

## Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten

### I. Protoplasten aus Blättern von *Lupinus angustifolius* Sorte Kubesa

ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

#### Einleitung

Die Lupine gewinnt zunehmendes Interesse bei europäischen Pflanzenzüchtern. Da Kreuzungsbarrieren zwischen den europäischen und amerikanischen Arten bestehen, sollen *in vitro* Techniken helfen, diese Schranken zu überwinden. Neben der Embryokultur von partiell kreuzbaren Lupinenarten (d. h. ein Embryo wird angelegt, stirbt aufgrund von Inkompatibilität aber in einem frühen Entwicklungsstadium ab) ist es vor allem die Protoplastenfusion nicht kreuzbarer Lupinenarten, die eingesetzt werden kann, neues Basismaterial für Züchtungsarbeiten zur Verfügung zu stellen.

Bei Lupinen sind keine Arbeiten bekannt, die über Protoplastenisolation und Protoplastenfusion berichten. Dieser Beitrag soll aufzeigen, wie Protoplasten aus Blattzellen hergestellt werden können und erste Informationen über Nährmedien geben, in denen die Lupinenprotoplasten wieder Zellwände regenerieren, sich teilen und Callus bilden.

#### Material und Methoden

Für die Anzucht von Keimpflanzen wurden Samen von *L. angustifolius* der Sorte Kubesa 2 min. in 70%igem Ethanol geschwenkt. Die Lösung wurde abgossen und durch 1.5%ige frisch hergestellte Calciumhypochloridlösung ersetzt. Nach 15 min. wurden die Samen mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen und je 3 Samen in Petrischalen auf angefeuchtetes steriles Filterpapier gelegt. Nach 3 Tagen wurde die Samenschale unter aseptischen Bedingungen entfernt. Die Keimlinge wurden in große Reagenzgläser gepflanzt, die 20 ml 0.1%iges Poly Fertilal in 0.8%igem Agar enthielten und in einer Phytokammer (16 h Licht, 23°C/8 h Dunkelheit, 18°C) für weitere 3 Wochen kultiviert.

Die zellwandauflösenden Enzyme Cellulase Onozuka R 10 (Serva) und Pektinase (Serva) wurden vor Verwendung wie bei Wetter und Constabel (1982) beschrieben über Biogel P-6 gereinigt und gefriergetrocknet.

Die Plasmolyselösung enthielt 150 mM Sorbit, 150 mM Mannit, 0.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.8 mM CaCl<sub>2</sub> und 0.5 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure. Der pH-Wert wurde auf 6.8 eingestellt.

Zur Isolation der Protoplasten wurden Blätter unter aseptischen Bedingungen abgeschnitten, in steriles Wasser gelegt, die untere Epidermis der Blätter abgezogen, die Blätter in etwa 2 mm<sup>2</sup> große Stücke zerschnitten und in Enzymlösung gegeben. Die Petrischalen wurden unter leichtem Schwenken 2–8 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Zur Abtrennung unverdauter Blattreste wurde der Enzymverdau durch ein Nylongewebe mit 50 µm großen Poren filtriert. Das Filtrat wurde bei 100 × g 5 min. zentrifugiert. Das Sediment wurde 3 × mit 5 ml Plasmolyselösung gewaschen. Die Dichte der Protoplasten wurde in einer Zählkammer bestimmt und auf 10<sup>4</sup>–10<sup>6</sup>/ml eingestellt.

Das Grundmedium zur Herstellung der Protoplastenmedien war B5 (Gamborg et al. 1968). Alle Medien wurden auf pH 5.5 eingestellt und sterilfiltriert. Als Phytohormone wurden verwendet: 6-Benzylaminopurin (BA), (2,4-Dichlorphenoxy)-essigsäure (2,4-D), Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>), (2-Isopentenyl)adenin (2iP), Kinetin (Kin) und 1-Naphthyl-essigsäure (NAA).

Zur Herstellung des Lupinenextraktes wurden Samen von *L. luteus* der Sorte Topaz 2 h in Wasser gequollen und die Samenschale entfernt. Die Samen wurden mit Sand im Mörser zerrieben (0°) und mit Wasser (1 ml/Samen) 1 h bei 0°C extrahiert und 20 min. bei 13 000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde 5 min. in einem kochenden Wasserbad denaturiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde gefriergetrocknet und bei 4°C gelagert.

