

Ein neuer Fortschritt in der Erzeugung von Pflanzen aus isolierten Brokkoli-Mikrosporen (*Brassica oleracea* var. *italica* L.)

WANG HUAI-MING *), GUNDA MIX-WAGNER und ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR

Institut für Pflanzenbau

Einleitung

Die Techniken zur isolierten Mikrosporenkultur werden bei vielen Arten zur Erzeugung von haploiden Pflanzen eingesetzt (Wei et al., 1986; Coumans et al. 1989). In der Gattung *Brassica* berichtete Lichter (1982) als erster von isolierten Mikrosporenkulturen.

Dieses Kultursystem hat gegenüber der Antherenkultur viele Vorteile (Keller et al. 1983). Die Produktion von Embryonen liegt deutlich höher als bei der Antherenkultur und durch die Einzelzellkultur läßt sich die Pollen-Antheren Interaktion wesentlich einschränken und damit ist das System zur Selektion von Mutanten ausgezeichnet geeignet (Polsoni et al. 1987).

Eine erfolgreiche Pflanzenregeneration aus isolierten Mikrosporen wird von *Brassica napus* L. berichtet (Siebel et al. 1989). Diese haploiden Pflanzen finden bereits in der Züchtung ihren Einsatz.

Andere *Brassica* Spezies wurden bisher nur begrenzt bearbeitet, aber erste Erfolge zeichnen sich z.B. bei *Brassica campestris* ab (Sato et al. 1989; Baillie et al. 1992).

In der vorliegenden Arbeit werden neue Fortschritte diskutiert, die zu einer effizienten und zuverlässigen Mikrosporenkulturmethode bei Brokkoli führen sollen.

Material und Methoden

Die Versuche wurden mit der Brokkolisorte "Green Charger" (GC) durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde 1989 in vitro genommen und bei 10°C in einem 16h- Tag gelagert. Von diesen Pflanzen erfolgte eine Antherenkultur. Die hierbei gewonnenen Embryoide entwickelten sich 1991 zu ganzen Pflanzen. Diese Pflanzen wurden über den Winter in vitro gelagert und im Frühling vermehrt und ins Freiland gepflanzt. Sechs dieser Pflanzen dienten den Sommer über als Spenderpflanzen für Mikrosporen.

Am Morgen erfolgte das Abschneiden der Knospen mit Stiel, die in Wasser gelegt wurden. Zur Vorbehandlung wurden die Knospen für 6 Stunden bei 10°C in Licht gestellt. Danach erfolgte die Desinfektion der Knospen in 75 %igen Alkohol für 1 min. und in 3 %iger Calciumhypochloridlösung für 20 min. und anschließend dreimaligen Spülen mit sterilem dest. Wasser.

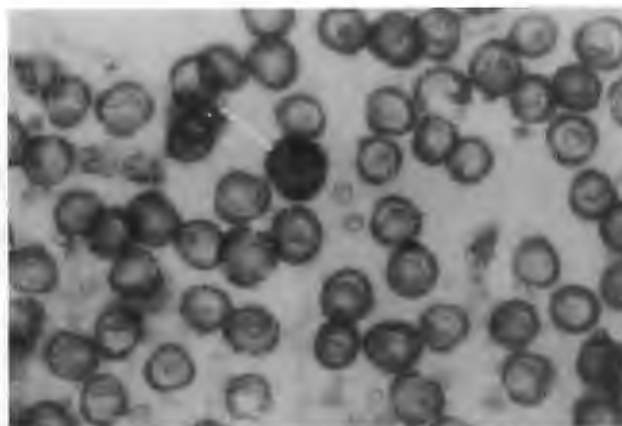
Unter dem Stereomikroskop erfolgte die Auswahl der Antheren, deren Mikrosporen in Kultur genommen werden sollten. Die Antheren sollten zwei bis dreimal länger als die Blütenblätter und lichtgelb sein. In dieser Entwicklungsphase sind die Mikrosporen in den Antheren im Einkernstadium.

