0245898 A23, 1–8.
- KAO, K. N., M. SALEEM, S. ABRAMS, D. PEDRAS, D. HORN and C. MALLARD, 1991: Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Plant Cell Rep.* **9**, 595–601.
- KAO, K. N., 1981: Plant formation from barley anther cultures with ficoll media. *Z. Pflanzenphysiol.* **103**, 437–443.
- KNUDSEN, S., I. K. DUE and S. B. ANDERSEN, 1989: Components of response in barley anther culture. *Plant Breed.* **103**, 241–246.
- KUHLMANN, U. and B. FÖRÖUGHİ-WEHR, 1989: Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. *Plant Cell Rep.* **8**, 78–81.
- LAST, D. I. and R. I. BRETTELL, 1990: Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep.* **9**, 14–16.
- LAZAR, M. D., G. W. SCHAEFFER and P. S. BAENZIGER, 1990: The effects of interactions of culture environment with genotype on wheat (*Triticum aestivum*) anther culture response. *Plant Cell Rep.* **8**, 525–529.
- LUCKETT, D. J., S. VENKATANAGAPPA, N. L. DARVEY and R. A. SMITHARD, 1991: Anther culture of Australian wheat germplasm using modified C17 medium and membrane rafts. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**, 357–367.
- ORCHINSKY, B. R., L. J. MCGREGOR, G. I. E. JOHNSON, P. HUCL and K. K. KARTHA, 1990: Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Rep.* **9**, 365–369.
- PAUK, J., O. MANNINEN, S. MATTILA, Y. SALO, S. PULLI, 1991: Androgenesis in hexaploid spring wheat F₂-populations and their parents using a multiple-step regeneration system. *Plant Breed.* **107**, 18–27.
- PICCIRILLI, M. and S. ARCIONI, 1991: Haploid plants regenerated via anther culture in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Kock). *Plant Cell Rep.* **10**, 273–276.
- ROBERTS-OEHLISCHLAGER, S. L., J. M. DUNWELL and R. FAULKS, 1990: Changes in sugar content of barley anthers during culture on different carbohydrates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **22**, 77–85.
- SCHUMANN, G. and B. HOFFMANN, 1989: Some pros and cons in using potato extract medium in anther culture of Triticale and wheat. *Arch. f. Züchtungsforsch.* **19**, 21–27.
- SIMONSON, R. L. and P. S. BAENZIGER, 1992: The effect of gelling agents on wheat anther and immature embryo culture. *Plant Breed.* **109**, 211–217.
- SORVARI, S., 1986: Comparison of anther cultures of barley cultivars in barley-starch and agar gelatinized media. *An. Agr. Fennicae* **25**, 249–354.
- SORVARI, S. and O. SCHIEDER, 1987: Influence of sucrose and melibiose on barley anther cultures in starch media. *Z. Pflanzenzüchtg.* **99**, 164–171.
- ZHOU, H., Y. ZHENG and C. F. KONZAK, 1991: Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Rep.* **10**, 63–66.
- ZIEGLER, G., K. DESSLER and D. HESS, 1990: Investigation on the anther culturability of four spring wheat cultivars and the influence of light on regeneration of green vs. albino plants. *Plant Breed.* **105**, 40–46.