#### Ergebnisse und Diskussion

Über Methoden zur Isolation, Kultur und Regeneration von Protoplasten verschiedener Pflanzenarten gibt es zahlreiche Veröffentlichungen (Vasil 1976, Reinert und Bajaj 1977, Wetter und Constabel 1982, Evans et al. 1983, Fowke und Constabel 1985 und dort zit. Arbeiten). Diese Publikationen zeigen, daß es eine ganze Reihe von Variationsmöglichkeiten bei der Isolation und Kultur von Protoplasten gibt und daß es unumgänglich ist, für jede Pflanzenart günstige Methoden und Nährmedien zu erarbeiten.

Für die Gewinnung der Protoplasten sind zwei Faktoren von ausschlaggebender Bedeutung: die Osmolarität und die Enzymmischung. In Vorversuchen wurde untersucht, welche Enzyme sich für den Zellwandabbau bei Lupinen eignen. Präparierte Blattstücke wurden in Plasmolyselösung gelegt, die 0.3 M Mannit und 0.3 M Sorbit enthielt. Getestet wurden folgende Enzyme bzw. Enzymmischungen: A Onozuka 1%, B Onozuka 1% und Pektinase 0.5%, C Driselase 1%, D Driselase 1% und Pektinase 0.5%, E Cellulysin 1%, F Cellulysin 1% und Pektinase 0.5%. Der Enzymverdau wurde unter einem Invertoskop beobachtet. Bei allen Behandlungsstufen waren nach einer Stunde Protoplasten gebildet worden. Nach weiterer Inkubation vermehrte sich der Anteil an Protoplasten und erreichte bei 4–6 h Inkubation ein Optimum. Die Ausbeute an Protoplasten war am höchsten bei B und D. Nach Reinigung der Protoplasten zeigte sich jedoch, daß die Protoplasten, die mit 1% Onozuka und 0.5% Pektinase hergestellt worden waren, stabiler waren als die, bei denen Driselase verwendet worden war.

Zur Überprüfung der optimalen Osmolarität wurden die präparierten Blattstücke in Plasmolyselösung gelegt, der Mannit und Sorbit in verschiedenen Konzentrationen (Tab. 1) und 1% Onozuka und 0.5% Pektinase zugesetzt war. Die Protoplasten wurden nach 4 h Inkubation gereinigt und gezählt. Wie Tabelle 1 klar zeigt, wird bei 0.3 und 0.4 M Osmotikumzusatz die höchste Ausbeute an Protoplasten erhalten und liegt damit niedriger als für viele Pflanzenarten angegeben. Abbildung 1 zeigt Protoplasten, die mit 0.3 M

Tabelle 1: Einfluß der Osmolarität auf die Protoplastenausbeute

Sorbit + Mannit	A	B
0,2 M	24	17
0,3 M	243	258
0,4 M	165	210
0,6 M	18	23

Angaben  $\times 10^4$ , A und B sind Wiederholungen. Die Molari-  
tätsangaben sind die Summe der Molaritäten von Sorbit und  
Mannit

Osmotikumzusatz isoliert wurden. Die Vitalität der Protoplasten konnte mit Trypanblau und Fluoresceindiacetat nachgewiesen werden.

Die Kultur der Protoplasten wurde zunächst in Anlehnung an die Arbeit von Wetter und Constabel (1982) durchgeführt. Das B5 Medium (Gamborg et al. 1968), in dem Frischexplantate von Lupinen mit einem Zusatz von 2 mg/l NAA und 1 mg/l BA Callus bilden, wurde durch Zusatz von Ribose,  $\text{CaCl}_2$ , Ascorbinsäure und Calciumpantothenat modifiziert, Zucker und Zuckeralkohole als osmotische Stabilisatoren variiert und bei 2 Medien Kokosnußmilch zugesetzt (Tabelle 2). Die Protoplasten wurden zum Schluß

Tabelle 2: Nährlösungen zur Induktion der Zellwandbildung

	B5/1	B5/2	B5/3	B5/4
Glucose	200 mM	20 mM	20 mM	150 mM
Saccharose	—	80 mM	80 mM	—
Mannit	—	100 mM	220 mM	—
Sorbit	220 mM	110 mM	220 mM	150 mM
Kokosnußmilch	50 ml/l	—	—	50 ml/l
NAA	2 mg/l	2,5 mg/l	2,5 mg/l	2 mg/l
BA	1 mg/l	1,25 mg/l	1,25 mg/l	1 mg/l

