

Regeneration von bakterienfreien Brokkolipflanzen (*Brassica oleracea var. italica*) durch in vitro Knospenkultur

GUNDA MIX-WAGNER und WANG HUAI-MING*

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Viele Kohlarten wurden bisher vegetativ vermehrt. Zur Hybridsaatgutherstellung braucht man Tausende von Klonteilen pro Elternlinie, und diese lassen sich kaum mehr auf dem konventionellen Weg der Stecklingsvermehrung produzieren. Hierbei finden die in vitro Vermehrungstechniken ihren Einsatz.

Johnson und Mitchell hatten schon 1977 versucht aus verschiedenen Gewebeteilen (z.B. Hypokotyl, Stengel und Blattrippen) Brokkolipflanzen zu regenerieren. Hui und Ze e (1980) konnten durch Zusatz von Ginseng zum Nährboden die Sproßbildung auf Hypokotyl- und Kotyledonensegmenten stark erhöhen.

Die Explantatgröße scheint neben dem exogen zugeführten Hormonen einen entscheidenden Einfluß auf die Überlebens- und Differenzierungsrate, wie Lazzeri und Dunwell (1986a, b) berichteten, zu haben.

Schon Anderson und Carstens hatten 1977 Brokkoliknospen, da diese in großer Zahl pro Pflanze zur Verfügung stehen, in Kultur genommen. Ihnen gelang es durchschnittlich 3,4 Pflanzen pro Knospe in der ersten Entwicklungsphase zu regenerieren.

1988 veröffentlichte Wang seine ersten Ergebnisse. Er versuchte an verschiedenen Pflanzenteilen, unter anderem auch an Knospen, eine Sproßdifferenzierung zu induzieren. Die Sproßbildungsrate der zwei getesteten Sorten lag wie bei Anderson et al. (1977) jedoch auch nur bei 3 Pfl./Knospe. Eine eindeutig höhere Sproßregeneration konnten Dunemann und Grunewaldt (1987) unter ihren gewählten Kulturbedingungen bei der Sorte "Prominence" erreichen.

Dietert et al. (1982) wiesen in ihrer Veröffentlichung darauf hin, daß die Fähigkeit aus verschiedenen Explantaten Kallus zu bilden sehr stark innerhalb und zwischen den *Brassica species* schwankt.

Damit wurde aufgezeigt, daß die hohe Vermehrungsrate einer Sorte oder eines Genotyps nicht ohne weiteres von einem anderen Genotyp erwartet werden kann. Vor allem dann nicht, wenn die Produktion von vielen Pflanzen für die Hybridzüchtung gesichert sein soll.

Aus diesem Grund stellt die vorliegende Arbeit, die im Rahmen der "Deutsch-chinesischen Zusammenarbeit im Bereich der Agrarforschung" durchgeführt wurde, Ergebnisse

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

vor, die an acht verschiedenen Brokkolisorten erarbeitet wurden.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen zur Regeneration von Pflanzen aus Knospen erfolgte an acht verschiedenen Brokkolisorten. Die acht Sorten waren: Atlantik, Corvet, Futura, Green Viliant, Juwaprim, Neptune, Skiff und Sparko.

Im Gewächshaus erfolgte die Anzucht der Explantatspenderpflanzen bei einer Tag/Nachttemperatur von 22°C/15°C und 16 h Licht.

Knospen

Die Knospen wurden bei einer Größen von 1,5-3 mm abgenommen. Die anschließende Desinfektion fand für 20 min in einer 2%igen Calciumhypochloridlösung, die als Benetzungsmittel einige Tropfen Tween 80 enthielt, statt. Es folgte ein mehrfaches Spülen mit keimfreiem Wasser. Während der 20minütigen Desinfektionszeit wurden die Proben geschüttelt. Die Knospen wurden dann senkrecht mit dem Stiel in die Nährböden gesteckt.

