

Schlussbericht

der Forschungsstelle(n)

Nr. 1, Georg-August-Universität Göttingen, DNPW

zu dem über die



im Rahmen des Programms zur
Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)

vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

geförderten Vorhaben **16095 N (ÖE134/09)**

Optimierung der Haploidentechnik beim Winterraps zur Züchtung leistungsfähiger Sorten

(Bewilligungszeitraum: 01.06.2009 - 31.12.2012)

der AiF-Forschungsvereinigung

Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V.

Göttingen, 27. März 2013

Ort, Datum

Dr. Christian Möllers

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)
an der/den Forschungsstelle(n)

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Technologie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Zusammenfassung

Durch die *in vitro* Kultivierung von unreifen Pollenkörnern unter geeigneten Bedingungen können beim Raps aus den sogenannten Mikrosporen in einer Generation vollständig homozygote Pflanzen erhalten werden, die für die Züchtung neuer Winterrapsorten eine erhebliche Bedeutung haben. Das Verfahren ist so interessant, dass es schon seit geraumer Zeit von allen in diesem Bereich tätigen Züchtungsfirmen bei einem Teil ihres Zuchtprogramms angewendet wird. Eine Ausdehnung auf das gesamte Zuchtprogramm wäre wünschenswert. Dies wird jedoch gegenwärtig noch durch einige methodische Engpässe erschwert. Als solche wurden identifiziert: I. eine häufig nur unzureichende direkte Regeneration von Pflanzen aus Mikrosporenembryonen, II. eine nicht ausreichende Diploidisierung regenerierter Pflanzen nach Behandlung der Mikrosporen mit Mitosehemmstoffen sowie III. eine mangelnde Lagerfähigkeit von Embryonen, um eine termingerechte direkte Auspflanzung im Herbst ins Feld zu ermöglichen. Als Projektziele wurden entsprechend definiert: I. die Verbesserung der direkten Sprossregeneration aus Mikrosporenembryonen, II. die Optimierung der Diploidisierung durch Behandlung von Mikrosporen mit verschiedenen Mitosehemmstoffen in unterschiedlicher Konzentration und Kombination und III. die Entwicklung eines „Dry Artificial Seed“-Systems zur Lagerung und effizienten Handhabung einer großen Zahl an Mikrosporenembryonen für die termingerechte Regeneration von Pflanzen zur direkten Auspflanzung ins Feld.

Die direkte Pflanzenregeneration aus Mikrosporenembryonen konnte erheblich verbessert werden durch die Kombination eines geeigneten Kulturmediums (Gamborg's B5-Medium mit 0,1 mg/L GA3) in Verbindung mit einer vierzehntägigen Inkubation der Embryonen bei 1,5 bis 4 °C und anschließenden Weiterkultivierung im Kulturraum bei 20 bis 25 °C. Dabei konnte der positive Effekt der Kältebehandlung bei allen geprüften Genotypen festgestellt werden und das Merkmal direkte Sprossregeneration wies mit 0,99 eine sehr hohe Heritabilität auf.

Der Anteil diploider Embryonen an den insgesamt regenerierten Embryonen konnte durch Behandlung von Mikrosporen mit verschiedenen Mitosehemmstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen und in Kombination miteinander nicht über das bisher erreichte Maß hinaus verbessert werden. Genotypische Unterschiede in der spontanen und durch Mitosehemmstoffe induzierter Diploidisierung konnten nachgewiesen werden und das Merkmal induzierte Diploidisierung wies in verschiedenen Versuchen eine mit 0,82 bis 0,94 hohe Heritabilität auf. Die für das Merkmal direkte Pflanzenregeneration und induzierte Diploidisierung festgestellte hohe Heritabilität weist darauf hin, dass bei intensiver Anwendung der DH-Technik in der Rapszüchtung langfristig mit einer genetischen Verbesserung dieser Merkmale gerechnet werden kann.

In Rahmen der an der Forschungsstelle durchgeführten Versuche zur Entwicklung eines „Dry Artificial Seed“-Systems konnte eine erfolgreiche Trocknung und Lagerung von Mikrosporenembryonen mit anschließender Revitalisierung und Regeneration von Pflanzen nicht erreicht werden. Parallel dazu bei einem an dem Projekt beteiligten Pilotunternehmen durchgeführte Versuche verliefen dagegen erfolgreich. Als kritisch für eine Lagerung mit anschließender Regeneration erwies sich die besonders schonende Trocknung von Mikrosporenembryonen bei Temperaturen von etwa 4 °C. Nach 6 monatiger Lagerung konnten noch aus etwa 20% der Embryonen Pflanzen regeneriert werden.

Die Ziele des Vorhabens wurden teilweise erreicht.

1 Ausgangssituation

Der Anbau und die wirtschaftliche Bedeutung von Winterraps (*Brassica napus* L.) hat in den vergangenen Jahren in Deutschland erheblich zugenommen (siehe www.ufop.de). Dies ist vor allem auf die gestiegene Nachfrage nach Rapsöl für eine Verwendung als nachwachsender Rohstoff, vor allem Biodiesel, zurückzuführen. Inzwischen wird Winterraps auf etwa 1,4 Millionen Hektar angebaut und wird von den Landwirten in einer häufig getreidebetonten Fruchtfolge sehr geschätzt. Die in Deutschland für den Anbau zugelassenen Winterrapsorten werden überwiegend von in Deutschland ansässigen Unternehmen gezüchtet. Im Anbau befinden sich inzwischen überwiegend Hybridsorten. Die Züchtung dieser Sorten erfordert die Herstellung von Inzuchtlinien, die durch wiederholte kontrollierte Selbstbestäubung von Kreuzungspflanzen und deren Nachkommen oder aber über die *in vitro* Kultur von unreifen Pollenkörnern dieser Kreuzungspflanzen, sogenannten Mikrosporen, erfolgen kann. Aus den Mikrosporen lassen sich in einer Generation und in kurzer Zeit vollständig homozygote, doppelthaploide (DH) Pflanzen regenerieren. Diese vollständig homozygoten Pflanzen haben für die privatwirtschaftliche Pflanzenzüchtung eine enorme Bedeutung. Die Vorteile der Anwendung der DH-Technik im Vergleich zur sogenannten Stammbaummethode liegen vor allem in der unmittelbar verfügbaren vollständigen Homozygotie des Materials, welches eine effektivere Selektion ermöglicht sowie in der Einsparung von bis zu 2 Jahren bis zur Anmeldung von Sortenkandidaten zur Wertprüfung beim Bundessortenamt (Paulmann und Frauen 1991, Möllers 1998).