Grundmedium B5 (Gamborg et al. 1968) mit Zusätzen: Ribose 1,5 mM,  $\text{CaCl}_2$  3,5 mM, Ascorbinsäure 5,7 mM, Ca-pantothenat 2 mM, Caseinhydrolysat 200 mg/l

in Kulturmedium gewaschen und auf eine Dichte von etwa  $10^5$ /ml eingestellt. Je 4 Tropfen ( $25 \mu\text{l}$ ) Protoplastensuspension und 5 Tropfen Medium wurden in Petrischalen gesetzt. Die zusätzlichen Tropfen sollten ein Austrocknen verhindern. Die Petrischalen wurden in dicht verschließbare durchsichtige Plastikbehälter gegeben und zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit Schälchen mit Wasser hineingestellt und in einem Kulturraum bei  $23^\circ\text{C}$  und einem Tagesrhythmus von 12 h kultiviert. Nach kurzer Zeit sammelten sich die Protoplasten in der Mitte der Tropfen am Petrischalen-

Tabelle 3: Nährlösungen zur Induktion der Callusbildung

	A/1	A/2	A/3	A/4	A/5	A/6	A/7	A/8
Glucose	150 mM	150 mM	—	—	150 mM	—	150 mM	—
Saccharose	—	—	150 mM	150 mM	—	150 mM	—	150 mM
Kokosnußmilch	50 ml/l	—	50 ml/l	—	—	—	—	—
Lupinenextrakt	—	—	—	—	1 g/l	1 g/l	—	—
NAA	1 mg/l	—	—					
BA	0,5 mg/l	—	—					
2, 4-D	—	—	—	—	—	—	1 mg/l	1 mg/l
Kinetin	—	—	—	—	—	—	0,2 mg/l	0,2 mg/l

Grundmedium B5 (Gamborg et al. 1968) mit Zusätzen: Mannit 150 mM, Ribose 1,5 mM,  $\text{CaCl}_2$  3,5 mM, Ascorbinsäure 5,7 mM, Ca-pantothenat 2 mM, Caseinhydrolysat 200 mg/l



Abbildung 1: Protoplasten aus Blattzellen von *L. angustifolius* der Sorte Kubesa.

boden. Nach etwa 3 Tagen waren die Protoplasten braun, klumpten zusammen und klebten am Boden der Petrischale. Da die Tropfen sehr dicht waren, war eine genaue Beobachtung der Protoplasten unter dem Invertoskop nur schwer möglich. Bei den Medien B5/2 und B5/4 (Tabelle 2) wurden nach etwa 2 Wochen einige längliche Zellen beobachtet. Wurde das überstehende Medium der Protoplastentropfen jede Woche zur Hälfte gegen ein Medium mit geringerem Mannit- und Sorbitzusatz ausgetauscht, konnten bei dem Medium B5/4 nach etwa 6 Wochen und dem Medium B5/2 nach etwa 8 Wochen Zellverbände erkannt werden. Diese Zellen hatten Zellwände regeneriert, wie mit Calcofluorwhite nachgewiesen werden konnte. Zellteilungen wurden nicht beobachtet und bei allen 4 Medien wurde nie ein Callus gebildet.

Um das Zusammenklumpen der Protoplasten in der Tropfenmitte zu verhindern, wurde seitlich ein Tropfen abgekühlte 1%ige Agarose in den Tropfen pipettiert. Nach dieser von Binding und Kollmann (1985) beschriebenen Methode werden innerhalb des Tropfens Bereiche mit unterschiedlicher Protoplastendichte hergestellt und fixiert. Nach Festwerden der Tropfen wurde flüssiges Nährmedium (Tabelle 3) in die Petrischale gegeben, das wöchentlich gegen ein Medium mit niedrigerer Osmolarität ausgetauscht wurde. Die untersuchten Nährmedien (Tabelle 3) enthielten alle Mannit und Glucose oder Saccharose als osmotischen Stabilisator. Neben den Phytohormonen wurde Kokosnußmilch und Lupinenextrakt als Wachstumsfaktor untersucht. In allen untersuchten Medien waren nach einer Woche noch grüne Chloroplasten in den Protoplasten erkennbar. Allmählich setzte eine Braunfärbung im dichtesten