Kulturbedingungen und Auswertung

Alle verwendeten Nährböden enthielten die Makro- und Mikronährstoffe nach Murashige und Skoog (MS) (1962). Die neun getesteten Nährböden enthielten folgende Komponenten: Auxin: Indolylessigsäure (IES); Cytokinine: 6-Benzylaminopurin (BAP), 2-Isopentenyladenin (2ip), 6-Furfurylaminopurin (Kinetin). Zwei Nährböden (B5, B6) wurde Adeninsulfat und drei Nährböden (B1, B3, B6,) Natriumdihydrogenphosphat zugesetzt. Alle Nährböden enthielten 7g/l Agar, 0,1 mg/l Thiamin HCl und 20g/l Saccharose.

Dem Nährboden B3 wurden noch zusätzlich verschiedene Stärken (Mais, Kartoffel, Reis, Weizen) und Aktivkohle zugesetzt (Tab.1). Diese Versuche wurden mit den Knospen der Sorte "Atlantik" durchgeführt.

Die Kultur der Knospen erfolgte bei 23°C bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h.

Nach vier Kulturwochen wurde die Anzahl regenerierender Knospen, die Zahl der Sproßanlagen und Sprosse pro Knospe und die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierender Knospe ermittelt. Aufgrund der Schwierigkeiten einer exakten Ermittlung der Anzahl von Sproßanlagen wurden diese in Gruppen von <5, >5 und >20 Sproßanlagen eingeteilt.

Tabelle 1: Sproßinduzierende Nährböden/Shoot inducing media

		Nährböden								
		B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉
BAP	*	1,0	1,0	4,0	4,0	-	-	-	4,0	4,0
2ip	*	-	-	4,0	4,0	-	4,0	4,0	4,0	-
IES	*	10,0	10,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0
Kinetin	*	10,0	10,0	-	-	4,0	-	-	-	-
Adeninsulfat	*	-	-	-	-	80,0	80,0	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	*	170,0	-	170,0	-	-	170,0	-	-	-
<u>Stärkezusätze:</u>										
Mais	-	Stärke "C"	60 g x l ⁻¹	Aktiv Kohle "AK"						
Kartoffel	-	Stärke "P"	60 g x l ⁻¹	4 g x l ⁻¹						
Reis	-	Stärke "R"	60 g x l ⁻¹							
Weizen	-	Stärke "W"	60 g x l ⁻¹	* mg x l ⁻¹						

Die Anzahl der Sprosse pro regenerierender Knospe bezieht sich auf Sprosse, die sich im 1-2-Blattstadium befanden. Nach der Bestimmung der Sproßanzahl wurden diese auf einen wurzelinduzierenden Nährboden (R) übertragen. Dieser Nährboden enthielt folgende Komponenten pro Liter: MS-Makro- und Mikronährstoffe, 0,1 mg Indolylessigsäure, 0,1 mg 3-Aminopyridin, 10 g Saccharose und 7 g Agar.

Die Bewurzelung der Sprosse erfolgte unter den gleichen Umweltbedingungen wie die Sproßregeneration.

Vorbehandlung der Knospen

Ein Teil der Knospen der Sorten "Futura" und "Atlantik" wurden bevor sie auf den B₃ Nährboden aufgelegt wurden unterschiedlich vorbehandelt. In Tabelle 5 sind die Temperaturbehandlungen zusammengestellt.

Bakterientest

Vor dem Umsetzen der Sprosse auf den wurzelinduzierenden Nährboden (R) wurden allen Sprossen zwei Blätter entnommen und diese in einer Standard I-Nährbouillon (Diagnostica Merck 7882) für eine Woche bei Raumtemperatur kultiviert. Nach einer Woche hatte sich die Nährbouillon bei den Proben getrübt, deren Blätter bzw. Sprosse mit endogenen Bakterien infiziert waren. Diese Sprosse wurden ausgesiekt und so von der weiteren Bewurzelungsphase ausgeschlossen.