Auf Grund der offensichtlichen Vorteile der DH-Technik wird diese seit den bahnbrechenden Arbeiten von Lichter (1982) von allen in Deutschland ansässigen Pflanzenzüchtungsunternehmen in der Züchtung von Winterrapsorten angewendet. Allerdings setzen die Unternehmen die DH-Technik nur bei etwa 30% ihrer insgesamt jährlich durchgeführten Kreuzungen ein (Möllers 2006). Dies ist im wesentlichen darauf zurückzuführen, dass die *in vitro* Erzeugung von DH-Linien beim Raps nach wie vor sehr aufwändig und kostenintensiv und der Erfolg nicht immer vorhersehbar ist. Während die Regeneration von Embryonen aus Mikrosporen in der Regel zufriedenstellend verläuft, gibt es im weiteren Verlauf vor allem folgende Probleme:

- I. Die Regeneration von Pflanzen aus Mikrosporenembryonen gelingt häufig nur unzureichend bzw. gestaltet sich aufwändig, da eine sehr viel größere Zahl an Embryonen *in vitro* mehrfach subkultiviert werden muss, bevor genügend Pflanzen in ausreichender Qualität für den Transfer ins Gewächshaus zur Verfügung stehen.
- II. Der Erfolg der Diploidisierung regenerierter haploider Pflanzen durch Colchizinbehandlung ist in Abhängigkeit vom Zuchtmaterial häufig nicht ausreichend, was zu Verzögerungen und zu einem erheblichen Verlust an Pflanzenmaterial führt.
- III. Die Regeneration von Embryonen und Pflanzen im Labor lässt sich für einen Großteil des Materials nicht so koordinieren, dass eine direkte Auspflanzung im Herbst ins Feld erfolgen kann; dieses erfordert eine kostenintensive Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus und führt auf Grund der begrenzt verfügbaren Gewächshausfläche zu einer drastischen Limitierung in der Zahl bearbeitbarer Pflanzen

2 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

Die oben genannten Probleme führen zu einem erhöhten Arbeits- und Kostenaufwand bei der Herstellung der DH-Linien und begrenzen daher den Einsatz in der Sortenzüchtung beim Winterraps. Jegliche Verbesserung des Verfahrens der DH-Linienproduktion führt zu einer Effizienzsteigerung und zu einer Kostenreduktion, welche den Züchtungsfortschritt beschleunigen und insbesondere die Konkurrenzfähigkeit der mittelständischen Pflanzenzüchtungsunternehmen stärken sollte. Die Wechselwirkungen zwischen Zuchtmaterial und den verschiedenen Faktoren, die den Erfolg der Mikrosporenkultur bestimmen, sind dabei derartig komplex, dass sich die in der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung (GFP e.V., Bonn) zusammengeschlossenen Rapszüchtungsunternehmen entschlossen haben, gemeinschaftliche Anstrengungen zur Verbesserung der DH-Technik zu unternehmen.

3 Forschungsziele und erreichte Ergebnisse

3.1 Forschungsziele

Das vorgeschlagene Projekt setzte sich zum Ziel in einem gemeinschaftlichen Ansatz in Zusammenarbeit zwischen der Abteilung Pflanzenzüchtung des Departments für Nutzpflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen und direkt in die Versuche eingebundener mittelständischer Pflanzenzüchtungsunternehmen die oben genannten Probleme zu lösen und damit den Weg für einen umfassenden Einsatz der DH-Technik in der Züchtung leistungsfähiger Winterrapsorten zu ebnet.

Konkrete Ziele des Projektvorschlages waren:

- I. Optimierung der direkten Regeneration von Pflanzen aus Mikrosporenembryonen beim Winterraps. Ermittlung des für die direkte Pflanzenentwicklung besten Entwicklungsstadiums der Embryonen in Abhängigkeit von Phytohormon-, Kälte- und Trockenstressbehandlung sowie vom Genotyp.
- II. Optimierung der Diploidisierung von Mikrosporen durch Behandlung mit unterschiedlichen Mitosehemmstoffen (Colchizin, APM, Trifluralin, Oryzalin und ggf. weiterer Substanzen). Ermittlung von optimaler Konzentration, Behandlungsdauer und Wirkstoffkombination sowie Berücksichtigung von genotypischen Unterschieden.
- III. Entwicklung eines „Dry Artificial Seed“-Systems zur effizienten Handhabung einer großen Zahl an Mikrosporenembryonen für die termingerechte Regeneration von Pflanzen zur Auspflanzung ins Feld (Herbst und ggf. Frühjahr). Ermittlung des für die Trocknung und Lagerung der Embryonen sowie der anschließenden Regeneration von Pflanzen optimalen Entwicklungsstadiums der Embryonen, in Abhängigkeit von der Osmolarität des Kulturmediums, der Behandlung der Embryonen mit Phytohormonen sowie einer unter kontrollierten Bedingungen durchgeführten Trocknung der Embryonen. Optimierung der Bedingungen für die direkte Regeneration von Pflanzen aus getrockneten Embryonen *in vitro* sowie *ex vitro*. Untersuchung der genotypischen Variabilität für die Eignung zur Herstellung getrockneter Embryonen.

Während der Optimierung und Entwicklung oben genannter Verfahren (I - III) sollte ein laufender Methodentransfer zu den Laboren der unmittelbar in die Versuche eingebundenen Pflanzenzüchtungsunternehmen der GFP e.V. erfolgen. Die bei diesen Unternehmen (KMU) durchgeführten Versuche sollten der Übertragung der optimierten Protokolle in die Praxis, deren Validierung und Untersuchung der Genotypabhängigkeit bei einem großen züchterisch relevanten Winterrapssortiment dienen.

3.2 Erreichte Ergebnisse

Optimierung der direkten Regeneration von Pflanzen aus Mikrosporenembryonen

Unter den getesteten Kulturmedien erwies sich Gamborg's B5-Medium mit 0,1 mg/L GA3 (Gamborg et al. 1968) als am besten geeignet, um eine möglichst hohe direkte Pflanzenregeneration zu erreichen. Weiterhin zeigte sich, dass eine vierzehntägige Inkubation der Embryonen unter kühlen Bedingungen bei 1.5 °bis 4 °C zu einer erheblich besseren direkten Pflanzenregeneration führte. Ein eindeutiger Einfluss einer Inkubation bei Dauerbeleuchtung oder im Dunkeln konnte nicht festgestellt werden. Genotypische Unterschiede waren hoch signifikant und es ergab sich eine Heritabilität von 0.99. Die Kombination Medium B5+0,1 mg/L GA3 in Verbindung mit einer vierzehntägigen Inkubation der Embryonen bei 1.5 °C im Dunkeln erwies sich am besten geeignet, um eine möglichst hohe direkte Pflanzenregeneration zu erzielen. Das Ziel, eine Verbesserung der direkten Pflanzenregeneration konnte damit erreicht werden.

Optimierung der Diploidisierung von Mikrosporen durch Behandlung mit unterschiedlichen Mitosehemmstoffen

Die Behandlung von frisch isolierten Mikrosporen mit Colchizin, Pronamid, und Amiprophosmethyl (APM) alleine und in Kombination miteinander in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlichen Inkubationszeiten führte zur Regeneration von 60 bis 70% diploiden Embryonen. Dies entspricht den bereits jetzt schon in der Praxis im Routineeinsatz erreichten Ergebnissen. Durch die Kombination verschiedener Antimitotika miteinander konnte kein höherer Anteil an diploiden Embryonen erreicht werden. Dies entspricht publizierten Ergebnissen beim Mais (Häntzschel und Weber 2010, Häntzschel 2011). Das Ziel, den Anteil diploider Embryonen und Pflanzen nach Behandlung von Mikrosporen mit Antimitotika zu erhöhen, wurde damit nicht erreicht. Gegebenenfalls könnte durch andere Antimitotika und in Verbindung mit anderen Inkubationsbedingungen (Phytohormone, Stress) eine Verbesserung der Ergebnisse erreicht werden (Häntzschel 2011, Lakshmanan et al. 2013). Obwohl ein Durchbruch im Hinblick auf dieses Projektziel nicht erreicht wurde, konnte in verschiedenen Laboren der Pflanzenzüchtungsunternehmen eine Verbesserung des jeweiligen Diploidisierungsprotokolls dadurch erreicht werden, dass Behandlungsdauer und Wirkstoffkonzentration optimiert wurden.

