

## Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten IV. Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten

ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

### Einleitung

Ein großes Problem für die Lupinenzüchter sind die stark ausgeprägten Kreuzungsbarrieren zwischen den Arten, die es unmöglich machen, Arten amerikanischen Ursprungs mit unseren Kulturformen zu kreuzen. Seit einigen Jahren wird daher versucht, *in vitro* Techniken in die Züchtungsarbeit zu integrieren. Die vorrangig wichtigsten Methoden sind zur Zeit die Embryokultur abortiver Embryonen (*embryo rescue*) und *in vitro* Arbeiten, bei denen Protoplasten in irgendeiner Form manipuliert werden, z.B. durch Protoplastenfusion.

Die Embryokultur kann nur bei den Artkreuzungen erfolgreich eingesetzt werden, bei denen es zur Befruchtung und zur Entwicklung eines Embryos kommt, der jedoch an der Mutterpflanze nicht ausreifen kann. So konnten Hybridpflanzen von der Kreuzung *L. mutabilis* x *L. hartwegii* aus abortiven Embryonen regeneriert werden (Schäfer-Menuhr et al., 1988a, 1988b).

Da es nur in den seltensten Fällen zur Bildung eines Embryos kommt, will man versuchen, die Kreuzungsbarrieren durch Protoplastenfusion zu umgehen. Diese Technik ist bei Lupinen jedoch noch im Entwicklungsstadium. Die erfolgreiche Regeneration von Pflanzen aus Blattprotoplasten von Lupinen, über die die vorliegende Arbeit berichtet, wird dazu beitragen, die Protoplastenfusion für die Anwendung in der Lupinenzüchtung einen Schritt weiter zu bringen.

### Material und Methoden

Ausgangsmaterial für die Protoplastenisolation waren Sproßkulturen der Embryopflanze Nr. 33 aus der Kreuzung *L. mutabilis* x *L. hartwegii* (Schäfer-Menuhr et al., 1988a, 1988b). Die Pflanzen wurden *in vitro* über Nodien vermehrt und bei 20-23° C (12 h Licht) kultiviert. Die Blattprotoplasten wurden wie beschrieben (Schäfer-Menuhr, 1987) isoliert, gereinigt und kultiviert. Die Enzymlösung enthielt 1% Cellulase Onozuka R-10 und 0.5 % Macerozym. Die Blattstücke wurden 2-3 h bei 23° C in der Enzymlösung inkubiert. Die Protoplasten wurden in T19/4 Medium kultiviert und jede Woche mit T29/4 Medium "gefüttert". Die Calli wurden nach 4 Wochen auf "Lochagarmedium" umgesetzt. Dazu wurden in Ge Agarmedium mit einem heißen Löffelspatel Löcher geschmolzen, die mit einem Tropfen Ge Flüssigmedium gefüllt wurden. Dieses System ist bei Schäfer-Menuhr et al. (1988a, 1988b) für die Kultur von Embryonen beschrieben worden. Die Hormonzusätze waren: Ge/0 - keine Phytohormone, Ge/4 - 1.5 mg/l NAA, 0.4 mg/l BA, Ge/5 - 2.5 mg/l BA und Ge/6 - 5 mg/l BA. Die Calli wurden nach 6 Wochen bonitiert und grüne Calli auf frisches Medium umgesetzt.

Die Medien enthielten folgende Komponenten: B5 Medium (Gamborg et al., 1968), 200 mg/l Caseinhydrolysat, Fruktose 0.7 mM, Ribose 0.8 mM, Xylose 0.8 mM, Mannose 0.7 mM und Cellobiose 0.4 mM. Das Ge Medium enthält zusätzlich 30 g/l Saccharose, 5 g/l Glukose und bei festen Medien 0.8 % Agar. Die T19/4 und T29/4 Medien enthalten zusätzlich Calciumpantothenat 10 µM, Folsäure 0.5 µM, p-Amino-benzoessäure 0.07 µM, Biotin 0.02 µM, Cholinchlorid 3.6 µM, Ascorbinsäure 5.7 µM, Vitamin B 12 0.007 µM, Natrium-pyruvat 45 µM, Zitronensäure 48 µM, Äpfelsäure 75 µM, Fumarsäure 86 µM, Saccharose 150 mM, 1.5 mg/l NAA, 0.4 mg/l BA. Das T19/4 Medium enthält 150 mM Mannit, das T29/4 Medium 75 mM Mannit.