Tabelle 2: Die Regenerationsfähigkeit der Knospen auf acht Nährböden/The regeneration ability of the buds on eight media

Sorten	% regenerierende Knospen auf den Nährböden								
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉
Futura	83,2	61,3	89,7	52,0	12,3	30,7	24,7	9,4	21,3
Green Viliant	28,3	67,1	46,3	76,7	3,5	37,1	24,4	17,8	29,7
Skiff	48,9	44,2	55,1	51,6	10,4	27,5	26,3	12,6	28,6
Neptune	38,4	30,2	49,8	38,8	8,4	19,9	25,0	2,5	16,8
Juwaprim	20,4	45,1	30,2	44,2	6,8	28,4	21,3	11,3	17,1
Corvet	15,0	17,8	25,9	27,2	3,3	22,6	11,7	8,6	14,7
Sparko	22,8	12,4	28,7	25,0	2,8	17,2	10,4	9,8	18,4
Atlantik	4,0	28,5	7,4	8,7	2,4	22,8	3,5	2,6	4,0

ten deutlich geringer, insbesondere dann, wenn sie noch mit den Sorten "Green Vilient", "Juwaprim", "Corvet" und "Atlantik" verglichen werden, die auf eine zusätzliche Gabe von Natriumdihydrogenphosphat negativ reagierten. Vielleicht spiegelt das unterschiedliche Verhalten der getesteten Sorten einen Unterschied in der Verträglichkeit gegenüber Natrium wider.

Die höchsten Regenerationsraten waren auf dem Nährboden B4, der BAP, Zip und IES als Hormone enthielt, zu beobachten. Wurden die beiden Cytokinine BAP und Zip durch Kinetin (B5) ersetzt, sank bei allen Sorten die Sproßregeneration sehr stark ab. Auf das Fehlen des Auxins (IES) im Nährboden (B8) reagierten alle Sorten mit einer stark reduzierten Sproßbildung. Das Angebot von BAP oder Zip in den Nährböden (B9 bzw. B7) hatte auf die Regenerationsfähigkeit einen ähnlichen Einfluß. Aus den Ergebnissen der getesteten Nährböden ließ sich schließen, daß durch eine Kombination von zwei Cytokinen und einem Auxin ein relativ hoher Anteil von sproßregenerierenden Knospen bei allen Sorten zu erwarten wäre. Der starke Unterschied im Regenerationsvermögen der einzelnen Sorten darf nicht außer acht gelassen werden. Die Unterschiede im Regenerationsvermögen der Sorten können bis zu 79,2% ("Futura" und "Atlantik" auf B2) betragen.

Auf den neun getesteten Nährböden war bei keiner Sorte eine Kallusbildung an den Knospenstielen zu beobachten. Bei einigen Sorten war eine mehr oder weniger starke Schwarzfärbung der Knospenstiele zu erkennen. Es betraf jeweils den Teil des Stieles, der im Nährboden steckte. Dunemann et al. (1987) berichteten ebenfalls von dieser Beobachtung. Die mikroskopischen Untersuchungen des Stengelgewebes hatten ergeben, daß es sich um Ablagerungen in den interzellulären Räumen der oberen Zellschicht handelte.

Alle Knospen, unterhalb der Größe von 3 mm, waren fähig, Sprosse ohne eine Kallusphase zu regenerieren. Diese Ergebnisse stimmen nur zum Teil mit denen von Dunemann und Mitarbeiter (1987) überein. Ihre Kulturen ganzer Knospen führten fast ausschließlich über eine Kallusphase zur Sproßbildung. Die Kultur von Knospen > 3 mm führte ausschließlich zur Bildung von Schoten unabhängig von der Sorte und dem Nährboden. Zu starker Schotenbildung neigten die Sorten "Neptune" und "Sparko". Selten trat bei > 3 mm langen "Green Vilient"-Knospen Schotenbildung auf. Der Zusatz von Aktivkohle zum Nährboden, der auf die Regenerationsfähigkeit keinen Einfluß hatte, zeigte aber eine stark fördernde Wirkung auf die Schotenentwicklung.

