

Isolation und Kultur von Blattprotoplasten von Brokkoli (*Brassica oleracea var. italica*)

WANG HUAI-MING* und ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Wang und Mix-Wagner haben kürzlich beschrieben (1990), daß ein hoher Bedarf an geklonten Brokkolipflanzen für die Herstellung von Hybridsaatgut besteht. Neben der in vitro Knospenkultur (Wang und Mix-Wagner, 1990 und dort zit. Literatur) sollte deshalb auch versucht werden, die Methode der Protoplastenkultur für die vegetative Vermehrung einzusetzen.

Die Regeneration von Pflanzen aus Brokkoliprotoplasten ist beschrieben worden (Glimelius, 1984; Robertson und Earle, 1986; Robertson et al., 1988; Girma et al., 1989). Anscheinend gelingt die Regeneration leichter, wenn junges Material wie Hypokotyl eingesetzt wird (Glimelius, 1984; Girman et al., 1989). Vom praktischen Standpunkt aus gesehen, ist die Protoplastengewinnung aus Blättern erstrebenswerter, weil die Mutterpflanze erhalten werden kann. Die beschriebene Methode für die Regeneration von Blattprotoplasten (Robertson und Earle, 1986) ist jedoch für eine Anwendung im größeren Maßstab zu arbeitsintensiv. Es sollte daher überprüft werden, ob durch Modifikationen die Kultur der Protoplasten vereinfacht werden kann. In der vorliegenden Arbeit werden erste Ergebnisse aufgeführt.

Material und Methoden

Für die Anzucht der Ausgangspflanzen wurden Samen von den Sorten: Atlantik, Corvet, Futura, Green Viliant, Green Charger, Juwaprim, Neptune und Skiff in 75%igem Ethylalkohol für 1 min und 2%iger Calciumhypochloridlösung für 12 min desinfiziert. Nach Waschen mit sterilem destilliertem Wasser wurden je 15-20 Samen auf hormonfreies 1:2 verdünntes MS Medium (Murashige und Skoog, 1968), das 1% Saccharose und 0.8% Agar enthielt, gelegt und im Hellen bei 25°C gekeimt. Nach etwa einer Woche wurden die Spitzen in einer Länge von 1 cm auf MS Medium gesetzt, das pro Liter 170 mg NaH₂PO₄, 3-6 mg Kinetin, 0.05 mg IAA, 3% Saccharose und 0.8% Agar enthielt. Die nach 4-6 Wochen gebildeten Sprosse wurden in vitro auf 1:2 verdünntem MS Agarmedium, das 1% Saccharose und 0.5 mg/l Kinetin enthielt, weiter über Nodien vermehrt (Abb. 1).

Die Kulturbedingungen für die Sproßkulturen und Protoplasten waren 23°C, 16 h Licht, 4-6 klx.

Die Enzyme Cellulase Onozuka R-10 (Serva), Macerozym R-10 (Serva) und Cellulysin (Calbiochem) wurden vor Verwendung wie bei Wetter und Constabel (1982) beschrieben über Biogel P-6 gereinigt und gefriergetrocknet. Die Pectinase (Sigma) wurde direkt eingesetzt. Die Enzyme

wurden in Waschlösung pH 6.8 gelöst. Die Lösung enthielt 0.7 mM NaH₂PO₄, 6.8 mM CaCl₂, 0.5 mM 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) und 0.3 M Mannit (0.3 M Waschlösung) oder 0.4 M Mannit (0.4 M Waschlösung). Der pH-Wert wurde auf 5.5 oder auf 6.8 eingestellt.

Zur Isolation der Protoplasten wurden Blätter unter aseptischen Bedingungen abgeschnitten, bei einigen Versuchen wurde die untere Epidermis der Blätter abgezogen, in etwa 2 mm² große Stücke zerschnitten und in 5 ml Enzymlösung gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 50 Upm und 23°C wurde der Ansatz mit 2 ml Waschlösung pH 5.5 verdünnt und noch weitere 1-2 h inkubiert. Zur Abtrennung unverdauter Blattreste wurde der Enzymverdau durch ein Gewebe mit engen Poren filtriert. Das Filtrat wurde bei 100xg 5 min zentrifugiert und 2x mit 5 ml Waschlösung pH 5.5 gewaschen. Wurden die Protoplasten auf Saccharose floatiert, wurde das erste Protoplastenpellet in 3 ml Saccharoselösung (0.5 M Saccharose, 5 mM MES, pH 5.8) suspendiert, mit 1 ml Waschlösung pH 5.5 überschichtet und 10 min bei 100xg zentrifugiert. Die Protoplastenbande in der Grenzschicht von Saccharoselösung und Waschlösung wurde abgesaugt, mit 8 ml Waschlösung verdünnt und erneut pelletiert. Die Protoplasten wurden bei einer Dichte von 105 Protoplasten/ml

Abbildung 1: In vitro Sproßkultur 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.

tropfenweise in Petrischalen gesetzt. In jeden Protoplasten-tropfen wurde ein Tropfen warme flüssige Agarose (1% Agarose in Waschlösung pH 5.5) seitlich zugespritzt. Nach 5 min wurde 1 ml flüssiges Nährmedium zugegeben. Die Kultur erfolgte in quadratischen Petrischalen (35 x 35 mm), die zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit in Klarsichtdosen mit Wassergefäßen gestellt worden waren.

