



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 264 938 A1

4(51) C 12 N 5/00
A 01 G 31/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	W P C 12 N / 309 335 0	(22)	23. 11. 87	(44)	15. 02. 89
(71)	Institut für Züchtungsforschung Quedlinburg, E.-u.-J.-Rosenberg-Straße 22/23, Quedlinburg, 4300, DD				
(72)	Köhler, Heinz, Dr. rer. nat.; Nestrówicz, Regina, Dipl.-Biol., DD				
(54)	Verfahren zur Erzeugung und Depothaltung genetisch identischer Nachkommen von Getreidegenotypen				

(55) Verfahren, Getreidearten, Nachkommen, Erzeugung, Depothaltung, Sterilbedingung, Vermehrungsrate, Ausgangsmaterial, Einzelpflanze, Hybride, Wachstumsregulator, Mutterpflanzenhaltung, Forschung, Pflanzenzüchtung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur vegetativen Erzeugung und Depothaltung genetisch identischer Nachkommen von Einzelpflanzen verschiedener Getreidearten und ihrer Hybriden unter Sterilbedingungen. Die Kombination mehrerer Verfahrensschritte und die Einbeziehung eines Wachstumsregulators schaffen Voraussetzungen, um Linien und einzelne Genotypen unter definierten Umweltbedingungen kostengünstig und effektiv in größerem Umfang zu vermehren und langfristig ohne Manipulation zu deponieren. Hohe Vermehrungsraten und Ausschaltung von Krankheiten ersparen eine teure Mutterpflanzenhaltung unter natürlichen Bedingungen. Durch das Verfahren kann für Forschung und Pflanzenzüchtung wüchsiges, gesundes und kostengünstiges Ausgangsmaterial bereitgestellt werden.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Erzeugung und Depothaltung genetisch identischer Nachkommen von Getreidegenotypen, **dadurch gekennzeichnet**, daß Sterilkulturen aus Karyopsen oder Nodien angelegt werden oder Pflanzen verwendet werden, die in vitro durch Antheren-, Protoplasten- oder Embryokultur entstanden sind.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch Wachstumsregulatoren, die Äthylen abgeben, im Langtag bei Temperaturen von 20 bis 25°C eine vegetative Vermehrung induziert wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß vegetative Sproßteile oder Pflanzen nach Behandlung mit dem Wachstumsregulator in einem Kühlraum bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt ohne weitere Manipulation auf engstem Raum für mehr als 1 Jahr deponiert werden können.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Kombination von Verfahrensschritten zur vegetativen Erhaltung und Vermehrung wertvoller Genotypen und neuartiger Art- und Gattungsbastarde von Getreidearten, insbesondere von Roggen, Gerste, Triticale und Hafer unter sterilen Anzuchtbedingungen für die Durchführung reproduzierbarer physiologischer und genetischer Analysen und als Voraussetzung für effektive Zuchtfortschritte.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Eine genetisch identische Reproduktion von bestimmten Genotypen der Getreidearten, vor allem von wertvollen heterozygoten allogamen Formen, ist Voraussetzung für die Lösung von Aufgaben in der Hybridzüchtung, der Krankheitsresistenz- und der Trockentoleranzprüfung. Erzwungene Selbstbestäubung erfordert nicht nur einen hohen Aufwand an Arbeitskräften, Arbeitszeit und Material, sie führt in der Mehrzahl zu Inzuchtdepressionen, die sich nachteilig auf die Fertilität und das Wachstum auswirken.

Durch vegetative Vermehrung, als Klonung bezeichnet, kann eine genetisch stabile Reproduktion realisiert werden. Klonungen sind an vernalisierten Pflanzen im Freiland nur unter Kurztagsbedingungen im Herbst und Frühjahr möglich. Die künstliche Verlängerung der Kurztagsperiode (Müller, H. W., Vasel, H. 1978, Arch. Züchtungsforschung 8, 161–176) ist mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden, zum anderen ist die Klonungsrate wechselnd und nicht effektiv genug. Eine verbesserte Methode wurde für die vegetative Vermehrung von Winterroggen durch Verwendung eines Hydroponikgewächshauses entwickelt (Schlenker, U., 1986, Arch. Züchtungsforschung 16, 169–174). Sie erlaubt eine Vermehrungsrate von 1:160 in 6 Monaten unter Langtagbedingungen bei Temperaturen über 15°C. Grenzen sind dieser Methode durch die Kapazität der Gewächshausfläche, die wiederholte aufwendige Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen und durch den relativ hohen Arbeitsaufwand bei der Pflege der Pflanzen und der Wartung der Hydroponikanlage gesetzt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, durch Kombination von In-vitro-Anzucht, In-vitro-Verklonung unter Einbeziehung von Wachstumsregulatoren und In-vitro-Langzeitlagerung ausgewählte Genotypen von Getreidearten und ihren Hybriden sicher und effektiv in großen Mengen zu reproduzieren und zu erhalten.

