LANDBAUFORSCHUNG VÖLKENRODE, 42. JAHRGANG (1992), HEFT 2, SEITE 62 - 64

Regeneration von Pflanzen aus Blattprotoplasten von Brokkoli *(Brassica oleracea var. italica)*

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

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Zur vegetativen Vermehrung von Brokkoli können unterschiedliche Gewebeteile herangezogen werden. Arbeiten von Johnson und Mitchell (1977), Anderson und Carstens (1977), Hui und Zee (1980), Lazzeri und Dunwell (1986), Dunnemann und Grunewaldt (1987), Wang (1988), Mix-Wagner und Wang (1990) zeigen, daß eine in vitro Vermehrung möglich ist, jedoch die Sproßbildungsrate verglichen mit anderen Pflanzenarten relativ niedrig ist.

Ein hohes Vermehrungspotential bieten die Protoplasten, da theoretisch aus jeder Pflanzenzelle, die sich protoplastieren (die Zellwand entfernen) läßt, eine Pflanze regeneriert werden kann. Von mehreren Arbeitsgruppen (Glimelius, 1984; Girmen et al., 1989; Kao et al., 1990; Yarrow et al., 1990) wurde gezeigt, daß Pflanzen aus Brokkoliprotoplasten regeneriert werden können, wenn Hypokotyl als Ausgangsgewebe eingesetzt wird. Die Regeneration aus Blattprotoplasten scheint weitaus schwerer zu gelingen und wurde bisher nur von Robertson und Earle (1986) beschrieben.

1990 ist in unserer Arbeitsgruppe versucht worden, ein einfacheres Verfahren als das von Robertson und Earle (1986) für die Isolation und Kultur von Blattprotoplasten zu entwickeln (Wang und Schäfer-Menuhr, 1990). Die damals durchgeführten Arbeiten mußten wegen der Kürze des Studienaufenthaltes auf die Optimierung der Isolationsmethode und die Regeneration der Protoplasten zu Callus beschränkt werden.

Als weiterer Schritt für eine praktische Anwendung war es nun außerordentlich interessant zu wissen, ob aus den Calli Pflanzen regeneriert werden können. Im folgenden soll über die weitergeführten Versuche berichtet werden.

Material und Methoden

Die Isolation der Protoplasten aus Blättern und die Regeneration der Protoplasten zu Callus ist beschrieben worden (Wang und Schäfer-Menuhr, 1990).

Die Calli wurden, wenn sie einen Durchmesser von 5 mm erreicht hatten, zur Sproßbildung zunächst auf das Pflanzenregenerationsmedium von Girmen et al. (1989) und nach erfolgter Adventivwurzelbildung auf Ge/6 Medium (Schäfer-Menuhr, 1989) umgesetzt. Die Sprosse wurden auf MS Medium (Murashige und Skoog, 1962) umgesetzt, das 2 mg/l Calciumpantothenat, 0.25 mg/l Gibberellinsäure 3, 20 g/l Zucker und 6 g/l Agar enthielt.

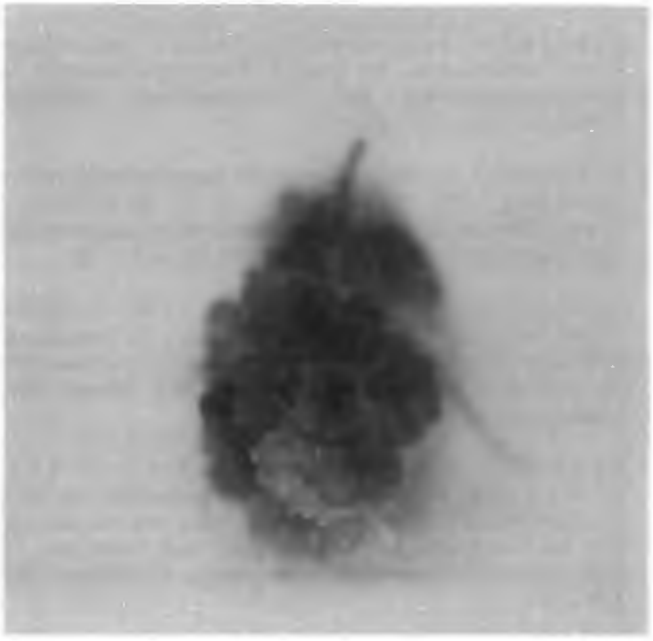

Abbildung 1: **Embryogener Callus aus Blattprotoplasten von Brokkoli, Sorte Futura**