Abkürzungen: 6-Benzylaminopurin (BA), 1-Naphthyllessigsäure (NAA).

### Ergebnisse und Diskussion

Techniken, bei denen Protoplasten für die Pflanzenzüchtung manipuliert werden, setzen voraus, daß man die Protoplasten wieder zu Pflanzen regenerieren kann. Während man bei einer Vielzahl von Pflanzenarten, Pflanzen aus Protoplasten regenerieren kann, ist dies bisher noch nicht bei Lupinen geglückt. Eine Ursache liegt darin, daß der Regenerationsprozeß *per se* noch nicht in allen Einzelheiten erforscht ist und man deshalb empirisch, d.h. durch Ausprobieren, die richtige Zusammensetzung der Regenerationsnährböden finden muß. Es ist deshalb nicht weiter verwunderlich, daß es bei Pflanzenarten, mit denen schon lange in der Gewebekultur gearbeitet wird und daher mehr Informationen über Nähr- und Wachstumsfaktoren vorliegen, leichter gelingt als bei Arten wie Lupinen oder anderen Körnerleguminosen, deren Bearbeitung nur sporadisch erfolgt. Eine Ausnahme sind die Getreidearten, bei denen sich trotz jahrzehntelangen Bemühens erst jetzt der Erfolg einstellt.

Für die Lupinenzüchtung ist es eminent wichtig, die Kreuzungsbarrieren durch Protoplastenfusion zu umgehen. Der schwierigste Schritt dieses Unterfangens ist die Regeneration der Fusionsprodukte zu ganzen Pflanzen, da bisher noch nie eine Pflanze oder ein Sproß aus Lupinenprotoplasten oder Einzelzellen regeneriert worden ist. Es war daher primär notwendig, überhaupt einmal eine Pflanze aus Lupinenprotoplasten zu regenerieren, um zu zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, und um Kenntnisse über die Struktur des Callus zu erhalten, der in der Lage ist, Pflanzen zu regenerieren. In weiteren Versuchen müssen dann die Regenerationsbedingungen optimiert werden und so modifiziert werden, daß sie auch auf andere Lupinenarten und die Fusionsprodukte übertragen werden können.

Es ist seit einiger Zeit bekannt, daß es Genotypen gibt, die "bereitwilliger" regenerieren als andere. Vor diesem Hintergrund wurden in einer umfangreichen Testreihe die verschiedensten Lupinenarten und Genotypen auf ihre "Gewebekulturtauglichkeit" untersucht. Ohne näher auf diese Versuche einzugehen, deren Ergebnisse an anderer Stelle veröffentlicht werden, engten sich die möglichen Kandidaten auf die Embryopflanzen ein, die aus abortiven Embryonen der Kreuzung *L. mutabilis* x *L. hartwegii* regeneriert worden waren (Schäfer-Menuhr et al., 1988a, 1988b). Von den 5 Embryopflanzen, die in vitro vermehrt worden waren, war Versuchsnummer 33 der aussichtsreichste Kandidat, weil aus den Blättern leicht Protoplasten in hoher Ausbeute isoliert werden können, die eine hohe Callusbildungsrate haben und nicht so schnell braun werden.

