

## **Einfluß verschiedener Vorbehandlungen auf die Induktion somatischer Embryogenese an Antheren der Rebsorte Riesling\*)**

von

MARGIT HARST-LANGENBUCHER und G. ALLEWELDT

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung  
Geilweilerhof, Siebeldingen, Deutschland

**Zusammenfassung:** Zur Verbesserung der Regeneration intakter Pflanzen aus Antheren der Rebsorte Riesling wurden verschiedene Vorbehandlungsmaßnahmen am Ausgangsmaterial sowie Variationen in der Subkultivierung der induzierten somatischen Embryonen durchgeführt und dabei folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Kühlung der präparierten Antheren nach Inokulation auf das Nährmedium für 4 d bei 4 °C führte zu einer Regenerationsrate intakter Pflanzen von 8 %.
- Eine konstante Kulturtemperatur von 27 °C ist zur Induktion von Embryonen optimal; sowohl 15 °C als auch 32 °C hemmte die Embryoinduktion.
- Die höchsten Embryogeneraten von 5—7 % wurden nach einer Kallusinduktionsphase von 1—2 Wochen und nachfolgender Kultivierung mit 10 µM BAP oder TDZ erzielt.

### **The effect of different pretreatments on induction of somatic embryogenesis on anthers of grapevine cv. Riesling**

**Summary:** Different pretreatments on starting material for anther cultivation of grapevine cv. Riesling have been carried out. The experiments have been focused on chilling (+4 °C) and duration (0—4 d) of inflorescences and freshly excised anthers before cultivation. Best results were obtained when anthers were cooled for a period of 4 d. Callus induction temperature and duration as well as the effects of cytokinins (BAP, TDZ) in subcultures were also tested. The regeneration rate could be increased by a culture temperature of 27 °C, a short callus induction period of 1—2 weeks in combination with either a BAP- or a TDZ-application of 10 µM in the subsequent subcultivation.

**Key words:** BAP (benzyladenine purine), TDZ (Thidiazuron, N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl-urea), callus induction, culture temperature, pretreatment.

### **Einleitung**

Durch GRESSHOFF und DOY (1974) wurde eine intensive Forschungstätigkeit zur Erzeugung haploider Reben eingeleitet mit dem Ziel, der Züchtungsforschung homozygoten Pflanzenmaterial zur Verfügung zu stellen. Versuche dazu wurden mit unfruchteten Samenanlagen (MULLINS und SRINIVASAN 1976; SRINIVASAN und MULLINS 1980; GRAY und MORTENSEN 1987), meist aber mit Antherenausgangsmaterial durchgeführt, wobei die Variation der Basalmedien und der zugesetzten Phytohormonkombinationen und -konzentrationen im Vordergrund der Versuchsanstellungen standen, Vorbehandlungen des Ausgangsmaterials oder die Überprüfung verschiedener Einflußfaktoren während der Kultivierung jedoch weniger Beachtung erfuhren. Es wurde daher der Effekt einer Kühlung der Infloreszenzen oder präparierten Anthe-

\*) Herrn Prof. Dr. F. W. SCHNELL zum 80. Geburtstag gewidmet.

ren, die Kallusinduktionstemperatur und die Dauer der Kultivierung auf dem Kallusinduktionsmedium und die Zusammensetzung der nachfolgenden Subkulturmedien überprüft.

### Material und Methoden

Infloreszenzen der Rebsorte Riesling Klon 90 wurden 1991 und 1992 aus dem Freiland-Sortiment des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof entnommen und 10 min in NaOCl-Lösung (Verdünnung  $H_2O : NaOCl$  mit 12 % aktivem Cl- von 9 : 1) mit einigen Tropfen 'Tween 20' oberflächendesinfiziert. Nur weiß-grünlich transparente Antheren (Größe ca. 0,3–0,5 mm, frühes Tetradenstadium) wurden in Greiner®-Petrischalen (35,0/15 mm, mit 30 Antheren in 4 Wiederholungen) kultiviert (siehe Schema, Tab. 1).