Entwicklung eines „Dry Artificial Seed“-Systems

Die an der Forschungsstelle durchgeführten Arbeiten zur Trocknung von Embryonen nach Anwendung verschiedener Trocknungsverfahren führten nach Lagerung der Embryonen in keinem Fall zu einer erfolgreichen Regeneration von Pflanzen. Die parallel dazu von einem an

dem Projekt beteiligten Pilotunternehmen durchgeführten Versuche zeigten, dass eine möglichst schonende Trocknung von Embryonen über einen längeren Zeitraum bei Temperaturen von 4 °C zur Gewinnung von lagerfähigen Embryonen führt, die auch nach 6 Monaten noch eine gewisse Regenerationsfähigkeit besitzen. Durch weitere Optimierung der Lagerbedingungen der Embryonen kann die Regenerationsfähigkeit sicherlich noch verbessert werden. Das Projektziel konnte somit durch die parallel durchgeführten Arbeiten des Pilotunternehmens erreicht werden.

Die Mitglieder der AiF-Forschungsvereinigung „Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V.“ wurden regelmäßig über die Ergebnisse der durchgeführten Forschungsarbeiten informiert. In bilateralen Informationsgesprächen mit Vertretern der Wirtschaft wurden firmenspezifische Probleme und entsprechende Anpassungsmaßnahmen z.T. vor Ort diskutiert. Die an der Forschungsstelle durchgeführten Arbeiten werden im Rahmen anderer Projekte fortgeführt und den Wirtschaftsunternehmen wird auf den regelmäßig stattfindenden Tagungen der Forschungsvereinigung über weitere Fortschritte in der Optimierung der DH-Technik berichtet werden.

3.3 Wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Nutzen der erreichten Ergebnisse insbesondere für KMU, innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten sowie Ergänzungen zu Transfermaßnahmen

Bei dem bearbeiteten Forschungsthema handelt es sich um eine Verbesserung eines bestehenden Verfahrens sowie um die Entwicklung eines neuen Verfahrens. Auf Grund der komplexen Wechselwirkungen verschiedener Einflussfaktoren auf die Diploidisierung von Mikrosporen, auf die direkte Pflanzenregeneration aus Embryonen sowie auf die Entwicklung des „Dry Artificial Seed“-Systems wurde ein gemeinschaftliches Vorgehen für notwendig erachtet, um für die Winterrapszüchtung möglichst allgemeingültige Ergebnisse und zuverlässige Arbeitsvorschriften zu erhalten. Das Ergebnis zur effizienten direkten Regeneration von Pflanzen aus Embryonen der Mikrosporenkultur kann so direkt von den Pflanzenzüchtungsunternehmen übernommen werden und damit zu einer Effizienzsteigerung in den jeweiligen Firmen beitragen. Bei den Diploidisierungsversuchen von Mikrosporen konnte zwar keine weitere Steigerung in der Diploidisierung erreicht werden, jedoch zeigten die Ergebnisse, dass 10-fach niedrigere Colchizinkonzentrationen als bisher häufig angewendet werden ausreichen, um eine Diploidisierung zu erreichen. Damit konnte ein Beitrag zur Reduktion der Kosten und des Toxizitäts- bzw. Entsorgungsproblems geleistet werden.

Bei den bilateral mit den beteiligten Wirtschaftsunternehmen geführten Beratungsgesprächen erwiesen sich die Probleme in der Anwendung der DH-Technik als weitaus komplexer als ursprünglich angenommen, da die räumlichen und technischen Gegebenheiten vor Ort (Gewächshäuser, Klimakammern, Laborausstattung, etc.) sowie die zeitliche Verfügbarkeit von technischem Personal erhebliche Unterschiede aufwiesen. Über die spezifischen Forschungsthemen hinaus konnten daher in den Gesprächen vor Ort Anregungen für eine firmenspezifische Optimierung gegeben werden.

3.1 Geplante spezifische Transfermaßnahmen während der Laufzeit des Vorhabens

Tab. 1: Während der Projektlaufzeit geplante und realisierte Transfermaßnahmen in die Wirtschaft

Zeitpunkt	Maßnahme/Rahmen	Ziel/Bemerkung
Nov. 2009	Treffen des projektbegleitenden Ausschusses	Abstimmung
Dez. 2009	Besuch des Gewebekulturlabors der KWS SAAT AG	Besprechung aktueller Probleme in der DH-Produktion, Abstimmung der Versuche
Feb./März 2010	Besuch weiterer deutscher Pflanzenzüchtungsunternehmen (Raps GbR, Dieckmann Seeds, Saaten-Union Biotec, NPZ, Syngenta)	Besprechung spezifischer Probleme vor Ort und Diskussion von Maßnahmen zur Abhilfe. Weiterbildung von Mitarbeitern von KMU ohne eigene Forschungskapazitäten
Mai 2010	Treffen des projektbegleitenden Ausschusses in Peine/Rosenthal	Bericht über durchgeführte Forschungsaktivitäten und Abstimmung des weiteren Vorgehens
13.-15. Sept. 2010	Teilnahme an der Tagung des Arbeitskreises Deutsche In-vitro-Kulturen (ADIVK) und der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie e.V. in Hannover	Bilaterale Besprechung mit Züchtern
Nov. 2010	Teilnahme an der Jahrestagung der GFP e.V. Abteilung Öl- und Eiweißpflanzen	Bilaterale Besprechung mit Pflanzenzüchtern über den jeweiligen aktuellen Stand der DH-Produktion
10.-11.02.2011	Besuch des Gewebekulturlabors der Limagrain GmbH in Rilland, Holland	Besprechung firmenspezifischer Probleme in der DH-Produktion und Besprechung von Konzepten zur Optimierung der DH-Produktion
24. und 25. Mai 2011	Treffen des projektbegleitenden Ausschusses in Göttingen	Bericht über durchgeführte Forschungsaktivitäten und Abstimmung des weiteren Vorgehens
6. -10. Juni 2011	Teilnahme am 13. Internationalen Rapskongress in Prag/Tschechien	Präsentation im Vorhaben bereits erzielter Ergebnisse
16. Juni 2011	Besprechung mit der Laborleitung der Dieckmann GmbH in Göttingen	Austausch von Erfahrungen und Besprechung weiterer Versuche
9. Nov. 2011	Teilnahme an der Jahrestagung der GFP e.V. Abteilung Öl- und Eiweißpflanzen	Bilaterale Besprechung mit Pflanzenzüchtern über den jeweiligen aktuellen Stand der DH-Produktion

5. - 6. Juni 2012	Treffen des projektbegleitenden Ausschusses in Rostock	Abschlusspräsentation und Diskussion aller erzielten Ergebnisse
----------------------	--	---

3.2 Erfolgte und geplante spezifische Transfermaßnahmen nach Beendigung des Vorhabens

Tab. 2: Geplante spezifische Transfermaßnahmen nach Beendigung des Projektes

Zeitpunkt	Maßnahme/Rahmen	Ziel/Bemerkung
8. Januar 2013	Besprechung in Göttingen mit Vertretern der Wirtschaft (Saaten-Union Biotec GmbH, Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG)	Abschlussbesprechung mit Frau Dr. Hönemann und Frau Mühlenbeck (Saaten-Union Biotec GmbH) und Frau Dr. Monika Zuba (NPZ Hans-Georg Lembke KG) in Göttingen
Sommer 2013	Veröffentlichung der Ergebnisse in Form einer Monographie (Dissertation) in frei zugänglicher Form im Internet (pdf-Dokument)	Ergebnistransfer in die Wirtschaft
Herbst 2013	Anfertigung eines Beitrages für eine Fachzeitschrift	Ergebnistransfer in die Wirtschaft
2013/2014	Präsentation/Vortrag auf einer Fachtagung	Ergebnistransfer in die Wirtschaft