In umfangreichen Versuchen wurden die verschiedensten Regenerationsmedien und -bedingungen getestet. Von diesen Versuchen soll an dieser Stelle nur über den Ansatz mit dem "Zweiphasensystem" berichtet werden, durch das schon vorher Pflanzen aus abortiven Embryonen regeneriert werden konnten (Schäfer-Menuhr et al., 1988a, 1988b). Bei diesem System werden feste, d.h. Agarmedien, mit flüssigen Medien kombiniert.

Als Nährboden wurde ein Medium verwendet, dessen Gehalt an Inhaltsstoffen eine Zwischenstellung zwischen den Protoplastenmedien und dem B5 Medium einnimmt, denn von Versuchen zur vegetativen Vermehrung und Embryokultur war bekannt, daß sich die Pflanzen im B5 Medium gut entwickeln, die Entwicklung durch die Zusätze in den Protoplastenmedien jedoch gehemmt wird. Auf der anderen Seite starben die Calli ab, wenn sie von den Protoplastenmedien direkt auf das B5 Medium umgesetzt wurden. Ein guter Kompromiß scheint das Ge Medium zu sein, das ein B5 Medium mit den Zuckerzusätzen der Protoplastenmedien ist.

Die Versuche wurden mit vier Phytohormonstufen durchgeführt:

1. ohne Phytohormonzusatz (Ge/0), für den Fall, daß sich schon organisierte Strukturen gebildet hatten;
2. mit 1,5 mg/l NAA und 0,4 mg/l BA (Ge/4), um das Calluswachstum zu fördern, für den Fall, daß die Calli größer sein müssen, ehe sie auf Differenzierungsmedien umgesetzt werden können;
3. 2,5 mg/l BA (Ge/5) und
4. 5 mg/l BA (Ge/6) für den Fall, daß der richtige Zeitpunkt für das Umsetzen auf Differenzierungsmedien erreicht ist und unter Umständen eine höhere Konzentration an Phytohormonen erforderlich ist.

Die Protoplasten wurden aus gut entwickelten Blättern von in vitro vermehrten Sproßkulturen der Embryopflanze Nr. 33 isoliert und in T19/4 Medium kultiviert, das wöchentlich zur Hälfte gegen T29/4 Medium ausgetauscht wurde. Nach zwei Wochen Kultur wurden in allen Petrischalen grüne Mikrocalli beobachtet. Nach weiteren zwei Wochen wurden die größten Calli, die einen Durchmesser von 0,5-2 mm Durchmesser hatten, in den Flüssigkeitstropfen des "Lochagars" umgesetzt. Bei dem beschriebenen Versuch wurden 497 Calli umgesetzt: 81 Calli auf Ge/0, 136 Calli auf Ge/4, 140 Calli auf Ge/5 und 140 Calli auf Ge/6 Medium. Die Calli wurden nach 6 Wochen Kultur ausgewertet. Bei allen Behandlungsstufen waren die Calli zwar gewachsen, jedoch unterschiedlich stark. Am größten und grünen waren die Calli vom Medium Ge/4. Die größten hatten einen Durchmesser von 1 cm. Nur 13 Calli

waren abgestorben. Am schlechtesten waren die Calli auf Ge/0, dem Medium ohne Phytohormone, gewachsen. 63 Calli waren abgestorben. Auch die noch teilweise 18 grünen Calli hatten sich in der Größe nicht einmal verdoppelt. Sie waren sehr hart und hatten eine glatte Oberfläche. Die Calli von dem Ge/5 und Ge/6 Medium hatten überwiegend ein bräunliches Erscheinungsbild. Eine Auswertung unter dem Stereomikroskop ergab, daß auf dem Medium Ge/5 74 Calli abgestorben waren und auf Ge/6 33 Calli. Mit Ausnahme von einem Callus auf dem Medium Ge/6, der leuchtend grün war, hatten die anderen Calli braune nekrotische Stellen um dunkelgrüne harte "Kerne".