Tabelle 1

Kulturbedingungen bei der Entwicklung intakter Pflanzen aus Antheren der Rebsorte Riesling *via* somatische Embryogenese

Conditions for the induction of somatic embryos and normal plantlets in anther cultures of the grapevine cv. Riesling

Induktionsschritt	Kallus	Embryonen (pro-globulär-herzförmig)	Embryonen (torpedoförmig) bis Keimung	Sproß- büschel	bewurzelte Einzel- pflanze
Medium	NN69	NN69	LS	LS	LS
Hormone ( $\mu M/l$ )					
- 2,4 D	4,5	—	—	—	—
- BAP	1,8	—	—	—	—
Saccharose [%]	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0
Bezeichnung des Nährmediums	BM-1	BM-2	SM-1	SM-1	SM-1
Beleuchtung	—	—	—	—	++
Wochen nach Ver- suchsansatz	4	8	12	16	20

Nach den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen (BOUQUET *et al.* 1982; RAJASEKARAN und MULLINS 1983; YAE *et al.* 1990; GRAY und BENTON 1991), die sich mit der Antherenkultur der Rebe beschäftigten, wurde das Basalmedium (BM) nach NITSCH und NITSCH (1969) leicht modifiziert: 266 mg  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$  statt 166 mg  $\cdot l^{-1}$   $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$  und 50 mg  $\cdot l^{-1}$  Fe(III)-NaEDTA anstelle von 37,3 mg  $\cdot l^{-1}$   $Na_2EDTA + 27,8 mg \cdot l^{-1} FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , Saccharosekonzentration 2 %. Nach zwei aufeinanderfolgenden Kultivierungsschritten auf dem Basalmedium erfolgte eine Subkultur auf ein modifiziertes Nährmedium (Subkulturmedium = SM) nach LINSMAIER und SKOOG (1965) mit denselben Veränderungen (Ersatz von Chlorid durch Nitrat, Fe-Komponente) wie beim Basalmedium (Saccharosekonzentration 3 %). Dieser Medienwechsel zur Induktion intakter Pflanzen aus Keimlingen hatte sich schon in den Untersuchungen von REUSTLE (1989) bewährt und konnte durch eigene Vorversuche bestätigt werden.

Alle Nährmedien wurden mit  $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  Difco-Bacto-Agar verfestigt, der pH-Wert auf 5,8 eingestellt und dann sterilisiert ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 1,1 bar; 20 min). In Abständen von 4 Wochen wurden die Explantate auf frisches Medium umgesetzt, die Kultivierung erfolgte bis zum sichtbaren Sprossansatz in Dauerdunkel bei  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  in Multischalen, anschließend auf SM-1 in 14stündiger Photoperiode bei  $40\text{--}50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . 14 d nach der Überführung in Lichtbedingungen bildeten sich die ersten Einzelsprosse und Wurzelansätze, nach weiteren 21 d war eine normale Pflanzenentwicklung zu beobachten.

### Ergebnisse

**Kühlung des Ausgangsmaterials:** Um den Einfluß einer Vorkühlung der Infloreszenzen zu untersuchen, wurden diese für 4 d in  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  (dunkel) gestellt, die Antheren präpariert und auf das Nährmedium aufgelegt. Die Kühlung der Antheren erfolgte zur besseren Inkubation für 4 d bei  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  in Flüssigmedium (BM-1), danach wurden die Antheren auf Festmedium unter normalen Kulturbedingungen weiterkultiviert. Als Kontrolle diente ungekühltes Ausgangsmaterial. Die erste Auswertung erfolgte im Keimlingsstadium (Abb. 1).

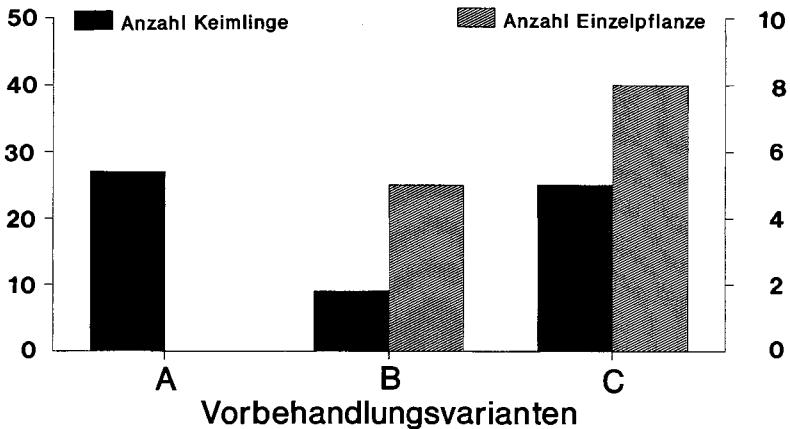


Abb. 1: Einfluß einer Kühlung auf Keimung und Einzelpflanzenentwicklung von somatischen Embryonen aus Antheren der Rebsorte Riesling. A = ungekühltes Material, B = Kühlung der Gescheine, C = Kühlung der Antheren.