Protoplastenbereich ein. In diesem dichten Bereich können unter dem Invertoskop einzelne Protoplasten nicht beobachtet werden, dies ist nur möglich in den Randzonen. In allen untersuchten Medien wurde in den Randzonen mit geringer Protoplastendichte keine Zellteilungen gefunden, jedoch fand Zellwandregeneration statt. Nach etwa 2 Wochen waren bei allen Medien die Protoplastentropfen braun. Nach 4–6 Wochen Kultur waren bei den Medien A/5 und A/6 in einigen Petrischalen unter dem Invertoskop kleine grüne Calli im dichten Protoplastenbereich sichtbar. Diese Calli zeigten ein gutes Wachstum. In allen anderen untersuchten Medien (Tab. 3) wurde nie ein Callus erhalten. Da sich diese Medien gegenüber dem Medium A/5 und A/6 im Wesentlichen nur in der Komponente Lupinenextrakt unterscheiden, lag der Schluß nahe, daß die Protoplasten zur Zellteilung und zum Wachstum Stoffe benötigen, die im Lupinenextrakt enthalten sind, aber nicht notwendigerweise Phytohormonwirkung haben müssen.

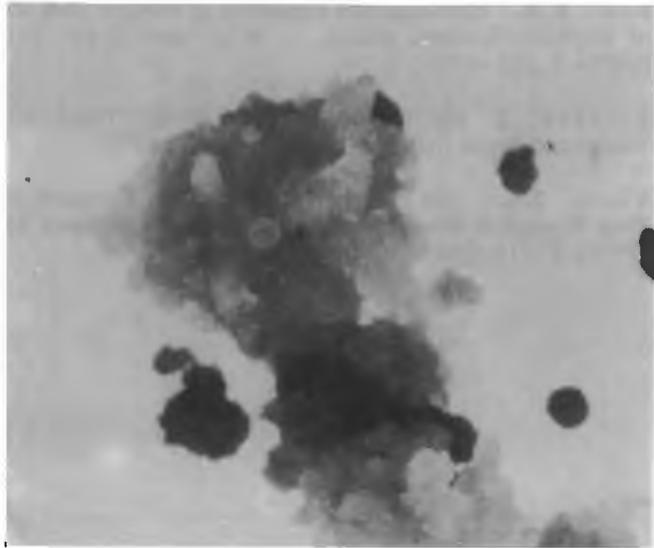


Abbildung 2: Regenerierter Callus aus Protoplasten von *L. angustifolius* der Sorte Kubesa. Der Callus zeigt orientiertes Wachstum.

#### Isolation and culture of lupin protoplasts

##### I. Protoplasts from leaves of *Lupinus angustifolius* cv Kubesa

Protoplasts of *Lupinus angustifolius* cv Kubesa were isolated from leaves in high yield and purity. They regenerate into callus in rich media. In the synthetic medium AS 19 microcalli can be found after 3 weeks of culture. The AS 19 medium derives from the B5 medium and contains the mineral salts of B5, the vitamins of B5, 150 mM mannitol, 150 mM sucrose and the following compounds: 1. free amino acids (mM): asparagine 1.33, glutamine 1.33, serine 1.33 and 200 mg/l of casamino acids; 2. organic acids ( $\mu\text{M}$ ): sodium pyruvate 45, citric acid 48, malic acid 75, fumaric acid 86; 3. sugars (mM): fructose 0.7, ribose 0.8, xylose 0.8, mannose 0.7, cellobiose 0.4; 4. vitamins ( $\mu\text{M}$ ): D-Capantothenate 10, folic acid 0.5, p-aminobenzoic acid 0.007, biotin 0.02, choline chloride 3.6, ascorbic acid 5700, vitamin B 12 0.007, vitamin E 2; 5. phytohormones (0.5 mg/l): NAA, BA, 2, 4-D, 2iP and GA<sub>3</sub>.

#### Literatur

Binding, H. und Kollmann, R.: Regeneration of protoplasts. — In: Schäfer-Menuhr, A.: *In Vitro Techniques, Propagation and Long Term Storage*. Martinus Nijhoff/W. Junk, Dordrecht, Boston, Lancaster (1985), S. 93–99.

Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. und Yamada, Y. (Hrsg.): *Handbook of plant cell culture*. Macmillan, New York, London. Volume 1 (1983).