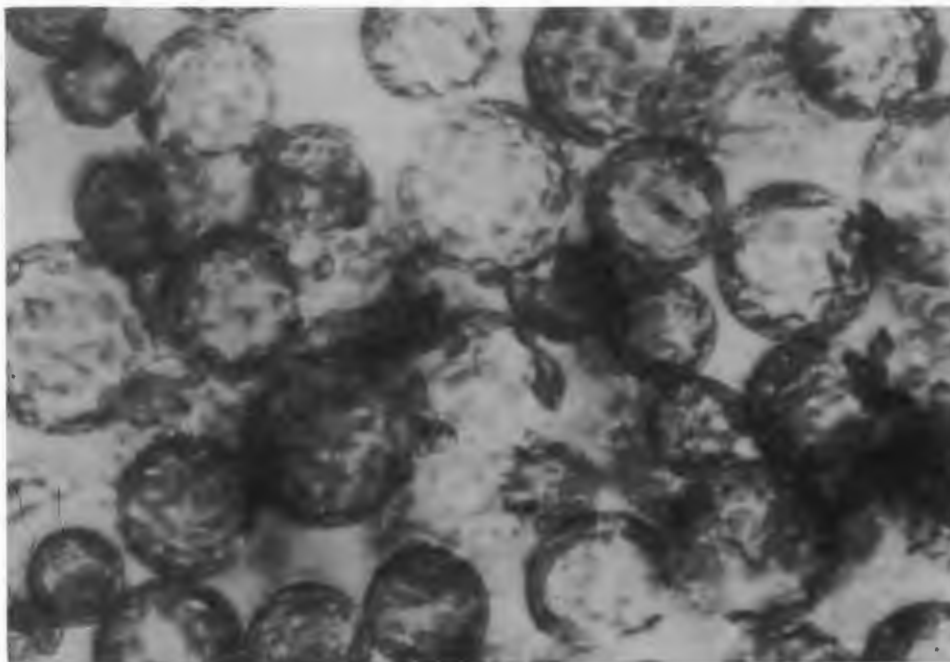
Die Kulturmedien T19/1, WT19/1 und T basierten auf dem Grundmedium T (Schäfer-Menuhr, 1989), die Medien G1, G2 und G3 auf dem Grundmedium G (Girma et al., 1989). T19/1 und G1 enthielten 150 mM Saccharose und 150 mM Mannit, WT19/1 und G2 enthielten 150 mM Saccharose und 250 mM Mannit, T und G3 enthielten 400 mM Glucose. Alle Medien enthielten 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA und 0.5 mg/l BA.

Abkürzungen: 6-Benzylaminopurin (BA), (2,4 Dichlorphenoxy)-essigsäure (2,4-D), Indol-3-essigsäure (IAA), Kinetin (Kin) und 1-Naphthyllessigsäure (NAA).

Ergebnisse und Diskussion

Protoplasten stellen an sich ein hohes Vermehrungspotential dar, da theoretisch aus jedem Protoplasten eine Pflanze gewonnen werden kann. Diesem Vorteil stehen mehrere Nachteile gegenüber, von denen zwei am gravierendsten sind. Auch wenn in der Literatur beschrieben worden ist, daß Pflanzen aus Protoplasten einer bestimmten Pflanzenart regeneriert werden konnten, bedeutet es in der Praxis, daß ein gewisses Maß an Vorarbeit nötig ist, um das System im eigenen Labor zu etablieren. Diese Zeit kann kurz sein, wenn die erforderliche Ausrüstung und das Know-How für die Kultur von Protoplasten anderer Pflanzenarten vorhanden ist. Der zweite wichtige Gesichtspunkt ist das Problem der somaklonalen Variation. Während bei der "klassischen" vegetativen Vermehrung, die über Nodien erfolgt, in den meisten Fällen auf Phytohormone verzichtet werden kann, sind Phytohormone für die Kultur von Protoplasten unbedingt erforderlich. Es besteht also die Gefahr, daß die regenerierten Klone nicht identisch sind.