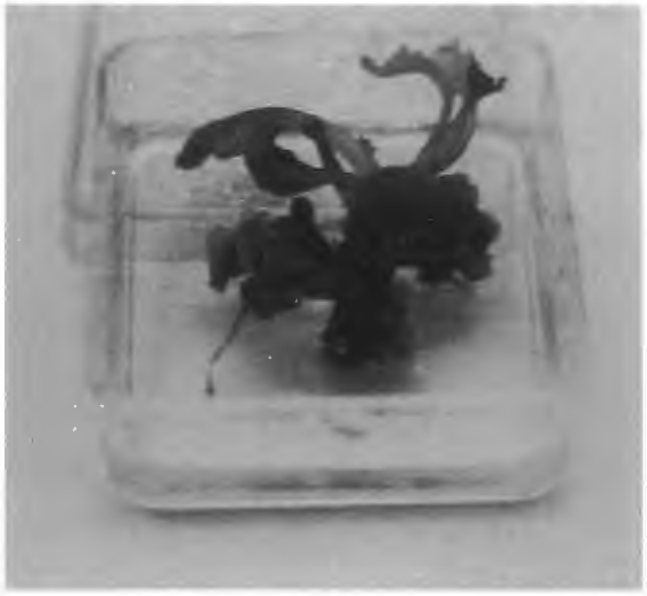

Abbildung 2: **Regenerierter Sproß aus Blattprotoplasten von Brokkoli, Sorte Futura**

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

Abbildung 3: **Rasch wachsende in vitro Pflanze aus Blattprotoplasten von Brokkoli, Sorte Futura**

Abbildung 5: **Blühende und fruchtende Pflanze aus Blattprotoplasten von Brokkoli, Sorte Futura**

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind die logische Fortsetzung der Versuche, über die kürzlich berichtet worden ist (Wang und Schäfer-Menuhr, 1990). In ersten Experimenten war untersucht worden, ob die vegetative Vermehrung von Brokkoli unter den gewählten Versuchsbedingungen möglich ist. Es war damals angestrebt worden, nicht wie üblich Hypokotyl als Ausgangsgewebe einzusetzten, sondern Blätter, um die Mutterpflanze erhalten zu können. Das Resultat dieser Versuche waren aus Blattprotoplasten erhaltene Calli, die Wurzeln bildeten. In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob diese Calli in der Lage waren, Pflanzen zu regenerieren.

Für diese Experimente wurden die Calli der Sorte Futura verwendet. Die Calli wurden auf das Regenerationsmedium von Girmen et al. (1989) umgesetzt, wenn sie eine Größe von 5 mm erreicht hatten. Es wurde entweder ein Callus in eine 3 cm große oder 4 Calli in eine 5 cm große Petrischale umgesetzt. War die Petrischale im Verhältnis zur Callusmasse zu groß, war häufig eine Degeneration der Calli zu beobachten. Wie bei Wang und Schäfer-Menuhr (1990) beschrieben, bildeten die Calli auf den verwendeten Medien Adventivwurzeln aus. Obwohl auf den Calli embryoide Strukturen zu sehen waren (Abbildung 1), entwickelten sich keine Pflanzen. Anscheinend war das Medium für die Sorte Futura, im Gegensatz zu der von den Autoren verwendete Sorte Prominence, nicht optimal.

Abbildung 4: **Ins Gewächshaus überführte Pflanzen aus Blattprotoplasten von Brokkoli, Sorte Futura**

Zur Induktion von Sprossen wurden Teile der Calli auf Ge/6 Medium umgesetzt und mit flüssigem MS Medium, das 5 mg/l 6-Benzylaminopurin enthielt, beträufelt. Nach etwa 8 Wochen entwickelten sich erste Sprosse (Abbildung 2). Es war dabei unklar, ob es sich um eine de novo Sproßinduktion handelte oder um das Auskeimen schon vorhandener Embryonen.