Effect of chilling periods on germination and single shoot development from somatic embryos derived from anthers of grapevine cv. Riesling. A = unchilled material, B = chilling of inflorescences, C = chilling of excised anthers.

**Dauer der Kühlung:** Die positive Wirkung der Kühlung von Antheren auf die Regenerationsrate machte es notwendig, auch die Kühldauer zu überprüfen. Das Ergebnis läßt erkennen, daß eine Kühldauer von weniger als 4 d zu keiner Verbesserung der Regenerationsrate führte (Abb. 2).

**Induktionstemperatur:** Zur Untersuchung des Temperatureffektes auf die Kallusinduktion an Rebantheren wurde eine durchgehende Temperatur von  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  (Kontrolle) mit einer Temperatur von  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  in den ersten 4 Wochen der Kultivierung verglichen.

Eine Reduktion der Kallusinduktionstemperatur von  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  auf  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  führte zum Absterben aller aufgelegten Antheren innerhalb von 3 Wochen. Die Erhöhung der

Kulturtemperatur auf 32 °C hatte zunächst im Vergleich zur Standardtemperatur von 27 °C eine schwache Steigerung der Embryogenese zur Folge (Tab. 2). Der weitere Entwicklungsverlauf über Keimung bis zur bewurzelten Einzelpflanze aber war bei permanenter Standardtemperatur von 27 °C günstiger, so daß eine wesentlich höhere Ausbeute an Regeneraten erzielt werden konnte.

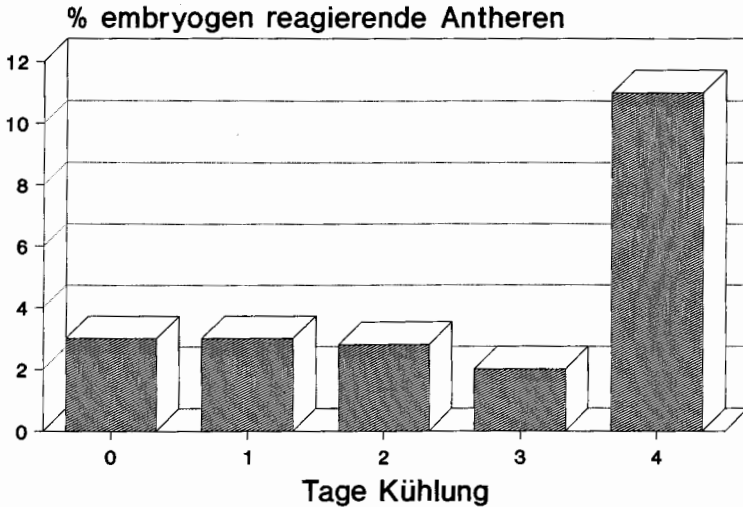


Abb. 2: Einfluß der Kühldauer von Antheren der Rebsorte Riesling auf die somatische Embryogenese.

Effect of anther chilling on somatic embryogenesis of grapevine cv. Riesling.

Tabelle 2

Einfluß unterschiedlicher Kulturtemperaturen während der Kallusinduktion an Antheren der Rebsorte Riesling

Formation of embryos and plantlets on anthers of the grapevine cv. Riesling: Effect of different culture temperatures during callus induction

Entwicklungsstadium	Kulturtemperatur		
	+15 °C	+27 °C	+32 °C
embryogen reagierende Antheren [in %]	0	9	11
Anzahl an Keimlingen	0	207	105
Anzahl an Einzelpflanzen	0	56	39

**Dauer der Kallusinduktionsphase und verschiedene Cytokinine:** Um eine möglichst rasche Embryogenese zu induzieren, wurde die Dauer der Kallusinduktion auf BM-1 von 1 bis 4 Wochen variiert. Die anschließende Subkultivierung wurde auf dem BM mit unterschiedlichen Cytokinin durchgeföhrt und nach 4 Wochen ausgewertet (Abb. 3).

Eine einwöchige Kultur auf BM, gefolgt von einer Subkultivierung auf einem Medium mit 10 µM BAP, ergab die höchste Embryogeneserate mit über 7 % der angesetzten Antheren. Mit einer Rate von 5 % war die Subkultivierung auf einem Medium

mit 10  $\mu\text{M}$  TDZ nach einer 2wöchigen Vorkultur auf BM erfolgreich. Indessen führte eine hormonfreie Subkultivierung, unabhängig von der Dauer der Kallusinduktion, nur zu einer Embryogeneserate von 1,3–2,8 %.