4 Arbeitspakete

4.1 Optimierung der direkten Regeneration von Pflanzen aus Mikrosporenembryonen

Ziel der Versuche war es Kulturbedingungen zu identifizieren, die eine möglichst hohe direkte Pflanzenregeneration aus Mikrosporenembryonen in vitro erlaubt, damit diese ohne weiteren Zeitverlust und zusätzlichen Arbeitsaufwand direkt in Erde transferiert werden können

4.1.1 Ergebnisse

In dem ersten Versuch wurde der Einfluss von 10 verschiedenen Kulturmedien (Abb. 1) in Verbindung mit 3 verschiedenen Kulturbedingungen (Tab. 3) auf die direkte Pflanzenregeneration aus Mikrosporenembryonen von 5 verschiedenen Genotypen untersucht. Im Mittelwert über alle Kulturbedingungen konnten mit 43% die beste direkte Sprossregeneration auf dem Medium B5+0.1 mg/L GA3 (Gamborg et al. 1968) erzielt werden (Abb. 1). Dabei scheint der Zusatz von 0,1 mg/L Gibberellinsäure (GA3) entscheidend, da das gleiche Medium ohne GA3 eine deutlich schlechtere direkte Pflanzenregeneration ergab. Das sonst häufig verwendete MS-Medium führte zu einer geringeren direkten Pflanzenregeneration. Unter den Kulturbedingungen brachte eine vierzehntägige Inkubation bei 4 °C und Dauerbeleuchtung die beste direkte Sprossregeneration, gefolgt von der Inkubation bei 4 °C und 8 h Kurztagbeleuchtung. Die ge-

ringste Sprossregeneration konnte unter den bisher an der Forschungsstelle üblichen 26 °C und 12 h Beleuchtung erzielt werden. Die Inkubation der Kulturen bei 4 °C und Dauerbeleuchtung in Kombination mit dem Medium B5+0.1 mg/L GA3 lieferte über alle Genotypen die besten Ergebnisse (nicht dargestellt).

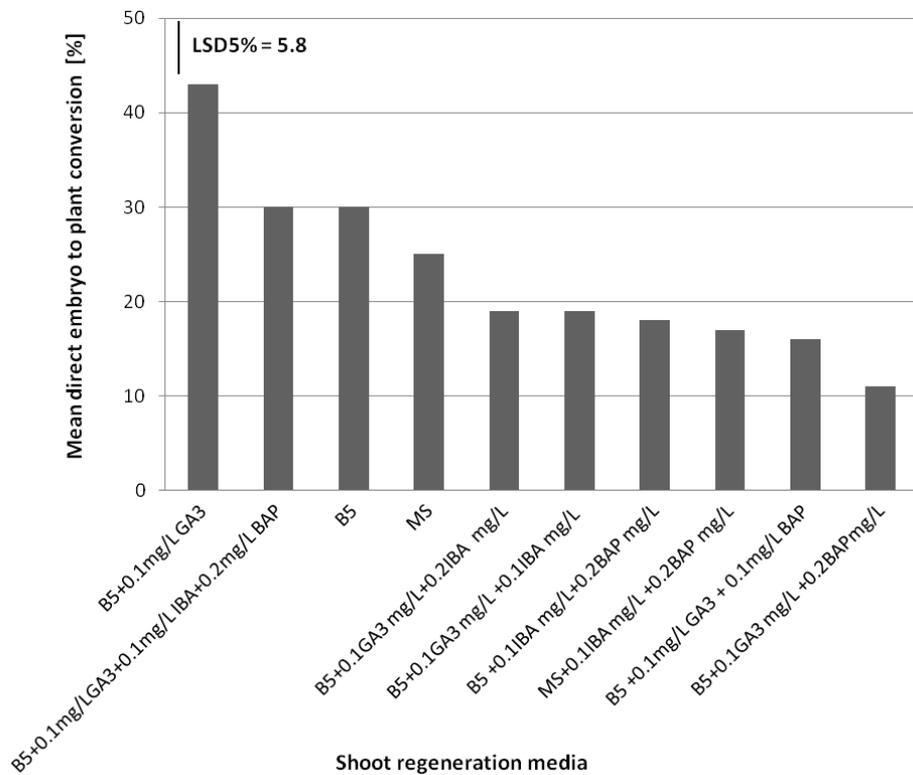


Abb. 1: Direkte Sprossregeneration aus Mikrosporenembryonen (%) nach Kultur auf 10 verschiedenen Kulturmedien. Dargestellt sind Mittelwerte über fünf Genotypen, 3 Kulturbedingungen und 3 Experimente.

Tab. 3: Direkte Sprossregeneration aus Mikrosporenembryonen (%) nach vierzehntägiger Inkubation unter drei verschiedenen Kulturbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte für 5 Genotypen über 10 verschiedene Kulturmedien und 3 Experimente.

Genotyp	Mittelwert	Direkte Sprossregeneration [%]		
		Kulturbedingung		
		KR 26 °C (12 h)	LT 4 °C (24 h)	LT 4 °C (8 h)
Krypton × DSV2	39,2	8,3	53,3	46,8
Krypton	32,5	27,1	36,7	33,8
Komando × Express	13,4	19,1	20,3	12,1
Oase × NK Beauty	17,2	7,9	13,7	18,7
Charly × Krypton	11,3	6,7	16,8	10,4
Mittelwert	22,8	13,8	28,2	24,4
LSD5% Genotyp (G)	4,9			
LSD5% Kulturbedingung (C)			2,9	
LSD5% G x C			5,6	

(KR) Kulturraum, (LT) Lichtthermostat

Die Varianzanalyse zeigte für den ersten Versuch hoch signifikante Unterschiede zwischen den Kulturmedien, den Genotypen und den Kulturbedingungen (Tab. 4). Die Interaktionen zwischen Genotypen und Medien bzw. Kulturbedingungen waren ebenfalls signifikant. Allerdings zeigten die Varianzkomponenten einen verhältnismäßig großen Effekt des Genotyps und mit 0,99 wurde eine vergleichsweise sehr hohe Heritabilität erreicht.