Die grünen oder teilweise grünen Calli wurden auf die Medien Ge/5 und Ge/6 umgesetzt und weitere 6 Wochen kultiviert. Von den 124 auf Ge/4 vorkultivierten Calli, waren 48 sehr gut gewachsen, waren leuchtend grün und hatten eine unregelmäßigere Oberfläche als vorher. Von den Calli, die auf den anderen Medien vorkultiviert worden waren, wuchs nur der grüne Callus von dem Medium Ge/6 gut (Abb. 1). Die übrigen Calli starben ab oder zeigten nur wenig Wachstum.

Alle noch grünen Calli wurden auf MS Agarmedium (Murashige und Skoog, 1962), das 1 g/l Lupinenextrakt enthielt (Schäfer-Menuhr, 1987), umgesetzt. Auch in diesen Agar waren mit einem heißen Löffelspatel Vertiefungen gedrückt worden, in die 2 Tropfen flüssiges Ge/6 Medium gefüllt wurde. Die meisten Calli waren schon nach wenigen Tagen abgestorben. Nur 13 Calli der auf Ge/4 vorinkubierten Calli und der grüne Callus von Ge/6 blieben grün und wuchsen. Nach 6 Wochen Kulturdauer hatten sich auf dem Callus von Ge/6 dunkelgrüne knopfartige Strukturen entwickelt, von denen einige nach Umsetzen auf MS Agarmedium keimblattartige Strukturen ausbildeten (Abb. 2). Die übrigen Calli, d.h. die ursprünglich auf Ge/4 gewachsen waren, wiesen keinerlei Differenzierungen auf und konnten bei einem 6wöchigen Umsetzungszyklus noch etwa ein halbes Jahr auf hormonfreiem Medium gehalten werden, ehe sie nekrotisch wurden und abstarben.

Zur besseren Entwicklung der Sprosse wurde daraufhin der Callus von Ge/6 geteilt und in Petrischalen mit flüssigem MB