Zur Isolierung der Mikrosporen wurden die Antheren von 50 Knospen mit einem Pistill in einem 50 ml Becher mit 5 ml B513- Nährlösung (a, siehe Tabelle1) zerrieben. Diese Mischung von zerriebenden Antheren und Nährlösung (a) wurde durch ein 45 µm Netz aus Nirostastahl in ein 10 ml großes Zentrifugenglas filtriert. Dann folgte das Zentrifugieren (100 x g für 3 min.) des Filtrates. Die klare Lösung wurde ab-

Tabelle 1: Zusammensetzung der embryo induzierenden Nährböden/Composition of the embryo inducing media

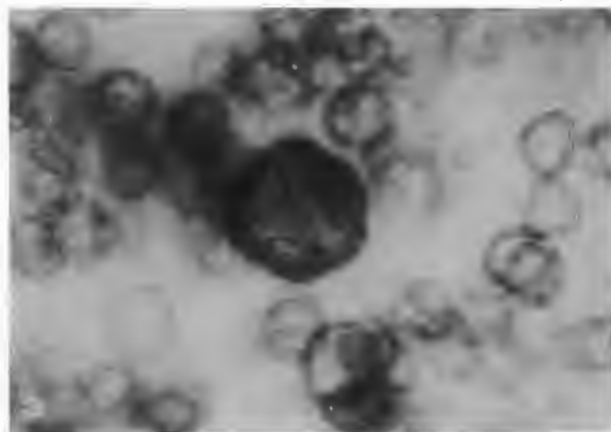
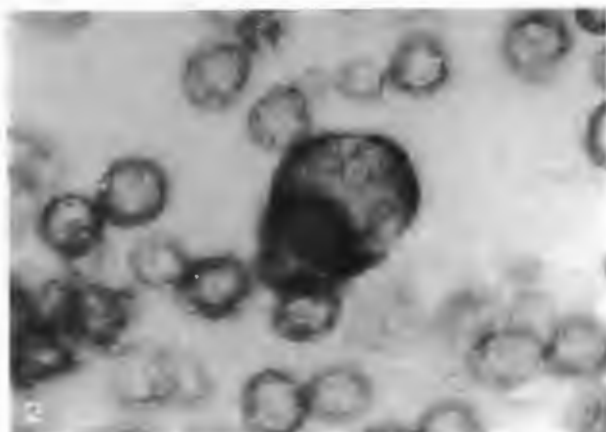
Media	Zusammensetzung *)
(a) B513	B5 Grundmedium; 13 % Saccharose
(b) B10	modif. B5 Grundmedium; 0,5 mg 2,4D; 1,0 mg NES; 0,5 mg BAP; 0,5 mg Kin.; 0,5 mg GA3; 10 % Saccharose pH 6,5
(c) B10a	wie B10, pH 5,8
(d) Agarose	flüssiges Medium (b) oder (c); 1 % Agarose
*) Angaben in mg/l	

Abbildung 1: Frisch isolierte Mikrosporen (x500)



*) Diese Arbeit wurde während eines Studienaufenthaltes von Prof. Wang Hui-Ming im Rahmen der "Deutsch-chinesischen Zusammenarbeit im Bereich der Agrarforschung" angefertigt.

Abbildungen 2 und 3: **Eine geschwollene Mikrospore (x500)**



gesaugt und mit B513-Nährlösung (a) wieder auf 10 ml aufgefüllt und zentrifugiert. Das Zentrifugieren erfolgte in dreimaliger Wiederholung. Nach dem Waschen wurden die reinen Mikrosporen noch einmal in 3 ml flüssiger B510- oder B10a-Nährlösung (b oder c, siehe Tab.1) suspendiert. Die Mikrosporen mit der Nährlösung wurden in Plastikpetrischalen (Durchmesser 3 cm) getropft. Die Tropfen hatten einen Durchmesser von ca. 5 mm. Die Agarose mit Nährlösung (d) wurde erwärmt und ein Tropfen jedem Mikrosporentropfen seitlich zugespritzt. Zur schnellen Erstarrung der Agarose mit Mikrosporen standen diese auf einer kalten Eisenplatte. Nach ca. 10 min. wurden 2-3 ml flüssige B10- oder B10a-Nährlösung (b oder c) neben die Agarosetropfen getropft (Wang et al 1990). Alle Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und in Dunkelheit bei 33°C für einen Tag und weitere 10 Tage bei 25°C behandelt. Die anschließende Kultivierung der Mikrosporen erfolgte bei 25°C unter Licht.