Tab. 4: Ergebnis der Varianzanalyse zum Einfluss von Genotyp, Medium, Experiment und Kulturbedingung auf die direkte Sprossregeneration aus Mikrosporenembryonen (%) beim Raps. (FG) Freiheitsgrade, (MQ) Mittlere Quadratsumme

Varianzursache	FG	MQ	Varianzkomponente	F-Wert
Genotyp (G)	4	10431	114,0	60,1 ^{**}
Medium (M)	9	2575	54,6	21,4 ^{**}
Experiment (E)	2	281	1,2	2,9 ⁺
Kulturbedingung (C)	2	5837	38,2	58 ^{**}
G x C	8	2696	85,7	21,5 ^{**}
G x E	8	150	2,5	1,5 [*]
G x M	36	710	62,4	4,8 ^{**}
M x C	18	260	12,5	3,6 ^{**}
M x C x G	72	379	93,6	3,9 ^{**}
Heritabilität			0,99	

⁺, ^{*}, ^{**} signifikant bei P=10, 5 und 1%

In einem zweiten Versuch wurde der Einfluss der 4 besten Kulturmedien aus dem ersten Versuch in Verbindung mit 5 verschiedenen Kulturbedingungen auf die direkte Pflanzenregeneration von 13 verschiedenen Genotypen untersucht (Abb. 2). Auch in diesem Versuch bestätigte sich die Überlegenheit des Mediums B5+0.1 mg/L GA3. Im Mittel über die Genotypen und die verschiedenen Kulturbedingungen ergab sich für dieses Medium eine direkte Pflanzenregenerationsrate von über 60%. Die vierzehntägige Inkubation im Dunkeln bei 1,5 °C erwies sich im Vergleich zu 4 °C als vorteilhaft. Ein eindeutiger Effekt der Belichtung konnte dagegen nicht festgestellt werden. Die Varianzanalyse bestätigte den signifikanten Einfluss des Genotyps, des Kulturmediums sowie der Kulturbedingungen auf die direkte Sprossregeneration aus Mikrosporenembryonen (Tab. 5). Auch in diesem Versuch ergab sich mit 0.99 eine sehr hohe Heritabilität für das Merkmal direkte Sprossregeneration.

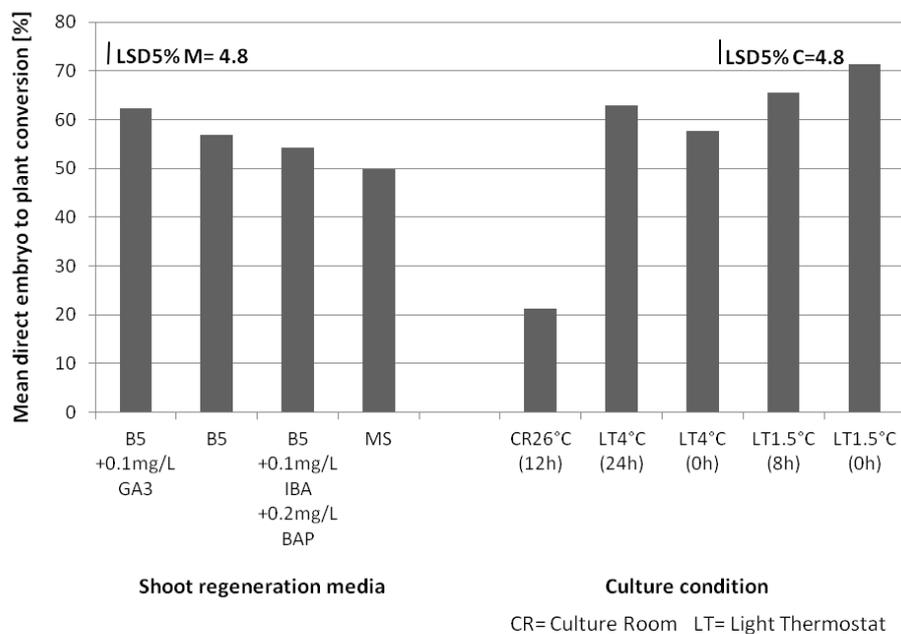


Abb. 2: Direkte Sprossregeneration aus Mikrosporenembryonen (%) nach Kultur auf 4 verschiedenen Kulturmedien (links) und 5 verschiedenen Kulturbedingungen (rechts). Dargestellt sind Mittelwerte über 13 Genotypen, 3 Experimente und 5 Kulturbedingungen (links) bzw. 4 Kulturmedien (rechts).

Tab. 5: Ergebnis der Varianzanalyse zum Einfluss von Genotyp, Medium, Experiment und Kulturbedingung auf die direkte Sprossregeneration aus Mikrosporenembryonen (%) beim Raps. (FG) Freiheitsgrade, (MQ) Mittlere Quadratsumme

Varianzursache	DF	MQ	Varianzkomponente	F-Wert
Genotyp (G)	12	9565	157,2	71,4**
Medium (M)	3	3040	14,5	14,1**
Experiment (E)	2	33	-0,2	0,4
Kulturbedingung (C)	4	32000	203,0	96,9**
G x C	48	821	59,6	7,8**
M x C	12	293	4,5	3,3**
M x G	36	53	-2,3	0,6
M x C x G	144	172	26,1	1,8**
Heritabilität			0,99	

** signifikant bei P= 1%

4.1.2 Diskussion und Ausblick

Die kontinuierliche Verbesserung der DH-Technik stellt auch über das Ende der vorliegenden Projektes eine Herausforderung dar. Die vorliegenden Ergebnisse haben für verschiedene Winterrapsgenotypen bestätigt, dass eine Inkubation bei 1.5 °C im Dunkeln die direkte Pflanzenregeneration drastisch verbessern kann. Eine Inkubation der Kulturen unter Lang- oder Kurztag-

bedingungen wie noch von Cegielska-Taras et al. (2002) beschrieben, ist also nicht erforderlich (siehe auch Huang et al. 1991). Dies ist insofern relevant, da sich diese niedrigen Temperaturen ohne Beleuchtung einfacher und kostengünstiger realisieren lassen. Hinsichtlich der Länge der Kältebehandlung bleibt zu prüfen, ob nicht bereits auch kürzere Inkubationszeiten zu einer gleichermaßen guten direkten Pflanzenregeneration führen. Literaturangaben zur Folge könnte bereits eine drei- bis fünftägige Inkubation ausreichend sein (Zhang et al. 2006). Ergebnisse anderer Autoren weisen darauf hin, dass auch geringere Temperaturabsenkungen von bspw. 25 °C auf 20 °C in den Klimakammern zu einer deutlich verbesserten direkten Pflanzenregeneration führen können (Huang et al. 1991). Zu klären bleibt, inwiefern die Anwendung weiterer Stressfaktoren (Hitze, Trocknung, ABA) alleine oder aber in Kombination mit einer Kältebehandlung zu einer weiteren Verbesserung der direkten Pflanzenregeneration führt (Anandarajah et al. 1991). Die mit über 70% im Mittel über 4 Kulturmedien und 13 Genotypen erreichten hohen direkten Pflanzenregenerationswerte lassen auch eine direkte Auspflanzung der Embryonen in Erde ohne Zwischenkultur auf Festmedium möglich erscheinen (siehe unten). Zu Prüfen wäre hier allerdings noch, ob die Kältebehandlung statt auf mit Agar verfestigtem B5-Medium auch in Flüssigmedium, ggf. in Verbindung mit einer reduzierten Osmolarität (vergl. Huang et al. 1991) erfolgen kann.

Die in den vorliegenden Versuchen erzielte hohe Heritabilität für das Merkmal direkte Pflanzenregeneration zeigt, dass durch Anwendung der DH-Technik unmittelbar auf eine schnelle und direkte Pflanzenregeneration selektiert wird, da von solchen Genotypen bevorzugt Pflanzen regeneriert und ins Gewächshaus transferiert werden. Genotypen mit verzögerter, indirekter Pflanzenregeneration werden nur dann berücksichtigt, wenn es keine ausreichende Anzahl an gut regenerierenden Embryonen gibt. Bei einem intensiven Einsatz der DH-Technik in der Winterrapszüchtung führt dieses langfristig zu einer Verbesserung der direkten Pflanzenregeneration in dem Zuchtmaterial.