Die Anzahl der Sprosse und Sproßanlagen pro Knospe variierte von Sorte zu Sorte sehr stark. Wie Tabelle 3 zeigt, mußten die bonitierten Sproßanlagen in Gruppen eingeteilt werden, da es sehr schwierig war bei stark regenerierenden Knospen die genaue Anzahl der Sprosse zu ermitteln. Bei sechs Sorten betrug die Sproßanlagen zwischen 1 bis in einzelnen Fällen weit über 60. Nur bei den Sorten "Corvet" und "Atlantik" hatte keine Knospe über 20 Sproßanlagen. Die Tabelle 3 gibt ebenfalls die mittlere Anzahl der Sprosse pro regenerierender Knospe der acht Sorten wieder (Spalte 4). "Green Vilient" und "Futura" zeigten hier die höchsten Werte 16,7 bzw. 12,3 Sprosse pro regenerierender Knospen. Die Sorte "Atlantik" lag bei 1,9. Diese Werte repräsentieren nur die Anzahl der Sprosse, die sich im 1-2-Blattstadium befanden nicht aber die noch dazu vorhandenen Sproßanlagen.

Die Spalte 5 der Tabelle 3 gibt die mittlere Anzahl der Sprosse pro kultivierter Knospen wieder. Die Sorten "Futura" und "Green Vilient" zeigten auch hier, bezogen auf die Gesamtzahl kultivierter Knospen, das beste Regenerationsvermögen. Bei "Sparko" einer nicht gut regenerierenden Sorte sowie bei "Neptune" war zu beobachten, daß nur wenige Knospen sehr hohe Regenerationsraten zeigten. Von großen Schwankungen der Sproßanzahl pro Explantat innerhalb und zwischen den sechs getesteten Zuchtlinien berichteten auch Anderson und Mitarbeiter 1977. Das Regenerationsvermögen der "Atlantik"-Knospen war nicht nur gering in bezug auf die Anzahl der Sprosse pro regenerierender Knospe, sondern auch in bezug auf die Gesamtanzahl der aufgelegten Knospen.

Den stark schwankenden Anteil regenerierender Explantate innerhalb einer Sorte oder eines Genotyps führten Dunemann und Mitarbeiter (1987) auf den nicht identischen physiologischen Zustand der Explantatspenderpflanze beim Zeitpunkt der Entnahme zurück.

Bei der Sorte, die am schlechtesten regenerierte ("Atlantik"), wurde versucht durch weitere Zusätze zum Nährboden, die Sproßbildung doch noch anzuheben. Die verschiedenen Stärkezusätze (Tab.1) zeigten sehr unterschiedliche Wirkungen auf die Sproßbildung der "Atlantik"-Knospen (Tab.4). Der Zusatz von Kartoffelstärke "P" bzw. Reisstärke "R" zum B3 Nährboden erhöhte die Regenerationsrate auf 63,2% bzw. auf 62,5%. Die gleiche Erhöhung konnte auch durch eine 24stündige Behandlung der Knospen bei 30°C erzielt werden. Der Einfluß der Stärken "P" und "R" führte auch zu einer Anhebung auf 4,1 der mittleren Anzahl Sprosse pro kultivierter Knospen. Weiterhin zu beobachten war der Anstieg auf 41,1%

Tabelle 3: Sproßregeneration/Shoot regeneration

	% Knospen mit Sproßanlagen			mittl. Anzahl Sprosse/regen. Knospen	mittl. Anzahl Sprosse/kult. Knospen
	1-5	> 5	> 20		
Futura	8,3	69,0	22,7	12,3	4,9
Green Vilient	2,3	77,3	20,4	16,7	3,8
Skiff	38,5	59,6	1,9	7,4	2,1
Neptune	21,7	76,1	2,2	10,2	2,9
Juwaprim	28,0	69,1	2,9	6,3	1,6
Corvet	89,1	10,9		3,6	1,0
Sparko	10,2	67,5	22,3	10,0	3,7
Atlantik	88,0	12,0		1,9	0,2

Tabelle 4: **Einfluß verschiedener Stärken auf die Sproßentwicklung bei "Atlantik"-Knospen/Influence of different starches on the shoot development of "Atlantik" buds**