Abbildung 4: **Auf dem Agarosetropfen sich entwickelnder Embryoid (x30)**



Nach einem Monat wurden die gebildeten Embryoide auf einen festen Nährboden übertragen. Dieser Nährboden bestand aus dem B5 Grundnährboden ohne Hormone und 2 % Saccharose.

Ergebnisse und Diskussion

Für die Bestimmung der Chromosomenzahl der regenerierten Pflanzen aus Embryoideen kamen die Pflanzen für 6 Stunden in einen Raum mit 10°C. Anschließend wurden die Wurzelspitzen abgeschnitten und in eine Fixierlösung (95 % Alkohol: Eisessig, 3:1) gelegt. Nach Hydrolysierung der Wurzelspitzen erfolgte die Färbung in einem Tropfen Carbofuchsin.

10-15 Tage nach Kulturbeginn zeigten einige Mikrosporen leichte Schwellungen (Abbildungen 1 und 2) und erste Zellteilungen (Abbildung 3). Die Zellen sind reich an Plasma und haben eine runde Form. Diese Zellen teilten sich und mehrzellige Kluster wurden beobachtet. Nach etwa 20 Tagen konnten die ersten Proembryoide erkannt werden. Innerhalb eines Monats entwickelten sich aus Mikrosporen gut strukturierte Embryoide (Abbildung 4). Sie besaßen verschiedene Formen: herz-, ball-, torpedo- und kotyledonenförmig (Abbildungen 5; 6; 7; 8). Es zeigten sich auch abnormale Formen (Abbildungen 9; 10). Die gut gefomten Embryoide wurden

Abbildung 5 - 7: **Einzelne sich entwickelnde Embryoide (x40)**

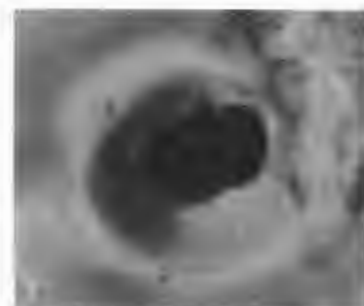


Abbildung 8: Ein kugelförmiger Embryoid (x40)

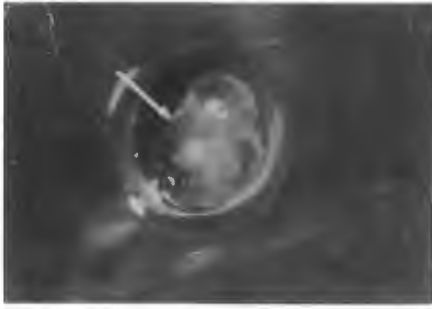


Abbildung 9: Ein polypolarer Embryoid (x40)

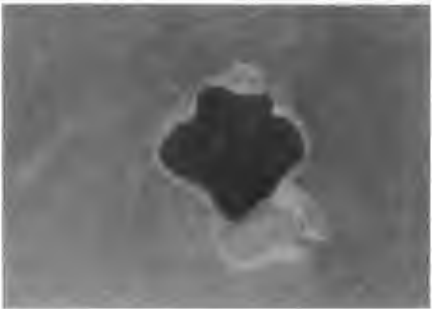
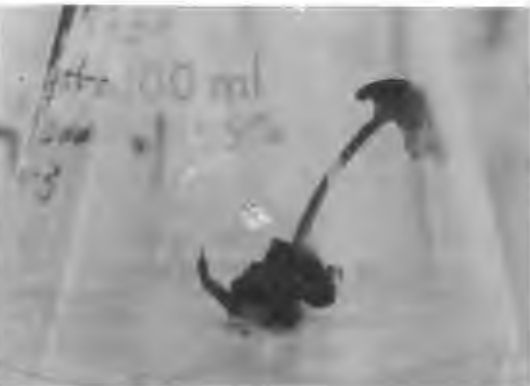


Abbildung 10: Ein abnormaler Embryoid (x40)



1992 an Brokkoliantherenkulturen gemacht hat, überein. Bei den Antherenkulturen war der Einsatz der Nährböden, der

Abbildung 11: Eine haploide Pflanze entwickelt aus einer Mikrosspore



auf den B5-Nährboden ohne Hormone aufgelegt und ein Großteil wuchs in 6-8 Wochen zu ganzen Pflanzen heran (Abbildungen 11; 12).