Parallel zu den oben aufgeführten Versuchen zur Verbesserung der direkten Pflanzenregeneration in vitro wurde untersucht, ob ein unmittelbarer Transfer von Mikrosporenenembryonen aus dem NLN-Flüssigmedium in Erde zu einer befriedigenden Pflanzenregeneration führt. Unter drei verschiedenen Kultursubstraten (hauseigene Komposterde, Bioanzuchterde und Fruhstorfer T25 Erde) erwies sich die Fruhstorfer T25 Erde als am besten geeignet um eine Pflanzenregeneration zu erzielen. Hier konnte über verschiedene Genotypen hinweg zunächst nur eine mittlere direkte Pflanzenregeneration von 21% erzielt werden. Diese Versuche wurden allerdings mit Embryonen ohne vorherige Inkubation bei 1,5 bis 4 °C durchgeführt, so dass nach Kältebehandlung bessere Ergebnisse zu erwarten sind.

4.1.3 Benötigte Ressourcen

Wissenschaftlich-technisches Personal A1 ½ Stelle für 36 MM; technisches Personal A2 1 Stelle für 36 MM. Geräte wurden nicht angeschafft, bzw. waren zu Projektbeginn vorhanden. Leistungen Dritter wurden nicht in Anspruch genommen.

4.2 Optimierung der Diploidisierung von Mikrosporen

Ziel der Versuche war es, Bedingungen zu identifizieren, unter denen ein möglichst hoher Anteil an Mikrosporen zu Kulturbeginn diploidisiert und zu doppelthaploiden Pflanzen regeneriert werden kann.

4.2.1 Ergebnisse

Es wurden 3 verschiedene Mitosehemmstoffe in unterschiedlicher Konzentration und Kombination miteinander getestet (Tab. 6). Die Auswahl der Mitosehemmstoffe und der verwendeten Konzentrationen basierte auf Literaturergebnissen und eigenen zu Projektbeginn vorliegenden Erkenntnissen. Im Mittel über 8 Genotypen und 3 Experimente konnten bei der unbehandelten Kontrolle eine Diploidisierung von 36,4 % festgestellt werden (Tab. 6). Der größte Teil der Embryonen war haploid (58,1%). Die 3-tägige Behandlung der Mikrosporen mit 25µM und 250µM Colchizin führte zu einer 67 bis 70%igen Diploidisierung. Offensichtlich ist eine Konzentration von 25µM (10 mg/L) Colchizin ausreichend, um eine Diploidisierung zu erreichen. Im Unterschied zur Kontrolle war der Anteil haploider Embryonen deutlich reduziert. Allerdings nahm der Anteil tetraploider Embryonen um das drei- bis vierfache zu. Eine permanente Behandlung mit 25µM Colchizin bis zum ersten Mediumwechsel nach etwa 20 Tagen führte zu keiner Verbesserung der Diploidisierung, da hier der Anteil tetraploider Embryonen noch stärker zunahm. APM und Pronamid alleine, in Kombination miteinander und auch in der Dreifachkombination mit Colchizin führte zu keiner besseren Diploidisierung.

Tab. 6: Diploidisierung (%) von Embryonen aus der Mikrosporenkultur nach Behandlung mit verschiedenen Mitosehemmstoffen in unterschiedlicher Kombination und Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte über 8 Genotypen und 3 Experimente.

Mitosehemmstoffe	Behandlungsdauer (h)	Ploidiestufe [%]		
		1x	2x	4x
Kontrolle (keine Behandlung)	-	58,1	36,4	5,6
25 µM Colchicine	Permanent	12,6	59,5	<u>27,9</u>
25 µM Colchicine	72	<u>8,4</u>	<u>69,6</u>	22,1
250 µM Colchicine	72	14,6	67,2	18,2
1.5 µM APM +1.5 µM Pro	72	46,4	48,6	5,0
1.5 µM APM +1.5 µM Pro +25 µM Col	72	29,7	61,1	9,2
3 µM APM	72	<u>63,5</u>	<u>33,4</u>	<u>3,2</u>
3 µM Pronamid (Pro)	72	44,1	52,0	3,9
Mittelwert		34,7	53,5	11,9
LSD5%		16,5	15,3	11,3

Die Ergebnisse der Varianzanalyse (Tab. 7) belegen die signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Genotypen und zwischen den Behandlungen der Mikrosporen mit unterschiedlichen Mitosehemmstoffen. Signifikante Genotyp x Behandlungsinteraktionen konnten ebenfalls festgestellt werden. Mit 0,82 wurde eine für das Merkmal Diploidisierung (%) eine hohe Heritabilität erreicht.

Tab. 7: Ergebnis der Varianzanalyse zum Einfluss von Genotyp, Mitosehemmstoff-Behandlung und Experiment auf die Diploidisierung von Mikrosporenbryonen (%) beim Raps. (FG) Freiheitsgrade, (MQ) Mittlere Quadratsumme

Varianzursache	FG	MQ	Varianzkomponente	F-Wert
Genotyp (G)	7	507	17,3	5,5**
Behandlung (B)	7	1682	57,9	5,8**
Experiment (E)	2	46	-0,7	0,5
GxB	49	291	66,5	3,2**
GxE	14	92	0,0	1,0
BxE	14	96	0,5	1,1
Heritabilität			0,82	

** signifikant bei P= 1%

In einem weiteren Versuch mit 4 Genotypen wurde festgestellt, dass eine zweitägige Behandlung mit 250µM Colchizin zu einer besseren Diploidisierung führte als eine Behandlung über 3 Tage mit der gleichen Konzentration (Tab. 8). Dieses Ergebnis deckt sich zum Teil mit Ergebnissen aus der Literatur und mit Ergebnissen, die bei Pflanzenzüchtungsunternehmen erzielt wurden. Ob dieses Ergebnis auch mit der niedrigen Konzentration von 25 µM erreicht werden kann, konnte nicht mehr geklärt werden.

Tab. 8: Diploidisierung (%) von Embryonen aus der Mikrosporenkultur nach Behandlung verschiedener Genotypen mit Colchizin in unterschiedlicher Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte über 3 Experimente.

Genotyp	Mittelwert	Colchizin [µM]					
		doppelthaploide Embryonen [%]					
		250 48h	250	150	125	25	0
Komando x Express	65,9	73,5	78,5	62,5	56,2	73,1	45,5
Charly x Krypton	59,1	75,5	81,7	40,3	66,5	66,5	23,8
Krypton x DSV2	64,1	83,6	51,7	64,6	78,1	28,6	64,1
Express x Charly	57,9	76,6	60,9	54,8	57,6	64,6	33,0
Mittelwert	61,5	77,3	68,2	58,9	61,2	70,6	32,7
LSD5% G	4,1						
LSD5% B	15,9			15,9			
LSD5% G x B				9,0			

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob das organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vermittler einen positiven Einfluss auf die Diploidisierung und die direkte Pflanzenregeneration hat. Getestet wurde DMSO in Konzentrationen von 0%, 0.3% und 3% in Kombination mit einer Colchizin-Behandlung (250µM für 72 h). Im Mittel über 3 Versuche konnten allerdings keine signifikanten Effekte der DMSO-Behandlung auf die Diploidisierung und die direkte Pflanzenregeneration festgestellt werden (Tab. 9). Die in dem vorangegangenen Versuch ermittelte hohe Heritabilität für das Merkmal Diploidisierung wurde in diesem Versuch sogar noch übertroffen.