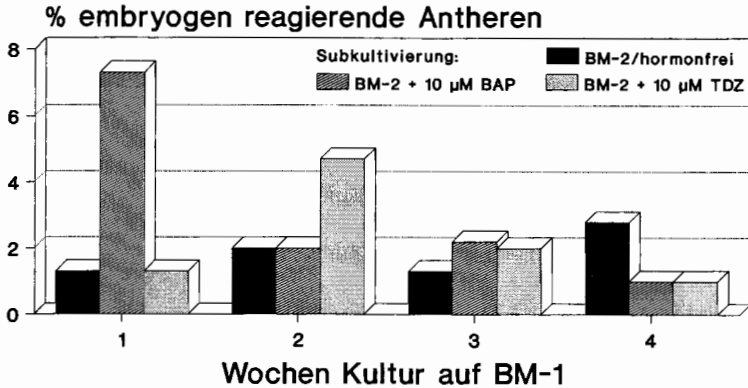


Abb. 3: Einfluß der Kulturdauer auf dem Kallusinduktionsmedium und Anwendung von Cytokinin im Subkulturmedium auf die somatische Embryogenese von Antheren der Rebsorte Riesling.

Somatic embryogenesis on anthers of grapevine cv. Riesling: Effect of the precultivation period on callus induction medium (1–4 weeks) and of cytokinins in the subculture medium.

### Diskussion

Voraussetzung für den Einsatz der Antherenkultur in der Züchtungspraxis ist eine befriedigende Regenerationsrate an züchterisch und weinbaulich interessanten Genotypen. Hier wurde deshalb die für mitteleuropäische Weinbauggebiete relevante Rebsorte Riesling als Testsorte herangezogen. Versuche zur erfolgreichen Induktion somatischer Embryonen an Riesling-Antheren durch Variation der Hormonkomponenten und -konzentrationen wurden auch von HIRABAYASHI und AKIHAMA (1982) sowie von STAMP und MEREDITH (1988) durchgeführt.

Eine *Kühlung der Infloreszenzen* vor der Präparation der Antheren hatte sich bei mehreren Rebgenotypen als positiv erwiesen (RAJASEKARAN und MULLINS 1979; BOUQUET *et al.* 1982; MAURO *et al.* 1986; GRAY und MORTENSEN 1987). Insbesondere bei der Rebsorte Riesling wirkte sich eine Vorkühlung für 4 d bei +4 °C förderlich auf die somatische Embryogenese aus (vgl. auch REUSTLE 1989). Hingegen konnten HIRABAYASHI *et al.* (1976) und HIRABAYASHI und AKIHAMA (1982) sowie STAMP und MEREDITH (1988) Embryonen an Antheren von Riesling auch ohne vorherige Kühlung induzieren. Die Differenzierung der Embryonen zu intakten Pflanzen erfolgte, wie die vorliegenden Ergebnisse belegen, besonders zahlreich nach Kühlung der Infloreszenzen, besser nach Kühlung der Antheren. Vergleichbare Untersuchungsbefunde wurden bei *Vitis* nur von RAJASEKARAN und MULLINS (1979) sowie bei anderen perennierenden Spezies, wie bei *Malus* von JOHANSSON *et al.* (1982) und JOHANSSON (1986) erhalten.

Für eine ausreichende Induktion somatischer Embryonen ist die *Dauer der Kühlphase* entscheidend: Bei einer Ausdehnung auf 4 d stieg die Rate embryobildender Antheren sprunghaft von etwa 2 auf 11 % an. Zwar stellten viele Autoren einen fördernden Effekt einer 4tägigen Kühlung der Infloreszenzen auf die Embryogenese fest (RAJASEKARAN und MULLINS 1979; BOUQUET *et al.* 1982; MAURO *et al.* 1986; GRAY und

MORTENSEN 1987; REUSTLE 1989), Untersuchungen zur Kühldauer lagen jedoch nicht vor. Ob noch längere Kühlphasen oder eine Variation der Kühltemperatur zu einer weiteren Steigerung der Embryogeneserate führen könnten, mußte zunächst offen bleiben.