Durch Wegfall von Krankheits- und Schädlingsbekämpfung, geringen Pflanzbedarf, hoher Produktivität und Depothaltung ohne Manipulation verringern sich Arbeitsaufwand und Kosten gegenüber herkömmlichen Verfahren im Freiland und Gewächshaus.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das Verfahren löst das Problem der vegetativen Vermehrung und Erhaltung bei verschiedenen Getreidearten und ihren Bastarden, wie z. B. Roggen, Gerste, Triticale, Hafer.

Erfindungsgemäß werden Anzucht, Verklonung und Depothaltung der Getreideformen unter sterilen Bedingungen in klimatisierten Räumen vorgenommen.

Sterilkulturen können von Karyopsen, basalen Teilstücken von Seitenbetrieben bestockter Getreidepflanzen, die sich in der vegetativen Wachstumsphase befinden, von Nodien oder durch Verwendung von In-vitro-Pflänzchen aus der Antheren-, Protoplasten-, und Embryokultur etabliert werden. Karyopsen, Nodien und basale Teilstücke sind vor der Kultivierung mit einem geeigneten Desinfektionsmittel — ohne Schädigung der eigenen Vitalität — keimfrei zu gestalten.

Durch Kultivierung in flüssigem oder auf festem Nährmedium werden die Pflanzenteile zur Entwicklung angeregt und bilden kleine Pflanzen.

Die Pflänzchen werden danach im jungen Zustand auf ein Nährmedium mit bekannter Zusammensetzung gebracht, dem ein Wachstumsregulator auf der Basis von 2-Chloräthylphosphonsäure zugeführt wird. Die Pflanzen werden dadurch zum Austreiben bereits angelegter Seitenknospen und zur Neubildung von Knospen angeregt. Bei entstandenen multiplen Pflanzen werden die Triebe voneinander getrennt und in ein auxinhaltiges Flüssigmedium überführt, welches das Sproßwachstum und die Wurzelbildung fördert. Durch die Nachwirkung des vorher applizierten Wachstumsregulators entstehen weitere Sprosse. Sie können nach Bewurzelung entweder in Erde verpflanzt oder einem neuen Vermehrungszyklus ausgesetzt werden. Die Sprosse können nach Depothaltung in einem Kühlraum bei diffuser Dauerbeleuchtung über Monate ein Jahr und mehr gelagert werden. Ihr Einbau in einen neuen Vermehrungszyklus ist jederzeit möglich.

Ausführungsheispiel

Etablierung von Sterilkulturen aus Karyopsen

Winterroggen-Karyopsen werden durch geeignete Desinfektionsmittel wie Sublimat und Natriumhypochlorit oberflächensterilisiert und nach mehrmaligem Waschen mit sterilem Wasser zur Keimung auf einem einfach zusammengesetzten Nährmedium im Dunklen bei Temperaturen zwischen 20 bis 25°C platziert.

Das Nährmedium braucht nur aus Agar und Saccharose zu bestehen. Die Keimpflanzen bzw. die aus den Knospen ausgewaschenen Triebe werden zur Förderung des Wachstums für eine bestimmte Zeit (etwa 10...30 Tage) auf hormonfreies Nährmedium überführt, wie das Medium nach Murashige und Skoog.

Etablierung von Sterilkulturen aus Nodien vegetativer Pflanzen

Von Winterroggenpflanzen können Nodien isoliert werden und nach Behandlung mit einem Desinfektionsmittel in Sterilkultur überführt werden.