Stärke		% regenerierender Knospen	mittl. Anzahl Sprosse pro regen. Knospen
Mais	"C"	41,1	1,7
Kartoffel	"P"	63,2	4,1
Weizen	"W"	25,0	1,1
Reis	"R"	62,5	4,1

sproßregenerierender Knospen bei Zusatz von Maisstärke "C", wobei die mittlere Sproßanzahl kultivierter Knospen nicht sehr wesentlich anstieg (1,7). Auch durch Weizenstärke "W" konnte verglichen mit B3 ohne Zusatz (Tab.2) eine Zunahme der Sproßbildung auf 25,2% beobachtet werden, jedoch blieb auch hier die mittlere Anzahl Sprosse kultivierter Knospen vergleichbar niedrig (1,1) wie bei "C" auf 1,7. Ähnlich lag der Wert (1,1) auch bei der 30°C Behandlung der Knospen für 48 h (Tab. 5).

Die Ergebnisse haben ganz deutlich aufzeigen können, daß durch verschiedene Zusätze zum Nährboden und einer Vorbehandlung der Explantate (siehe "Vorbehandlung der Knospen") auch "schlecht" regenerierende Genotypen auf eine höhere Regenerationsrate kommen könnten.

Bakterientest

Alle Sprosse, aus Knospen regeneriert, waren nicht generell bakterienfrei. Bei Vorversuchen hatte sich herausgestellt, daß bis zu 25%, dieser Wert schwankte von Sorte zu Sorte, der regenerierten Sprosse, endogene Bakterien aufwiesen. Diese fingen an zu wachsen, nachdem sie auf den wurzelinduzierenden Nährboden überführt worden waren. Dunemann et al.(1987) berichteten bei der Sorte "Prominence" von einzelnen Kontaminationen durch endogene Bakterien, die nach dem Zerschneiden auftraten. Dieses würde den hier berichteten Ergebnissen entsprechen, da von den acht Sorten einige kaum und andere bis zu 25% endogene Bakterien enthielten.

Um eine Selektion der bakterienfreien Sprosse vor dem Umsetzen zu ermöglichen, wurden Blätter jedes Sprosses in einer Nährbouillon kultiviert. Nach einer Woche waren die bakterieninfizierten Blätter bzw. Sprosse leicht anhand der Trübung der Nährbouillon auszuwählen. Die dann weiter-

kultivierten Sprosse waren zu 100% frei von endogenen Bakterien.

Bewurzelung

Nachdem die sehr unterschiedlich großen Sprosse auf ihren Gehalt an endogenen Bakterien getestet und kontaminierte ausgesiebt wurden, erfolgte das Umsetzen auf den wurzelinduzierenden Nährboden (R). Auf dem R-Nährboden bildeten alle Sprosse Wurzeln. Dunemann und Mitarbeiter (1987) erreichten auf einem hormonfreien Nährboden eine Bewurzelungsrate der "Prominence"-Sprosse von 90%. Wang berichtete 1988, daß die Bewurzelungsrate der regenerierten Sprosse zweier Sorten in Vermiculite 74-98% betragen.

Auf dem R-Nährboden war nach 1-2 Wochen bei einigen Sorten, bei denen die Trennung der Sprosse besonders schwierig war, eine weitere Sproßbildung ohne Wurzeln zu beobachten. Bei mikroskopischen Untersuchungen der Sprosse, an deren Ende sich die Wurzeln bilden sollten, ließen sich winzig kleine Sproßanlagen erkennen, die sich dann, weniger unterdrückt als in den Knospen, zu neuen Sprossen entwickelten.