Fowke, L.C. und Constabel, F. (Hrsg.): *Plant protoplasts*. — In: CRC Press, Boca Raton, Florida (1985).

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.

Die Callusbildungsrate konnte mit Medien, die nach KAO (1977) modifizierte Zusätze enthielten, erhöht werden. Von den getesteten Medien waren am erfolgreichsten das L1 und das AS 19 Medium. Beide leiten sich vom B5 Medium (Gamborg et al. 1968) ab und enthalten folgende Zusätze: Asparagin 1.33 mM, Glutamin 1.3 mM, Serin 1.33 mM, Natriumpyruvat 45  $\mu\text{M}$ , Zitronensäure 48  $\mu\text{M}$ , Äpfelsäure 75  $\mu\text{M}$ , Fumarsäure 86  $\mu\text{M}$ , Fruktose 0.7 mM, Ribose 0.8 mM, Xylose 0.8 mM, Mannose 0.7 mM, Cellobiose 0.4 mM, Calciumpantothenat 10  $\mu\text{M}$ , Folsäure 0.5  $\mu\text{M}$ , p-Aminobenzoesäure 0.07  $\mu\text{M}$ , Biotin 0.02  $\mu\text{M}$ , Cholinchlorid 3.6  $\mu\text{M}$ , Ascorbinsäure 5.7  $\mu\text{M}$ , Vitamin B 12 0.007  $\mu\text{M}$ , Vitamin E 2  $\mu\text{M}$ , Mannit 150 mM und Saccharose 150 mM. Das L1 Medium enthält zusätzlich 1 g/l Lupinenextrakt und die Phytohormone NAA (1 mg/l) und BA (0.5 mg/l). Das AS 19 Medium enthält dagegen 200 mg/l Caseinhydrolysat und die Phytohormone (0.5 mg/l) NAA, BA, 2,4-D, 2iP und GA<sub>3</sub>. Mit beiden Medien konnten nach etwa 3 Wochen Mikrocalli in den Agarotropfen nachgewiesen werden. In diesen 2 Medien war nicht nur die Induktionszeit kürzer als in dem A/5 und A/6 Medium (Tab. 3), sondern die Anzahl gebildeter Calli war auch erhöht. Der positive Einfluß dieser Medien ist auf den Zusatz der zahlreichen organischen Komponenten zurückzuführen, da sich das L1 Medium von dem A/5 Medium nur durch diese Zusätze unterscheidet. Obwohl das L1 Medium und das AS 19 Medium gleiche Resultate liefern, ist das AS 19 Medium weitaus besser geeignet, für die Regeneration von Lupinenprotoplasten eingesetzt zu werden, weil es ein vollsynthetisches Medium ist und damit reproduzierbar hergestellt werden kann.

Zur weiteren Differenzierung der Calli wurden die Medien gegen Medien mit höherem Cytokinin- und geringerem Auxingehalt ausgetauscht. In vielen Fällen starben die Calli ab. An einigen Calli war ein orientiertes Wachstum zu beobachten (Abbildung 2). Es wurde in keinem Fall eine Sproßbildung gefunden. Wurden die Calli wieder auf ein auxinreicheres Medium umgesetzt, konnte in vielen Fällen Wurzelbildung beobachtet werden. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, geeignete Medien zur Regeneration ganzer Pflanzen aus Protoplasten zu erstellen.

#### Zusammenfassung

Aus Blättern von *Lupinus angustifolius* der Sorte Kubesa wurden Mesophyllprotoplasten in hoher Ausbeute und Reinheit isoliert. Durch Screening zahlreicher Nährlösungen wurde ein synthetisches Nährmedium (AS 19) entwickelt, in dem Protoplasten reproduzierbar zu Callus regeneriert werden können. Einige Calli differenzierten Wurzeln aus.

Kao, K.N.: Chromosomal Behaviour in Somatic Hybrids of Soybean-Nicotiana glauca. – Molec gen. Genet. 150 (1977), S. 225–230.

Reinert, J. und Bajaj, Y.P.S. (Hrsg.): Plant Cell, Tissue, and Organ Culture, – Springer Verlag 1977.

Vasil, J.K.: The Progress, Problems, and Prospects of Plant Protoplast Research. – In: Advances in Agronomy 28 (1976), S. 119–160.

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. Manfred Dambroth.