Bei den Untersuchungen der Chromosomenanzahl in den Wurzelspitzenzellen konnte festgestellt werden, daß 50 % der Pflanzen haploid ($n=9$) waren.

In diesem Experiment war die Anzahl der sich zu Embryoiden entwickelnden Mikrosporen noch sehr gering. In 12 Petrischalen, in denen die Mikrosporen aus 50 Knospen ange-setzt wurden, wurden insgesamt 15 Embryoide induziert, von denen sich 6 Embryoide zu ganzen Pflanzen entwickelten.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen, die Wang et al.

Vorbehandlung sowie das Pflanzenmaterial das Gleiche wie bei den Mikrosporenkulturen. Daraus läßt sich schließen, daß bei der Antheren- sowie Mikrosporenkultur ähnliche Mechanismen ablaufen, die ähnliche oder gleiche Bedingungen verlangen.

In einer beachtlichen Anzahl von Veröffentlichungen (Keller et al. 1975; Chuong et al. 1985; Baillie et al. 1992) wird darauf hingewiesen, daß die Aufwuchsbedingungen der Spenderpflanzen einen entscheidenden Einfluß auf den Erfolg der Antheren- und Mikrosporenkultur haben. Ebenfalls von großem Einfluß sind die Bedingungen während der Kulturzeit. Gland und Mitarbeiter (1988) beobachteten bei Raps, daß eine Vorbehandlung mit niedriger Temperatur und einer längeren Tageslänge die Erzeugung von Embryoïden in einer Mikrosporenkultur nennenswert erhöhen können.

Die durchgeführten Experimente können diese Ergebnisse bestätigen, denn bei sonst gleichen Vorgaben konnten nur bei einer zusätzlichen Kältevorbehandlung ($10^{\circ}\text{C}/6\text{h}$) aus Mikrosporen Embryoïde erhalten werden. Dieses Ergebnis und die Beobachtungen in der Literatur (Dunwell et al. 1985) lassen den Schluß zu, daß eine Vorbehandlung mit niedriger Temperatur für eine isolierte Mikrosporenkultur notwendig ist.

Eine allgemeine Erfahrung in der Gewebekultur ist, daß schon einmal in vitro regeneriertes Material zu besseren Regenerationsergebnissen führt, da eine "Gewegekulturtauglichkeit" in dem Material angenommen wird (Robertson et al. 1986).

Aus diesem Grunde wurden als Mikrosporensenderpflanzen im Jahr 1992, Pflanzen eingesetzt, die aus Kotyledonen, Hypokotyl und Knospen regeneriert, vermehrt und in vitro gelagert (bei $7-10^{\circ}\text{C}$) wurden, bevor sie ins Feld gepflanzt und dort als Spenderpflanzen dienten.

Es deutet alles darauf hin, daß die Spenderpflanzen, die sich aus Embryoïden in der Antherenkultur entwickelt haben, eine potentielle Fähigkeit zur Embryogenese in der Mikrosporenkultur zeigen.

Zusammenfassung

Knospen der Sorte "Green Charger" wurden am Morgen abgeschnitten und für 6 h in 10°C gestellt. Die Isolation der Mikrosporen erfolgte in zwei verschiedenen Nährlösungen, die auch zur Kultur der Mikrosporen in Agarosetropfen dienten.