Vielfach wird berichtet, daß eine Herabsetzung der *Kulturtemperatur in der Kallusinduktionsphase* auf 12 bis 15 °C wie bei *Oryza sativa* (YAMAGUCHI *et al.* 1990) oder *Zea mays* (BÜTER *et al.* 1990) oder eine Erhöhung auf 32–35 °C wie bei *Triticum aestivum* (BOYADZHIEV 1986; OUYANG *et al.* 1987; LI *et al.* 1988), *Sorghum bicolor* (ROSE *et al.* 1986), oder bei *Brassica*-Arten (KWON *et al.* 1989; BIDDINGTON und ROBINSON 1990; GOYAL *et al.* 1990; FABLIANSKI *et al.* 1991; HAMAOKA *et al.* 1991) die Embryogenese fördert. Bei *Vitis* aber hatte sowohl eine niedrige (15 °C) als auch eine hohe (32 °C) Kulturtemperatur einen negativen Effekt, so daß die Beibehaltung der normalen Kulturtemperatur von 27 °C über die Dauer der gesamten Kultivierung von der Kallusinduktion bis zur Regeneration der bewurzelten Einzelpflanze die besten Resultate liefert.

Eine deutlich verbesserte Embryogenese konnte nur erzielt werden, wenn nach einer 1–2wöchigen *Dauer der Kallusinduktionsphase* eine *Subkultivierung* auf Medien mit entweder BAP oder TDZ durchgeführt wurde. Wichtig ist, daß eine relativ kurze Kallusinduktionsphase nur in Verbindung mit einer Subkultivierung auf ein Cytokinin-haltiges Medium wirksam ist, was mit den Erfahrungen von AMMIRATO (1983) korrespondiert.

Oftmals finden sich Hinweise auf einen wachstumsfördernden Effekt einer Kühlung somatischer Embryonen der Rebe (RAJASEKARAN und MULLINS 1979, 1983; MAURO *et al.* 1987; GRAY und MORTENSEN 1987; CERSOSIMO *et al.* 1990). KRUL (1985) allerdings beobachtete eine Beeinträchtigung der Pflanzenentwicklung und REUSTLE (1989) fand, daß eine Kühlung nur in Kombination mit einer Cytokinin-Behandlung eine Steigerung der Ausbeute intakter Pflanzen ergab. Auch MAURO *et al.* (1986) weisen auf einen notwendigen Einsatz von Cytokinin zur Einzelpflanzenentwicklung hin.

### Literatur

- AMMIRATO, P. V.; 1987: Organizational events during somatic embryogenesis. In: GREENE, C. E.; SOMERS, D. A.; HACKETT, W. P.; RIESBOER, D. D. (Eds.): *Plant Biology*, Vol. 3 *Plant Tissue and Cell Culture*, 57–81.
- BIDDINGTON, N. L.; ROBINSON, H. T.; 1990: Variation in response to high temperature treatments in anther culture of Brussels sprouts. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **22** (1), 48–54.
- BOUQUET, A.; PIGANEAU, B.; LAMAISON, A. M.; 1982: Influence de génotype sur la production de cals, d'embryoides et de plantes entières par culture d'anthers *in vitro* dans le genre *Vitis*. C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. III, 569–574.
- BOYADZHIEV, P.; 1986: Callus genesis and regeneration in anther cultures of bread wheat hybrid combinations. *Rasteniievod. Nauk.* **23** (2), 10–14.
- BÜTER, B.; SCHMID, J. E.; STAMP, P.; 1990: Effects of L-prolin and post-plating temperature treatment on maize (*Zea mays* L.) anther culture. *Plant Cell Rep.* **10**, 325–328.
- CERSOSIMO, A.; CRESPIAN, M.; PALUDETTI, G.; ALTAMURA, M. M.; 1990: Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration from anther culture in *Vitis*. *Acta Hort.* **280**, 307–314.
- FABLIANSKI, S. F.; ALTOSAAR, I.; ARNISON, P. G.; 1991: Heat shock response during anther culture of broccoli *Brassica oleracea* var. *Italica*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **26**, 203–212.
- GOYAL, R. K.; JAIN, R. K.; CHOWDHURY, J. B.; 1990: Anther and somatic explant culture of *Brassica juncea* and its implications in breeding *Brassica* oilseed crops. *Indian J. Exp. Biol.* **28**, 1034–1039.
- GRAY, D. J.; MORTENSEN, J. A.; 1987: Initiation and maintenance of long-term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of *Vitis longii* 'Microsperma'. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **9**, 73–80.
- — ; BENTON, C. M.; 1991: Perennial embryogenic cell cultures of grape. *HortScience* **26**, 772.