Abbildung 2: Gereinigte Protoplastenfraktion



Trotz der angeführten Nachteile war es in diesem Arbeitsprogramm wünschenswert, die Methode der Protoplastenkultur für die vegetative Vermehrung auszuprobieren, um sie eventuell später als zweiten Schritt für die Protoplastenfusion oder genetische Manipulation einzusetzen.

In den ersten Versuchen wurden die Blätter von der Spenderpflanze abgeschnitten, in Medium gelegt und mit Hilfe von Pinzetten die untere Epidermis entfernt. Als Enzyme wurden die Kombinationen 2% Onozuka R-10 + 1% Macerozym R-10, 1.5% Onozuka R-10 + 0.75% Macerozym R-10, 1% Onozuka R-10 + 0.5% Macerozym R-10, 1% Cellulysin + 0.5% Macerozym R-10 und 1% Cellulysin eingesetzt. Die Enzyme waren in 0.4 M Waschlösung pH 6.8 gelöst. Die präparierten Blattstücke wurden in der Enzymlösung zerschnitten und wie angegeben geschüttelt. Der Enzymverdau wurde unter einem Invertoskop beobachtet. Wurde nur Cellulysin eingesetzt, wurden nur sehr wenige Protoplasten gebildet. Bei allen anderen Behandlungsstufen waren nach 30 min Protoplasten gebildet worden. Nach weiterer Inkubation vermehrte sich der Anteil an Protoplasten, auch nachdem der Ansatz verdünnt worden war. Die Protoplasten wurden nach einer Gesamtinkubationszeit von 3 h gereinigt und anschließend kultiviert. Nach der Reinigung zeigte sich jedoch, daß die Präparationen zu mehr als 50% instabile Protoplasten enthielten, deren Anteil sich in wenigen Tagen weiter erhöhte. Nur von einer Präparation wurde Callus erhalten.

Da sich ein großer Anteil der Protoplasten während der Reinigung veränderte, wurde überprüft, ob die Protoplasten bei etwas langsamerer Freisetzung und geringerer Osmolarität stabiler sind. Verglichen wurden direkt zerschnittene Blätter und zerschnittene Blätter, denen vorher die Epidermis entfernt worden ist, in Enzymlösungen, die 0.3 oder 0.4 M Mannit enthielt. Nach einer Stunde Inkubation hatten sich in allen Behandlungsstufen Protoplasten gebildet. Die Enzymsätze wurden entsprechend verdünnt und weiter inkubiert. Nach insgesamt 3 h wurden die verschiedenen Präparationen gereinigt. Hier zeigte sich, daß die nur zerschnittenen Blätter reinere Protoplastenpräparationen lieferten als die, bei denen die Epidermis der Blätter vorher entfernt worden war. Darüber hinaus waren die Protoplasten nach einem Tag in der 0.3 M Waschlösung vitaler als in der 0.4 M Waschlösung.

Während der oben angeführte Versuch mit 1% Onozuka R-10 und 0.5% Macerozym R-10 durchgeführt worden war, wurde in weiteren Versuchen 1% Cellulysin in Kombination mit 0.2% Macerozym R-10 oder 0.5% Macerozym R-10 eingesetzt. Alle Behandlungsstufen lieferten vitale Protoplasten. Nach wenigen Tagen Kulturdauer zeigten sich Degenerationserscheinungen, die allmählich zum Absterben des gesamten Ansatzes führten.

Um zu überprüfen, ob ungeeignete Kulturmedien für die Degeneration der Protoplasten verantwortlich sind, wurde die Stabilität der Protoplasten in 6 verschiedenen Kulturmedien überprüft und mit der Stabilität in 0.3 und 0.4 M Waschlösung

Abbildung 3: Erste Zellteilungen



verglichen. Nach 1 Tag Kulturdauer waren die Protoplasten am vitalsten in 0,3 M Waschlösung, in T19/1, in G2 und G3. Nach 4 Tagen Kulturdauer waren noch vitale Protoplasten in 0,3 M Waschlösung, in T19/1 und G2 vorhanden. Da sich die drei Lösungen in der Zusammensetzung stark voneinander unterscheiden, lag der Schluß nahe, daß das Kulturmedium nicht alleine die Degeneration der Protoplasten verursachen kann. Die Qualität der Protoplastenpräparation scheint eine viel größere Rolle zu spielen.

Abbildung 4: Callus mit Wurzeln und beginnender Embryobildung



waren nach einem Tag Kulturdauer die Protoplasten stabiler, die kürzere Zeit mit Enzymen behandelt worden waren. Es ist daher anzunehmen, daß die Protoplasten durch die Enzymbehandlung geschädigt werden.