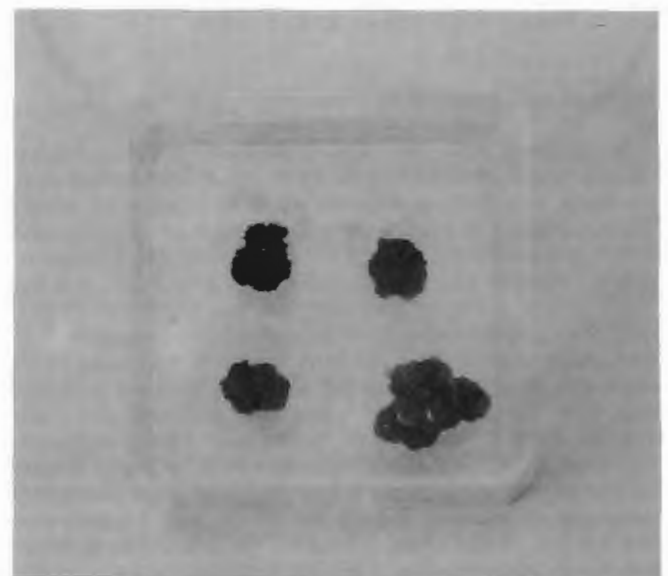


Abbildung 1: Calluswachstum auf dem Differenzierungsmedium Ge/6

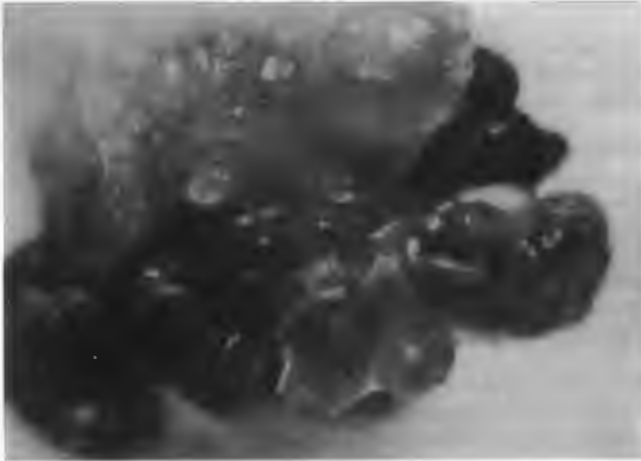


Abbildung 2: Entwicklung keimblattartiger Strukturen

Medium (Schäfer-Menuhr und Stürmer, 1987) weiterkultiviert. Das Medium wurde wöchentlich gegen frisches Medium ausgetauscht. Die ersten Blätter hatten ein anomales Aussehen, waren z.T. glasig und hatten stark verdickte Stengelansätze. Im weiteren Kulturverlauf wurden mehr "knopfartige" Strukturen gebildet, aus denen sich neue Sprosse entwickelten. Die Calli wurden geteilt bis etwa 50 Petrischalen mit Calli gefüllt waren. Davon wurden nach einer Woche Kultur Calli aus 30 Petrischalen in 25 ml Erlenmeyerkolben mit 2.5 ml MB Medium umgesetzt, die mit 130 U/min auf einem Rotationsschüttler kultiviert wurden. Die Calli wurden nach einer weiteren Woche in 50 ml Erlenmeyerkolben mit 5 ml Medium und nach einer weiteren Woche in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml Medium umgesetzt. Die Sprosse entwickelten sich unter diesen Kulturbedingungen sehr gut und bildeten normal aussehende Blätter aus (Abb. 3).

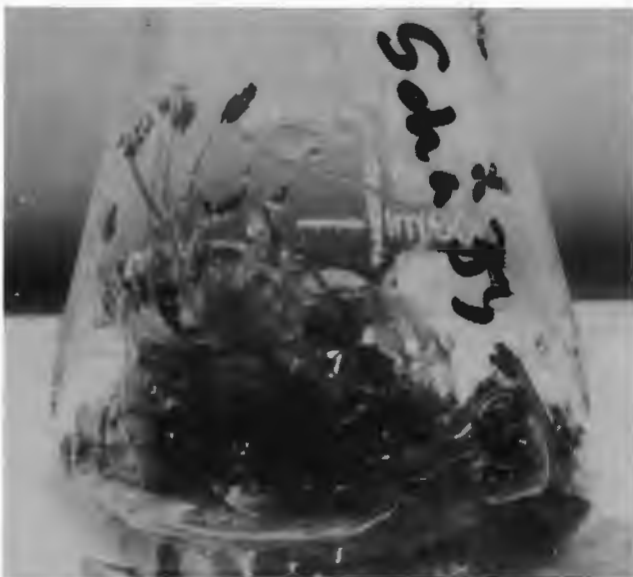


Abbildung 3: Wachstum der Sprosse in flüssigem Medium



Abbildung 4: In vitro Vermehrung der ausgebildeten Sprosse

Etwa 300 Sprosse wurden abgeschnitten und in Steinwolle, die mit MB Medium angefeuchtet war, umgesetzt. Nach 3 Wochen hatten sich einige Sprosse so gut entwickelt, daß sie weiter vegetativ vermehrt werden konnten (Abb. 4). Nicht alle Sprosse entwickelten sich gut. Sie wurden deshalb verworfen. Nur die kräftigsten Sprosse wurden in vitro weiter vermehrt. Die Sprosse von p33, d.h. die aus Protoplasten regeneriert worden waren, unterschieden sich nach kurzer Zeit im Aussehen nicht von den Sprossen der Pflanze 33, aus denen die Protoplasten hergestellt worden waren. Zur Zeit werden einige Sprosse in vitro bewurzelt, um sie in Erde und später ins Gewächshaus überführen zu können.