- GRESSHOFF, P. M.; DOY, C. H.; 1974: Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. *Z. Pflanzenphysiol.* **73**, 132—141.
- HAMAOKA, Y.; FUJATA, Y.; IWAI, S.; 1991: Effects of temperature on the mode of pollen development in anther culture of *Brassica campestris*. *Physiol. Plant.* **82**, 67—72.
- HIRABAYASHI, T.; KOZAKI, I.; AKIHAMA, T.; 1976: *In vitro* differentiation of shoots from anther callus in *Vitis*. *HortScience* **11**, 511—512.
- — ; AKIHAMA, T.; 1982: *In vitro* embryogenesis and plant regeneration from anther-derived callus of *Vitis*. In: Proc. 5th Intern. Congr. Plant Tissue and Cell Culture, Plant Tissue Culture, 1982, 547—548.
- JOHANSSON, L.; 1986: Effects of activated charcoal, cold treatment and elevated CO<sub>2</sub>-concentration on embryogenesis in anther culture. In: HORN, W. (Ed.): Genetic Manipulation in Plant Breeding, 257—264. Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York.
- — ; ANDERSSON, B.; ERIKSSON, T.; 1982: Improvement of anther culture technique: Activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO<sub>2</sub>-concentration. *Physiol. Plant.* **54**, 24—30.
- KRUL, W. R.; 1985: Somatic embryo induction, expression and development: A general model. In: Amélioration de la Vigne et Culture *in vitro*. Colloque 1985, 101—120. Moët-Hennessy, Epernay, France.
- KWON, Y. C.; CHUNG, G. S.; SUH, H. S.; 1989: Anther culture of *Brassica napus*. 3. Embryogenesis from isolated microspores by shed pollen technique. *Res. Rep. Rural. Dev. Adm. (Suweon)* **31** (1 Biotechnol.), 22—26.
- LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F.; 1965: Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **18**, 120—127.
- MAURO, M. C.; NEF, C.; FALLOT, J.; 1986: Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis* cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Rep.* **5**, 377—380.
- MULLINS, M. G.; SRINIVASAN, C.; 1976: Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet Sauvignon) by apomixis *in vitro*. *J. Exp. Bot.* **27**, 1022—1030.
- NITSCH, J. P.; NITSCH, C.; 1969: Haploid plants from pollen grains. *Science* **163**, 85—87.
- OUYANG, J. W.; HE, D. G.; FENG, G. H.; JIA, S. E.; 1987: The response of anther culture to culture temperature varies with growth conditions of anther donor plants. *Plant Sci.* **49**, 145—148.
- POWELL, W.; 1988: The influence of genotype and temperature pretreatment on anther culture responses in barley *Hordeum vulgare* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **12**, 291—298.
- RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M. G.; 1979: Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J. Exp. Bot.* **30**, 399—407.
- — ; 1983: Influence of genotype and sex-expression on formation of plantlets by cultured anthers of grapevine. *Agronomie* **3**, 233—238.
- REUSTLE, G.; 1989: Untersuchungen zur Protoplastenkultur und zur somatischen Embryogenese bei Reben. Diss. Univ. Hohenheim.
- ROSE, J. B.; DUNWELL, J. M.; SUNDERLAND, N.; 1987: Anther culture of *Lolium temulentum*, *Festuca pratensis* and *Lolium* × *Festuca* hybrids. I. Influence of pretreatment, culture medium and culture incubation conditions on callus production and differentiation. *Ann. Bot. (London)* **60**, 191—202.
- SRINIVASAN, C.; MULLINS, M. G.; 1980: High frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grapes. *Sci. Hort.* **13**, 245—252.
- STAMP, J. A.; MEREDITH, C. P.; 1988: Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. *Sci. Hort.* **35**, 235—250.
- YAE, B. W.; MOON, J. Y.; CHE, H. M.; LEE, D. K.; HWANG, J. H.; 1990: Factors affecting callus induction from anthers of *Vitis in vitro*. *Res. Rep. Rural. Dev. Adm. (Suweon)* **32** (1 Hort.), 15—21.
- YAMAGUCHI, M.; YOMODA, A.; HINATA, K.; 1990: Varietal difference in response to low temperature treatment for callus formation in anther culture of rice. *Japan. J. Breed.* **40**, 193—198.