Tab. 9: Ergebnis der Varianzanalyse zum Einfluss von Genotyp, DMSO/Mitosehemmstoff-Behandlung und Experiment auf die Diploidisierung von Mikrosporenembryonen (%) beim Raps. (FG) Freiheitsgrade, (MQ) Mittlere Quadratsumme

Varianzursache	FG	MQ	Varianzkomponente	F-Wert
Genotyp (G)	3	686	71,4	16,0**
Behandlung (B)	2	306	-14,9	0,6
Experiment (E)	2	129	7,0	2,9
GxB	6	484	147,4	11,3**
GxE	6	45	0,7	1,1
BxE	4	73	7,5	1,7
Heritabilität			0,94	

** signifikant bei P= 1%

Um die Unterschiede zwischen verschiedenen Genotypen festzustellen, wurde ein größeres Sortiment auf seine spontane und induzierte Diploidisierung untersucht. Die Behandlung wurde mit 250µM Colchizin für 3 Tage durchgeführt. Es zeigten sich große Unterschiede in der Diploidisierung (42 – 83%) und in der direkten Sprossregeneration (2,3 – 35%). Die Behandlung mit Colchizin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die direkte Pflanzenregeneration (Tab. 10).

Tab. 10: Einfluss einer Behandlung von Mikrosporen mit Colchizin (250µM für 3 Tage) auf die Anzahl diploider Embryonen (%) und deren direkter Regeneration zu Pflanzen (%). Dargestellt sind Mittelwerte über 3 Experimente.

Genotyp	DH Pflanzen (%)		Direkte Pflanzenregeneration (%)		
	Colchizin		Colchizin		
	mit	ohne	mit	ohne	Mittelwert
Favorite × DSV1	82,1	<u>69,3</u>	<u>3,6</u>	<u>1,1</u>	<u>2,3</u>
Adriana	<u>83,3</u>	58,1	19,4	37,6	28,5
DSV2	73,9	55,7	10,1	2,7	2,6
Komando × Express	74,4	45,8	4,8	6,3	5,6
Komando	62,5	37,9	12,8	35,2	24,0
Oase × NK Beauty	60,8	36,5	11,0	3,2	7,1
Express × Charly	61,6	32,9	14,6	11,4	13,0
Adriana × Oase	60,9	32,8	14,6	23,5	19,0
DSV1	80,8	30,1	8,6	7,9	8,2
Krypton × DSV2	45,2	29,2	<u>39,7</u>	20,0	29,8
Charly × Krypton	81,3	23,8	12,5	22,7	27,6
Krypton	<u>41,9</u>	23,6	9,2	23,0	16,1
Favorite	61,8	22,8	3,2	2,1	6,4
Charly	70,5	21,6	22,5	29,4	26,0
DSV1 × Adriana	70,8	20,6	27,9	25,4	26,7
Oase	75,8	17,3	8,7	13,7	11,2
Express 617	66,3	<u>14,9</u>	22,9	<u>46,7</u>	<u>34,8</u>
Mittelwert	67,9	33,7	14,5	18,3	16,4
LSD5% G					17,6
LSD5% T		23,1		6,5	
LSD5% G x T		22,1		16,3	

4.2.2 Diskussion und Ausblick

Obwohl die in den durchgeführten Versuchen gewählten APM und Pronamid-Konzentrationen in der Literatur als effektiv beschrieben wurden (Hansen und Andersen 1996), konnte in den vorliegenden Versuchen mit diesen Konzentrationen keine ausreichende Diploidisierung erreicht werden. Hier müssten ggf. höhere Konzentrationen geprüft werden. Das Fehlen einer erhofften synergistischen Wirkung der verschiedenen Antimitotika in Kombination miteinander wurde auch in Versuchen mit Maissämlingen festgestellt (Häntzschel und Weber 2010, Häntzschel 2011). Der bei kürzeren und längeren Behandlungszeiten festgestellte hohe Anteil an haploiden bzw. tetraploiden Embryonen deutet darauf hin (Tab. 4), dass die Induktion der ersten symmetrischen Teilung nicht synchron verläuft, sondern sich zeitlich über einen längeren Zeitraum hinweg erstreckt. Selbst bei quasi permanenter Colchizin-Behandlung der Mikrosporen über 20 Tage hinweg, konnten noch 12,6% der Embryonen als haploid identifiziert werden. Diese Embryonen sind entweder als resistent gegenüber Colchizin einzustufen oder aber die Teilung der Mikrosporen beginnt zu einem späten Zeitpunkt, bei dem keine ausreichend wirksame Colchizinkonzentration mehr im Medium vorliegt. Möglicherweise kann durch weitere Mitosehemmstoffe allein oder in Kombination miteinander (Lakshmanan et al. 2013), durch Zugabe von Phytohormonen zum Induktionsmedium, durch eine Vorinkubation der Blütenknospen bei 4 °C (Gu et al. 2004) eine Synchronisation der ersten Teilung und damit auch eine Verbesserung der Diploidisierung erreicht werden.

4.2.2 Benötigte Ressourcen

Wissenschaftlich-technisches Personal A1 ½ Stelle für 36 MM; technisches Personal A2 1 Stelle für 36 MM. Geräte wurden nicht angeschafft, bzw. waren zu Projektbeginn vorhanden. Leistungen Dritter wurden nicht in Anspruch genommen.

4.3 Entwicklung eines „Dry Artificial Seed“-Systems

4.3.1 Ergebnisse

Ziel der Versuche war es, überzählige, nicht sofort für die Pflanzenregeneration benötigte Embryonen durch Trocknung lagerfähig zu machen, damit sie zu einem späteren Zeitpunkt bei Bedarf zu Pflanzen regeneriert werden können. An der Forschungsstelle wurden unterschiedliche Trocknungsprotokolle für die Embryonen aus der Mikrosporenkultur getestet. Zunächst wurde eine Trocknung unter der Werkbank bei Zimmertemperatur über einen Zeitraum von 6 Tagen durchgeführt. Parallel dazu wurde der Einfluss der Abscisinsäurebehandlung (50 -100 µM) auf die Regenerationsfähigkeit nach Trocknung untersucht. Da aus keinem dieser Versuche von den getrockneten Embryonen Pflanzen regeneriert werden konnten, wurden auch kürzere Trocknungszeiten geprüft. Bei Trocknungszeiten bis zu 2 Stunden konnten nach anschließendem Transfer von Embryonen auf Medium B5+0.1 mg/L GA3 Pflanzen regeneriert werden. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnten jedoch in der Regel keine bessere direkte Pflanzenregeneration erzielt werden. Je nach Versuch variierte die direkte Pflanzenregeneration zwischen 4 und 17%. Eine längere Lagerung der nur kurz getrockneten Embryonen führte allerdings zum vollständigen Verlust der Regenerationsfähigkeit der Embryonen.

Weiterhin wurden Embryonen mit Hilfe von chemischen Substanzen über eine Periode von 6 Tagen (Senaratna et al. 1989, Senaratna et al. 1991) getrocknet. Dann wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und für 4 Wochen gelagert. Anschließend wurden die Embryonen auf B5-Medium mit 0,1 mg/L GA3 transferiert. Dieses Protokoll wurde mit 3 verschiedenen Genotypen getestet, aber bei keinem Genotyp konnten nach Lagerung Pflanzen aus den Embryonen regeneriert werden.