Vorbehandlung der Knospen

Das Regenerationsvermögen der einzelnen Sorten war sehr unterschiedlich, wie die Ergebnisse deutlich aufzeigen konnten (Tab.2+3). Es wurde deshalb versucht, die Regenerationsfähigkeit durch zusätzliche Vorbehandlung der Knospen positiv zu beeinflussen (Tab.5). Die Regenerationsrate der Sorte "Futura" konnte nur unwesentlich durch die Temperaturbehandlung gesteigert werden. Bei der 30°C Behandlung mit

Tabelle 5: **Einfluß der Temperatur und der Behandlungsdauer auf das Regenerationsvermögen (%) der Knospen zweier Sorten/Influence of the duration of the temperature treatment on the regeneration ability (%) of the buds of two varieties**

Behandlung	"Futura"		"Atlantik"	
	% Knospen m. Sproßanlagen	mittl. Anzahl Sprosse pro regen. Knospen	% Knospen m. Sproßanlagen	mittl. Anzahl Sprosse pro regen. Knospen
4 °C	24 h	87,2	13,3	2,3
	48 h	90,3	15,8	2,9
30 °C	24 h	83,1	12,0	3,9
	48 h	43,1	5,2	1,1

48stündiger Dauer mußte sogar eine starke Abnahme der Sproßbildung auf 43,1% verzeichnet werden.

Bei 4°C (48 h) steigerte sich die Regenerationsrate der "Atlantik" Knospen auf 48,7%, gleichzeitig nahm die Anzahl der Sprosse (1-2 Blattstadium) pro sproßregenerierender Knospen von 1,9 (Tab.3) auf 2,9 (Tab.5) zu. Einen noch größeren Einfluß auf das Regenerationsvermögen der Knospen hatte eine 24stündige Behandlung bei 30°C. Nach dieser Behandlung reagierten 64,8% der Knospen mit Sproßbildung, gleichzeitig nahm auch die Sproßanzahl pro regenerierender Knospen von 2,9 (4°C/48 h) auf 3,9 zu. Die lange Behandlung (48 h) mit einer hohen Temperatur (30°C) verursachte bei beiden Sorten ein starkes Absinken der Sproßbildung. Die Knospen trockneten bei dieser Temperatur sehr schnell auf dem Nährboden aus und konnten sich dann unter den Kulturbedingungen (23°C) nicht mehr erholen.

Übertragung in Erde

In Erde wurden nur Sprosse mit gut ausgebildeten Wurzeln überführt, von denen sich 60-80% zu kräftigen Pflanzen entwickelten. Bei der Überführung der in vitro Pflanzen in Erde zeigten die Sorten Unterschiede in ihrem Verhalten. Die Pflanzen aus den Knospen der Sorte "Atlantik" mit einem geringen Regenerationsvermögen überlebten die Überführung in Erde am besten (80%), wogegen die Sorte "Futura" eine geringere Überlebensrate (60,3%) zeigte.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen zur Regeneration von Pflanzen aus ganzen Knospen wurden mit acht Brokkolisorten durchgeführt.

Die Knospen der acht Sorten zeigten ein Sproßregenerationsvermögen mit sehr unterschiedlicher Intensität (89,7% "Futura", 2,4% "Atlantik").

Die Sproßentwicklung setzte bei den gut regenerierenden Sorten wie "Futura" und "Green Viliant" nach 5 und bei den schlecht regenerierenden Sorten nach 7-8 Kulturtagen ein.

Die höchsten Regenerationsraten waren auf den Nährböden, die BAP, 2ip und IES als Hormone enthielten, zu beobachten. Wurden die beiden Cytokinine BAP und 2ip durch Kinetin ersetzt, sank bei allen Knospen der Sorten die Sproßregeneration sehr stark ab.

Der Zusatz verschiedener Stärken zum Nährboden brachte bei der Sorte "Atlantik" eine Steigerung der Regenerationsrate von 7,4 auf 62,5% und der mittleren Sproßanzahl pro regenerierender Knospen von 1,9 auf 4,1%.

Die Temperaturbehandlung (4°C, 30°C) der Knospen für 24 h bzw. 48 h hatte bei der Sorte "Futura" nur einen unwesentlichen Einfluß auf die Sproßregeneration, wenn man von der 30°C-Behandlung für 48 h absieht. Bei der Sorte "Atlantik" konnte jedoch durch die 4°C-Behandlung der Knospen die Sproßbildung von 7,4 auf 48,7% gesteigert werden. Die lange Behandlung (48 h) bei einer hohen Temperatur von 30°C verursachte bei beiden Sorten ein starkes Absinken des Sproßbildungsvermögens.