Abbildung 12: Eine in Vermiculite wachsende haploide Brokkolipflanze



Die Petrischalen mit den Mikrosporentropfen wurden für einen Tag bei 33°C und 10 Tage bei 25°C kultiviert, bevor sie in Licht und 25°C überführt wurden. Nach 3-4 Wochen konnten die ersten Embryoide unterschiedlichster Form beobachtet werden. Sie wurden dann auf einen B5-Nährboden ohne Hormone aber mit 20g/l Saccharose versetzt überführt. Nach 4-6 Wochen entwickelten sie sich zu kompletten Pflanzen.

In 50 % der entwickelten Pflanzen konnten n=9 Chromosomen in den Zellen ihrer Wurzelspitzen gezählt werden.

A new progress in the production of plants from isolated microspores of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.)

Buds of the cultivar "Green Charger" were cut off in the morning and kept at 10°C for 6 hrs. Microspores were isolated in two different nutrient media. These media were also used for the culture of microspores in droplets of agarose. The petri dishes were cultured 1 day at 33°C and 10 days at 25°C in the dark and were then further cultured in the light (16 hrs). After 3-4 weeks first embryoids could be observed which differed in structure. They were transferred to B5 medium containing no hormones but 20g/l of sucrose. They developed into intact plants after 4-6 weeks. Chromosome numbers were counted in the root tips. 50 % of the plants were haploid (n=9).

Literatur

Baillie, A.M.R., Epp, D.J., Hutcheson, D. and Keller, W. A.: In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. - Plant cell Reports 11 (1992), S. 234-237.

Chuong, P.V. and Beversdorf, W.D.: High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. - Plant Science 39 (1987), S. 219-226.

Coumans, M.P., Sohota, S. and Swanson, E.B.: Plant development from isolated microspores of *Zea mays* L. - Plant Cell Reports 7 (1989), S. 618-622.

Dunwell, J.M., Cornish, M. and de Courcel, A.G.L.: Influence of genotype, plant growth temperature and anther incubation temperature on microspore embryo production in *Brassica napu* ssp. *oleifera*. - J. of Exp. Botany 36 (1985), S. 679-689.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. - Experimental Cell Research 50 (1968), S. 151-158.

Gland, A., Lichter, R. and Schweiger, H.-G.: Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L.. - J. Plant Physiol. 132 (1988), S. 613-617.

Keller, W.A., Rajhathy, T. and Lacapra, J.: In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. - Can. J. Genet. 17 (1975), S. 655-666.

Keller, W.A. and Armstrong, K.C.: Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *italica*. - Euphytica 32 (1983), S. 151-159.

Lichter, R.: Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. - Z. Pflanzenphysiol. 105 (1982), S. 427-434.

Polsoni, L., Kott, L.S. and Beversdorf, W.D.: Large scale microspore culture technique for mutation selection studies in *Brassica napus* L.. - Can. J. Bot. 66 (1987), S. 1681-1685.

Robertson, D. and Earle, E.D.: Plant regeneration from leaf protoplasts of *Brassica oleracea* var. *italica* cv Green Comet broccoli. - Plant Cell Reports 5 (1986), S. 61-64.

Sato, T., Nishio, T. and Hirai, M.: Plant regeneration from isolated microspore cultures of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). - Plant Cell Reports 8 (1989), S. 486-488.

Siebel, J. and Pauls, K.P.: Comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. - Theor. Appl. Genet. 78 (1989), S. 473-479.

Wang, H.-M., Schäfer-Menuhr, A.: Isolation und Kultur von Blattprotoplasten von Brokkoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). - Landbauforschung Völkenrode 40 (1990), S. 257-260.

Wang, H.-M., Mix-Wagner, G. und Yang, Y.-L.: The embryogenesis in anther and isolated pollen culture of brokkoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). - Acta Agriculturae Boreali-Sinica 7 (1992), S. 61-67.

Wei, Z.M. and Harada, H.: Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* 'Sabarlis'. - Theor. Appl. Genet. 72 (1986), S. 252-255.

Verfasser: Mix-Wagner, Gunda, Dr. agr., Schäfer-Menuhr, Angelika, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. agr. M. Dambroth; Wang, Huai-Ming, Prof., Beijing Vegetable Research Centre, 100081 Beijing/VR China.