Parallel zu den an der Forschungsstelle durchgeführten Versuchen, wurden auch bei einem an dem Projekt beteiligten Pilotunternehmen Versuche zur Trocknung und Lagerung von Embryonen aus der Mikrosporenkultur mit anschließender Regeneration von Pflanzen durchgeführt. In diesem Unternehmen ist es gelungen, ältere, bereits im Kühlschrank für einige Zeit im NLN-Medium gelagerte Embryonen schonend auf Filterpapier zu trocknen und bis zu 6 Monaten zu lagern. Als kritisch erwies sich die möglichst langsame und schonende Trocknung der Embryonen bei 4° C im Kühlschrank. Nach Trocknung und Lagerung für einen Monat konnten bis zu 100% Regeneration der Embryonen erreicht werden und nach 6 Monaten Lagerung konnten immerhin noch bis zu 20% der Embryonen revitalisiert und zu Pflanzen regeneriert werden.

4.3.2 Diskussion

Die an der Forschungsstelle und bei dem beteiligten Pilotunternehmen erzielten Ergebnisse belegen, dass eine möglichst schonende Trocknung der Embryonen im Kühlschrank bei etwa 4 °C ausschlaggebend für die Lagerung und anschließende Regeneration von Pflanzen aus den Embryonen ist. Unklar ist, ob durch die Inkubation der Embryonen bei 4 °C die Trocknung verlangsamt und damit die Überlebensfähigkeit der getrockneten Embryonen gesichert wird, oder aber ob die Kältebehandlung an sich einen positiven Effekt ausübt. Inwiefern die der Trocknung vorangegangene längere Lagerung der Embryonen bei 4 °C im NLN-Flüssigmedium einen Einfluss auf die Lagerfähigkeit der Embryonen hatte, konnte im Rahmen der Projektlaufzeit nicht geklärt werden. Durch weitere Optimierung der Lagerbedingungen der Embryonen kann die Regenerationsfähigkeit sicherlich noch verbessert werden. Die bei dem Pilotunternehmen erzielten guten Ergebnisse bestätigen frühere publizierte Ergebnisse zu diesem Thema (Hansen 2003, Senaratna et al. 1991)

4.3.2 Benötigte Ressourcen

Wissenschaftlich-technisches Personal A1 ½ Stelle für 36 MM; technisches Personal A2 1 Stelle für 36 MM. Geräte wurden nicht angeschafft, bzw. waren zu Projektbeginn vorhanden. Leistungen Dritter wurden nicht in Anspruch genommen.

- 5 Zusammenstellung aller Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Vorhaben veröffentlicht wurden oder in Kürze veröffentlicht werden sollen

Die wissenschaftliche Mitarbeiterin in dem Forschungsprojekt hat über das Thema ihre Dissertation mit dem Titel „Methodical improvements in microspore culture of *Brassica napus* L.“ angefertigt. Die Arbeit wird nach formaler Überarbeitung über die Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen als pdf-Dokument für jeden frei zugänglich im Internet veröffentlicht.

Klutschewski S, Zhang R, Möllers C (2011) Improved microspore derived embryo to plant conversion and in vitro vernalisation in winter oilseed rape. 13th Int. Rapeseed Congress, June 05-09, 2011, Prague, Czech Republic, Abstract Book [CD Rom], P 095

Ferrie AMR, Möllers C (2011) Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:375-386

Versuche zu den oben genannten 3 Teilprojekten wurden bzw. werden gegenwärtig unter Berücksichtigung neuer Ergebnisse fortgeführt und zum Abschluss gebracht. Es ist beabsichtigt, nach Abschluss der Arbeiten die Ergebnisse in einer internationalen Zeitschrift mit Peer-Review zu publizieren.

- 6 Angaben über gewerbliche Schutzrechte, sofern sie erworben wurden oder ihre Anmeldung beabsichtigt ist

Es wurden keine gewerblichen Schutzrechte erworben und eine Anmeldung ist nicht geplant

- 7 Dissemination der Forschungsergebnisse

Eine Einbindung der Mitglieder des projektbegleitenden Ausschusses sowie aller weiteren Mitglieder der Forschungsvereinigung war während der Projektlaufzeit durch die regelmäßig stattfindenden Projekttreffen gegeben. Darüber hinaus erwiesen sich die gegenseitigen Besuche und bilateralen Gespräche im kleinen Kreis häufig als sehr effektiv.

8 Durchführende Forschungsstelle

AiF-Forschungsvereinigung „Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V.“

Forschungsstelle
Georg-August-Universität Göttingen
Department für Nutzpflanzenwissenschaften
Abteilung Pflanzenzüchtung
Von-Siebold-Str. 8
37075 Göttingen

Tel. 0551 394362

Leiter der Forschungsstelle
Prof. Dr. Heiko C. Becker

Projektleitung
Dr. Christian Möllers

- Anandarajah K, Kott L, Beversdorf WD, McKersie BD (1991) Induction of desiccation tolerance in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. by thermal stress. *Plant Science* 77:119-123
- Cegielska-Taras T, Tykarska T, Szała L, Kuraś L & Krzymański J (2002) Direct plant development from microspore-derived embryos of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.) Metzger. *Euphytica* 124:341–347
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151–158
- Gu HH, Hagberg P & Zhou WJ (2004) Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regulation* 42:137–143
- Hansen M (2003) Protocol for microspore culture in Brassica. M. Maluszynski et al. (eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 217-222. IAEA Vienna
- Hansen NJP, Andersen SB (1996) *In vitro* chromosome doubling potential of Colchicine, Oryzalin, Trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica* 88:159–164
- Häntzschel KR (2011) Bestimmung und Optimierung von Colchicin-Alternativen für die Doppelhaploiden-Technik bei Mais (*Zea mays* L.). Dissertation Universität Hohenheim, Fakultät für Agrarwissenschaften. Cuvillier Verlag Göttingen - 1. Aufl.
- Häntzschel KR, Weber G (2010) Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma* 241:99–104
- Huang B, Bird S, Kemble R, Miki B & Keller W (1991) Plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus*: Effect of embryo age, culture temperature, osmotic pressure, and abscisic acid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 27:28–31
- Lakshmanan PS, Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E (2013) Micronucleation by mitosis inhibitors in developing microspores of *Spathiphyllum wallisii* Regel. *Plant Cell Rep* 32:369–377
- Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. - *Z. Pflanzenphysiologie* 105:427-434
- Möllers C (1998) Züchtung mit Haploiden beim Raps. *Vorträge für Pflanzenzüchtung* 43:185-193
- Möllers C (2006) Ergebnis einer anonymen Umfrage an die Rapszüchter der GFP über die Anwendung der Mikrosporenkultur in der Winterrapszüchtung. Unveröffentlicht, eine Kopie kann zur persönlichen Nutzung beim Autor angefordert werden.
- Paulmann W, Frauen M (1991) Einsatz von biotechnologischen Verfahren in der praktischen Rapszüchtung. Bericht 42. Arbeitstagung Saatzuchtleiter, 26-28. Nov., Gumpenstein. Österreich, 173-182
- Senaratna T, McKersie BD, Bowley SR (1989) Desiccation tolerance of alfalfa *Medicago sativa* L. somatic embryos, influence of abscisic acid stress pretreatment and drying rates. *Plant Sci.* 65:253-260

Senaratna T, Kott L, Beversdorf WD, McKersie BD (1991) Desiccation of microspore derived embryos of oilseed rape *Brassica napus* L. *Plant Cell Rep.* 10:342-344

Zhang GQ, Zhang DQ, Tang GX, He Y & Zhou WJ (2006) Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. *Biologia Plantarum* 50:180–186

10 Hinweis zur Förderung

„Das IGF-Vorhaben 16095 N FSt.1 der Forschungsvereinigung Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. - GFP, Bonn wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert. „

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Technologie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Weiterführende Informationen zu dem Projekt können bei der Forschungsstelle erhalten werden