Nach dem Bakterientest war es möglich, nur bakterienfreies Material zur Bewurzelung einzusetzen.

Zur Überführung der Pflanzen in Erde wurden nur Sprosse mit gut entwickelten Wurzeln verwendet. Die Überlebensrate lag zwischen 60% ("Futura") und 80% ("Atlantik").

The regeneration of bacteria-free broccoli plants via bud culture and their storage in vitro

The investigation of the regeneration of plants from whole buds were carried out with eight varieties of broccoli.

The buds of all eight varieties showed very different abilities to regenerating shoots (89,7% "Futura", 2,4% "Atlantik"). The development of shoots started already after 5 days of culture when varieties were used which regenerated well (such as "Futura" or "Green Viliant"), but it took as long as 7-8 days when varieties were used which regenerated badly (such as "Atlantik" or "Sparko").

The highest rates of regeneration were observed with culture media containing the hormones BAP, 2ip and IES.

When both the cytokinines were replaced by Kinetin, the rate of shoot regeneration of all varieties dropped distinctly.

When different starches were added to the culture media, the regeneration rates of the variety "Atlantic" increased from 7.4% to 62.5% and the average number of shoots per regenerated bud from 1.9% to 4.1%.

Treatment of buds at 4°C and 30°C for 24 and 48 hrs had only an insignificant effect on the regeneration rate of shoots of the variety "Futura" with the one exception when the buds were kept at 30°C for a full 48 hrs.

With the variety "Atlantik", however, the production of shoots increased from 7.4 to 48.7% at a temperature of 4°C. The long treatment at the higher temperature of 30°C caused a considerable drop of the ability to produce shoots.

Because of the bacteria test, it was possible to select bacteria-free shoots and use only those shoots for root induction. The survival rate ranged from 60% "Futura" to 80% "Atlantik".

Literatur

Anderson, W.C. and Carstens, J.B.: Tissue Culture Propagation of Broccoli, *Brassica oleracea* (Italica Group), for Use in F1 Hybrid Seed Production. - In: J. Amer. Soc. Hort. Sci 102 (1977), S.69-73.

Dietert, M.F.; Barron, S.A. and Yoder, O.C.: Effects of genotype on in vitro culture in the genus *Brassica*. - In: Plant Sci. Letters 26 (1982), S. 233-240.

Dunemann, F. und Grunewaldt, J.: In vitro Massenvermehrung von *Brassica oleracea*-Varietäten. - In: Gartenbauwissenschaften 52 (1987), S. 249-254.

Hui, L.H. and Zee, S.-Y.: The effect of Ginseng on the plantlets regeneration % of cotyledon and hypocotyl explants of broccoli. - In: Z. f.Pflanzenphysiologie 96 (1980), S. 297-302.

Johnson, B.B.H. and Mitchell, E.D.: In vitro propagation of broccoli from stem, leaf and leaf rib explants. - In: Hort.Sci. 13 (1978), S. 246-247.

Lazzeri, P.A. and Dunwell, J.M.: In vitro regeneration from seedling organs of *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck cv. Green Comet. I. Effect of plant growth regulators. - In: Annals of Botany 58 (1986), S. 689-697.

Lazzeri, P.A. and Dunwell, J.M.: In vitro regeneration from seedling organs of *Brassica oleracea var. italica* Plenck cv. Green Comet. II. Effect of light conditions and explant size. - In: Annals of Botany 58 (1986), S. 699-710.

Murashige, T. and Skoog, F.J. : A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. - In: Physiologica Plantarum 15 (1962), S. 473-497.

Wang, H.M.: The propagation and Morphogenesis in vitro of Broccoli. - In: Acta Horticulture Sinica 15 (1988), S. 252-258.

Verfasser: Mix-Wagner, Gunda, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. agr. M. Dambroth; Wang, Huai-Ming, Prof., Beijing Vegetable Reseach Centre, Beijing, Volksrepublik China.