In weiteren Versuchen wurde 1% Cellulysin eingesetzt, entweder in Kombination mit Macerozym oder mit Pectinase (Sigma). Die Protoplasten waren stabiler, wenn Cellulysin in Kombination mit Pectinase eingesetzt wurde. Macerozym R-10 kann bis zu einer Konzentration von 0,2% eingesetzt werden. Bei der Pectinase war ein Zusatz von 4%(v/v) ausreichend, um eine ausreichende Menge an Protoplasten freizusetzen. Nach Reinigung und Flootation auf Saccharoselösung wurden die Protoplasten entweder in T19/1 oder G2 kultiviert. Da im dichten Bereich im Agarostropfen einzelne Protoplasten nicht beobachtet werden können, sondern nur in den Randzonen, konnten erst nach einer Woche erste Zellteilungen (Abb. 3) beobachtet werden, Mikrocalli waren nach 2 Wochen erkennbar.

Die Callusbildung war bei dem verwendeten System sortenabhängig. Von den 8 untersuchten Sorten wurde von "Futura", "Neptune" und "Skiff" Callus erhalten. Nachdem 2-3 mm große Calli auf Differenzierungsnährböden gesetzt worden waren, bildete ein großer Anteil der Calli innerhalb von 2 Wochen Wurzeln aus. Auf einigen Calli entwickelten sich nach längerer Kulturdauer Embryonen (Abb. 4). Sprosse wurden noch nicht erhalten.

Die oben angeführten Versuchsergebnisse sind erst der erste Schritt für einen eventuellen Einsatz der Protoplastenkultur für die vegetative Vermehrung. Nachdem die Isolations- und Kulturbedingungen optimiert worden sind, ist es in einem zweiten Versuchsansatz notwendig, die Bedingungen für die Differenzierung zu optimieren.

Zusammenfassung

Die Methode zur Isolation von Protoplasten aus Blättern von Brokkoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) wurde für die

Robertson und Earle (1986) haben einen zusätzlichen Reinigungsschritt nach der Protoplastenisolation eingeführt und zwar werden die Protoplasten mit Saccharoselösung vermischt. Nach Zentrifugation erhält man auf der Saccharoselösung die Protoplastenbande, während Bruchstücke, Zellen und verformte Protoplasten pelletieren. In der Protoplastenbande sind zu mehr als 90% Protoplasten erhalten (Abb. 2). Ein Nachteil bei diesem Reinigungsschritt sind die relativ hohen Verluste an Protoplasten. In einem ersten Versuch wurden Protoplasten mit 1% Onozuka R-10 und 0,5% Macerozym hergestellt. Nach 1 h wurden die Protoplasten verdünnt und eine weitere Stunde inkubiert. Ein Teil der Protoplasten wurde nach insgesamt 2 h abzentrifugiert, ein anderer Teil nach insgesamt 3 h. Während die Ausbeute an reinen Protoplasten bei beiden Versuchsansätzen etwa gleich hoch waren,

Sorten Atlantik, Corvet, Futura, Green Viliant, Green Charger, Juwaprim, Neptune und Skiff optimiert. Am vitalsten waren die Protoplasten, wenn sie in einer Enzymlösung hergestellt wurden, die 1% Cellulysin und 4% (v/v) Pectinase enthielt. Eine hohe Anreicherung und bessere Überlebensfähigkeit der Protoplasten wurde durch Flootation auf 0.5 M Saccharoselösung erreicht. Von den Sorten Futura, Neptune und Skiff wurde Callus erhalten. Ein großer Anteil der Calli bildeten Wurzeln aus. Auf einigen Calli entwickelten sich nach längerer Kulturdauer Embryonen.

Isolation and culture of leaf protoplasts of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)

The method for the isolation of leaf protoplasts of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) was optimized for the cultivars: Atlantik, Corvet, Futura, Green Viliant, Green Charger, Juwaprim, Neptune and Skiff. Protoplasts had a high vitality when prepared in an enzyme solution containing 1% cellulysin and 4% (v/v) pectinase. High enrichment and better survival of the protoplasts was achieved by floatation on 0.5 M sucrose solution. Leaf protoplasts of the cultivars Futura, Neptune and Skiff regenerated into callus. A large portion of the calli developed roots. After further cultivation also somatic embryos could be obtained.

Literatur

Girmen, M., Backes, R. und 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.

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

Murashige, T. und 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.

Robertson, D., Earle, E.D. and Mutschler, A.A.: Increased totipotency of protoplasts from *Brassica oleracea* plants previously regenerated in tissue culture. - *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 14 (1988), S. 15-24.

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

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

Verfasser: Schäfer-Menuhr, Angelika, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Institutsleiter Prof. Dr. agr. M. Dambroth; Wang, Huai-Ming, Prof., Beijing Vegetable Research Centre, Beijing. Studienaufenthalt im Rahmen der "Deutsch-chinesischen Zusammenarbeit im Bereich der Agrarforschung".