Bei unvernisierten Jungpflanzen empfiehlt sich vorher eine Behandlung mit Gibberellinsäure mit einer Konzentration von etwa 100 mg/l, um vorhandene Sproßknospen zu aktivieren und sie vor einer Degeneration zu schützen. Pro Ausgangspflanze stehen dadurch für die Etablierung von Sterilkulturen etwa 20 Explantate zur Verfügung, die nach Oberflächensterilisation auf Nährmedium übertragen werden, dem ein Auxin und gegebenenfalls ein Zytokinin zugesetzt wird. Danach werden sie etwa 7 Tage auf flüssigem Nährmedium ohne Wachstoffsstoffe kultiviert.

Verklonung

Sterile Jungpflanzen von Karyopsen bzw. aus Nodien entwickelte Sprosse oder Pflanzen aus der Antheren-, Protoplasten- und Embryokultur werden in flüssigem Nährmedium nach Murashige und Skoog auf einer geeigneten Trägerschicht, wie z. B. Filterpapier, platziert und zur Anregung der Sproßbildungsrate mit einer Wachstumsregulatorlösung auf der Basis von 2-Chloräthanphosphonsäure, wie z. B. Flordimex oder Camposan (0,01 Vol.-%) durch Besprühen der Sprosse oder durch Einbringen der Wachstumsregulatorlösung in das Nährmedium behandelt.

Nach etwa 28 Tagen (15...40 Tage) Kulturdauer bei einer Temperatur zwischen 20 und 25°C entstehen unter Langtagbedingungen durchschnittlich 10–20 Sprosse pro Explantat bzw. eintriebiger Ausgangspflanze.

Tabelle 1

Anzahl der Sprosse nach 35 Tagen Einwirkzeit von Flordimex bei der W-Roggensorte „Esto“

Flordimex Vol.-%	Anzahl der Sprosse im Durchschnitt
0	7,0
0,002	12,2
0,01	24,2
0,02	28,2
0,1	40,0

Tabelle 2

Anzahl der Sprosse nach verschieden langer Einwirkzeit von Camposan bei 3 verschiedenen W-Roggensorten

W-Roggen Sorte	Camposan Vol.-%	14 d	Sproßanzahl nach 21 d	28 d
Dankowskie Zlote	0	3,0	3,0	3,7
	0,01	5,4	9,6	13,3
	0,02	6,8	8,0	10,1
Janos	0	1,7	2,9	5,3
	0,01	2,7	8,2	16,0
	0,02	2,5	10,0	16,8
St. 7770	0	1,1	1,2	5,6
	0,01	5,3	6,5	21,6
	0,02	3,7	8,9	17,0

Danach werden sie voneinander getrennt und die Einzelsprosse etwa 14 Tage (10...30 Tage) auf Murashige-Skoog-Medium ohne oder mit Zusatz von Auxin weiterkultiviert.

Es entstehen weitere Sprosse, die sich bewurzeln. Dieser Vermehrungszyklus kann beliebig oft wiederholt werden. In 6...8 Monaten werden von einer Ausgangspflanze je nach Genotyp bis zu 100000 Pflanzen erzeugt, die mit dem Ausgangstyp genetisch identisch sind.

Die Verpflanzung in Erde ist problemlos und gelingt mit einer Sicherheit von nahezu 100%.

Depothaltung

Sprosse von Pflanzen, die mit Camposan bzw. Flordimex behandelt wurden, werden in kleinen Kulturgefäßen, wie z. B. Reagenzgläser, Tabletten- oder Blutzuckerröhrchen, auf Filterpapier gegeben, das in ein flüssiges Nährmedium, Medium nach Murashige-Skoog, taucht.

Die Kulturgefäße mit diesen Sprossen werden in einem Kühlraum mit diffusem Licht geringer Lichtstärke frostfrei bei etwa 2...4°C aufgestellt.

Für eine Pflanzenvermehrung in der Größenordnung von 8000 bis 10000 Pflanzen sind für die Deponierung des Ausgangsmaterials nur 0,2 m² Kühlraumfläche erforderlich. Für die Verklonung werden die kühlgelagerten Sprosse bzw. Pflanzen zunächst auf frischem flüssigem Nährmedium, dem zur Unterdrückung der generativen Entwicklung ein Auxin zugesetzt wird, im Klimaraum bei etwa 20...25°C im Langtag kultiviert. Danach kann der Vermehrungszyklus einsetzen, bei dem durch chloräthanphosphonsäurehaltige Präparate die generative Entwicklung unterdrückt und eine vermehrte Seitentriebbildung induziert wird.