Die Pflänzchen wuchsen sehr rasch. Nach wenigen Tagen wurden sie in 50 ml Erlenmeyerkolben mit MS Medium umgesetzt (Abbildung 3). Nach 2 Wochen war genügend Wurzelmasse vorhanden, daß sie in größere Gefäße, die Perlite enthielten, das mit verdünnter MS Salzlösung angefeuchtet worden war, überführt werden konnten. Nach

weiteren drei Wochen wurden die Pflanzen in sterilisierte Erde gepflanzt und im Gewächshaus weiterkultiviert. In den ersten Tagen wurden die Pflanzen mit Plastikbechern gegen Austrocknen geschützt. Es gab keine Probleme bei der weiteren Anzucht der Pflanzen (Abbildung 4), die bis zum Abblühen im Gewächshaus gehalten wurden (Abbildung 5). Der einzige Unterschied zu aus Samen gezogenen Pflanzen bestand in einer stärkeren Verzweigung der Sprosse.

Die Weiterführung der Experimente von 1990 hat gezeigt, daß es möglich ist, Pflanzen aus Blattprotoplasten von Brokkoli zu erhalten. Die verwendete Methode beinhaltet weniger Arbeitsschritte für die Regeneration der Protoplasten als die Methode von Robertson und Earle (1986). In weiteren Schritten wird es erforderlich sein, die Callus- und Sproßbildungsrate zu erhöhen.

Zusammenfassung

Aus Blättern von Brokkoli *(Brassica oleracea var. italica)* der Sorte Futura waren Mesophyllprotoplasten isoliert und kultiviert worden. Auf Regenerartionsmedien bildeten die Calli Adventivwurzeln aus. Sprosse wurden erhalten, wenn die Calli mit MS Medium behandelt wurden, das 5 mg/l 6-Benzylaminopurin enthielt. Die Pflanzen entwickelten sich rasch und wurden nach einer Abhärtungsphase ins Gewächshaus überführt.

Regeneration of plants from leaf protoplasts of broccoli *(Brassica oleracea var. italica)*

Protoplasts from mesophyll were isolated and cultured from leaves of broccoli *(Brassica oleracea var. italica)* cv. Futura. Calli developed adventitious roots after transfer to regeneration media. Shoots were obtained when the calli were treated with MS medium containing 5 mg/l 6-benzylaminopurine. Plantlets developed fast and could be transferred to the green house after a short period of hardening.

Literatur

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

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

Girmen, M., Backes, R. and Grunewaldt, J.: Plant Regeneration from *Brassica oleracea var. italica* (Broccoli) Protoplasts. - Vorträge für Pflanzenzüchtung Heft 15 (1989), Book of Poster Abstracts XII. Eucarpia Congress, Göttingen.

Glimelius, K.: High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae. - Physiologica Plantarum 61 (1984), S. 38 - 44.

Hui, L.H. and Zee, S.-Y.: The effects of Ginseng on the plantlets regeneration % of cotyledonen and hypocotyl explants of broccoli. - 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. - Hort. Sci. 13 (1978), S. 246 - 247.

Kao, H.M., Keller, W.A., Gleddie, S. and Brown, G.G.: Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts of broccoli (*Brassica oleracea L. ssp. italica* Plenck). - Plant Cell Reports 9 (1990), S. 311 - 315.

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. - Annals of Botany 58 (1986), S. 689 - 697.

Mix-Wagner, G. und Wang, H.-M.: Regeneration von bakterienfreien Brokkolipflanzen durch in vitro Knospenkultur Lagerung - Landbauforschung Völkenrode 40 (1990), S. 251 - 256.

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

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

Schäfer-Menuhr, A.: Isolation and Kultur von Lupinenprotoplasten. IV. Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten. - Landbauforschung Völkenrode 39 (1989), S. 133 - 136.

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

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

Wetter, L.R. and Constabel, F. (Hrsg.): Plant Tissue Culture Methods. - N.R.C.C., Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Sask., Canada (1982).

Yarrow, S.A., Burnett, L.A., Wildeman, R.P. and Kemble, R.J.: The transfer of "polioma" cytoplasmic male sterility from oilseed rape *(Brassica napus)* to broccoli *(B. oleracea)* by protoplast fusion. - Plant Cell Reports 9 (1990), S. 185 - 188.

Verfasser: Wang, Huai-Ming, Prof., Beijing Vegetable Research Centre, Beijing, Studienaufenthalt im Rahmen der "Deutsch-chinesischen Zusammenarbeit im Bereich der Agrarforschung";

Schäfer-Menuhr, Angelika, Dr. agr., DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.

Mix-Wagner, Gunda, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. agr. M. Dambroth.