Der angeführte Versuch ist nur ein kleiner Ausschnitt aus einer breit angelegten Versuchsreihe, die zur Regeneration von Pflanzen aus einem Lupinenprotoplasten geführt hat. Warum es gelungen ist, einen Protoplasten zu regenerieren, ist noch völlig unklar. Das Experiment zeigt aber, daß es möglich ist und es zeigt auch, wie ein Callus aussieht, der in der Lage ist zu regenerieren. Durch dieses Experiment sind viele Informationen darüber erhalten worden, wie man in weiteren Versuchen vorgehen könnte, die Regeneration zu optimieren.

1. Auxine sollten nur in der ersten Phase gegeben werden, um die Protoplasten zu Calli zu regenerieren und das Wachstum in der ersten Zeit zu fördern.
2. Cytokinine sollten zu Beginn in niedriger Konzentration und später in einer verhältnismäßig hohen Konzentration gegeben werden.
3. Das Protoplastenmedium sollte allmählich in ein Pflanzenwachstumsmedium umgewandelt werden.

Weitere Versuche werden zeigen, ob es möglich ist, Pflanzen in großer Menge zu regenerieren. Wenn es möglich wäre, würden dadurch neue Wege für die Lupinenzüchtung eröffnet wie Protoplastenfusion oder alle Techniken, bei denen Protoplasten manipuliert werden.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministers für Forschung und Technologie und der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen landwirtschaftlichen Pflanzenzüchtung e.V. unter dem Kennzeichen 0318942A/A23/87-Z.F. gefördert. Besonderer Dank gilt Frau Rita Wilkens für ihre exzellente technische Assistenz.

## Zusammenfassung

Aus Blättern von der Hybride *Lupinus mutabilis* x *Lupinus hartwegii* wurden Mesophyllprotoplasten isoliert und kultiviert. Nach 4-wöchiger Kultur in T19/4 und T29/4 Medium wurden die Calli auf Differenzierungsnährböden umgesetzt. Bei der Behandlungsstufe, die 5 mg/l 6-Benzylaminopurin enthielt, entwickelten sich in einem Fall keimblattartige Strukturen. Nach Umsetzen auf hormonfreies Medium wurden Sprosse erhalten, die sich im Aussehen nicht von der Ausgangspflanze unterschieden.

## Isolation and culture of lupin protoplasts IV. Regeneration of plants from protoplasts

Protoplasts of the hybrid *Lupinus mutabilis* x *Lupinus hartwegii* were isolated and cultured. After 4 weeks of culture in T19/4 and T29/4 media calli were transferred to differentiation media. One callus of the hormone treatment 5 mg/l 6-benzylaminopurine developed cotyledonlike structures. After transfer to hormone free medium shoots were obtained which had the same appearance as the donor plant.

## Literatur

Gamborg, O.L., Miller, R.A. und Ojima, K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. - Exp. Cell Res. 50 (1968), S. 151 ff.

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

Schäfer-Menuhr, A.: Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten. I. Protoplasten aus Blättern von *Lupinus angustifolius* Sorte Kubesa. - Landbauforschung Völkenrode 37 (1987), S. 117-120.

Schäfer-Menuhr, A. und Stürmer, S.: Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten. II. Modifikation von Nährmedien zur beschleunigten Teilung von Protoplasten aus Blättern von *Lupinus angustifolius* Sorte Kubesa. - Landbauforschung Völkenrode 37 (1987), S. 231-234.

Schäfer-Menuhr, A., Czerwinski, T. und Busmann, A.: Der Einsatz von Embryokultur zur Gewinnung von Artbastarden aus der Kreuzung *Lupinus mutabilis* x *Lupinus hartwegii*. - Landbauforschung Völkenrode 38 (1988), S. 173-177.

Schäfer-Menuhr, A., Busmann, A. und Czerwinski, T.: Embryo rescue of interspecific hybrids. - Proceedings of the 5th International Lupin Conference, Poznan, Polen, (1988), S. 424-428.

Verfasser: Schäfer-Menuhr, Angelika, Dr. agr., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Institutsleiter: Prof. Dr. agr. Manfred Dambroth.