

Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten

II. Modifikation von Nährmedien zur beschleunigten Teilung von Protoplasten aus Blättern von *Lupinus angustifolius* Sorte Kubesa

ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR und SABINE STÜRMER

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Die Protoplastenkultur von Leguminosen bereitet große Schwierigkeiten. Eine Regeneration zu ganzen Pflanzen ist zur Zeit noch auf einige Futterleguminosen wie Kleearten, Luzerne und wenige tropische Leguminosen beschränkt (Binding, 1985).

Bei der Lupine konnten aus Protoplasten Calli regeneriert werden, die in einigen Fällen Wurzeln bildeten (Schäfer-Menuhr, 1987). Verglichen mit anderen Pflanzenarten ist die Callusbildungsrate in dem AS 19 Medium sehr niedrig und erfolgt relativ spät. Um auf breiterer Ebene Regenerationsmedien zur Induktion von Sproßbildung oder Embryonen testen zu können, ist es notwendig, das AS 19 Medium oder andere Medien so zu optimieren, daß eine schnellere und häufigere Zellteilung stattfindet. Für die Kultur von Leguminosenprotoplasten wird vielfach das Medium von Kao (1977) oder eine Modifikation dieses Mediums verwendet. Das K Medium war erfolgreich bei der Protoplastenkultur der Sojabohne (Kao, 1977) und der Luzerne *Medicago sativa* (Dos Santos et al., 1980), das 8p Medium bei der Wicke *Vicia hajastana* (Kao und Michayluk, 1975) und das 8pm Medium bei der indischen Büschelbohne *Cyamopsis tetragonoloba* (Saxena et al., 1986) verwendet worden.

In der vorliegenden Arbeit werden aus der Literatur bekannte Nährmedien verglichen und diese durch Austausch von Stoffgruppen und Kombination mit neuen Wuchsstoffkomponenten modifiziert.

Material und Methoden

Die Anzucht der Keimpflanzen von *L. angustifolius* Sorte Kubesa wurde, wie bei Schäfer-Menuhr (1987) beschrieben, mit folgender Modifikation durchgeführt. Die vorgekeimten Samen wurden in 100 ml Reagenzgläser gepflanzt, die zu einem Viertel mit Steinwolle gefüllt waren und mit 1:2 verdünntem MB Medium angefeuchtet war. Das MB Nährmedium setzt sich aus einem Teil MS Medium (Murashige und Skoog, 1962) und einem Teil B 5 Medium (Gamborg et al., 1968) zusammen.

Die Isolation und Reinigung der Protoplasten erfolgte wie beschrieben (Schäfer-Menuhr, 1987). Die Enzymlösung bestand aus 2% Cellulase Onozuka R 10 (Serva) und 1% Pektinase (Serva) in Plasmolyselösung pH 6.8. Nach 2 h Einwirkungszeit wurde der Enzymverdau durch Zugabe von einem gleichen Volumen Plasmolyselösung pH 5.5 verdünnt und eine weitere Stunde inkubiert. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Sediment mit Plasmolyselösung pH 5.5 auf eine Dichte von 10^5 Protoplasten/ml verdünnt und je 3 Tropfen in Plastikpetrischalen (ϕ 5 cm) gesetzt. In jeden Protoplastentropfen wurde ein Tropfen warme flüssige Agarose (1% Agarose in Plasmolyselösung pH 5.5) seitlich zugespritzt. Nach 5 min wurde 5 ml Nährmedium zugegeben.

Für die Phytohormone wurden folgende Abkürzungen verwendet: 6-Benzylaminopurin (BA), 1-Naphthyllessigsäure (NAA), 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D), Isopentyladenin (2 ip) und Gibberellinsäure 3 (GA₃).

Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurden 4 verschiedene Grundmedien getestet, das AS 19 (Schäfer-Menuhr, 1987), das K (Kao, 1977), das 8p (Kao und Michayluk, 1975) und das 8pm Medium (Saxena et al., 1986). Das AS 19 Medium unterscheidet sich in einigen Makronährstoffen von den anderen drei Medien und in der Wertigkeit des Eisens. Als Kohlenhydratquelle und osmotische Stabilisatoren enthalten das K, das 8p und das 8pm Medium Glucose, das AS 19 Medium Saccharose und Mannit. Der Zuckerzusatz ist im 8p und 8pm Medium doppelt so hoch konzentriert wie in den beiden anderen Medien, der Zusatz an organischen Säuren ist vierfach. Unterschiede sind auch bei einigen Vitaminen zu finden. Das AS 19 Medium enthält einen Zusatz von 3 Aminosäuren. Als zusätzlichen Wuchsstoff enthalten das K, 8p und 8pm Medium Kokosnußmilch. In den Phytohormonzusätzen sind die Unterschiede zum Teil sehr groß. Um die Petrischalen unter gleichen Bedingungen, d. h. 16 h Licht, kultivieren zu können, wurde dem K, 8p und 8pm Medium kein Riboflavin zugesetzt.

In den vier Grundmedien erfolgte die Zellwandbildung nach 3–6 Tagen, die Zellen vergrößerten sich und nahmen statt der runden eine mehr ovale Form an. Diese Beobachtung und das Auffinden von Zellteilungen sind nur bei den Protoplasten möglich, die durch die Agarose nicht konzentriert wurden und sich in dem umgebenden Medium befinden. In dem Agarosetropfen sind die Protoplasten so dicht gepackt, daß erste Zellteilungen nicht erkennbar sind. Um Zellteilungen zu fördern, wurde wöchentlich das Medium zur Hälfte gegen das gleiche Medium mit reduziertem Osmotikum ausgetauscht. Die Auswertung erfolgte nach 28 Tagen. Petrischalen, die während der Kultur Pilz- oder Bakterienbefall aufwiesen, wurden verworfen und nicht ausgewertet.

Tabelle 1 zeigt, daß die Callusbildungsrate im AS 19 und K Medium am höchsten ist, während im 8p und 8pm Medium nur in einer Petrischale Callus gewachsen ist. Die Größe der Calli liegt nach vierwöchiger Kulturdauer im AS 19 und im K Medium im Bereich von 0,25 – 0,5 mm Durchmesser. Im AS 19 Medium wurde in 75 % der Petrischalen Callus gebildet. Die Calli wachsen ausschließlich im und am Agarosetropfen und nicht im umgebenden Medium, in dem sich etwa ein Viertel der Protoplasten befindet, die nicht von der Agarose verdichtet wurden. Im K Medium liegt der Prozentsatz der Petrischalen mit Callus (61 %) zwar niedriger als im AS 19 Medium, jedoch wurden in sehr vielen Petrischalen Calli in großer Anzahl (≥ 50) im K Medium beobachtet, die bei niedri-

ger Protoplastendichte wachsen. Wurden die Protoplasten nicht mit Agarose verdichtet, wurde keine Callusbildung beobachtet.

Zur weiteren Optimierung der Medien wurden Stoffgruppen zwischen dem AS 19 und dem K Medium ausgetauscht (Tab. 2). In der Tabelle 2 werden die Grundmedien AS 19 und K mit den modifizierten Grundmedien verglichen. Neben der Anzahl der Petrischalen mit Callusbildung wird auch die Anzahl der Petrischalen mit mehr als 50 Calli/Petrischale angegeben, da dieser Wert das Ziel der Untersuchungen widerspiegelt, nämlich ein Medium herzustellen, in dem in kurzer Zeit viele Protoplasten zu Calli regenerieren.

Ein Austausch des Zuckerzusatzes führt in beiden Medien (AS 19/1 und K 1) zu einer verminderten Callusbildung. Auch wenn die Kohlenhydratquellen und osmotischen Stabilisatoren ausgetauscht werden (AS 19/2 und K 2), werden sehr viel weniger Calli als im Grundmedium gebildet. Ein Aminosäurezusatz zum K Medium (K 3) wirkt sich negativ auf die Callusbildung aus. Wird der Aminosäurezusatz im AS 19 Medium herausgelassen (AS 19/3), wird das Medium entscheidend verbessert. Bei etwa gleicher Anzahl Petrischalen mit Callus werden in vielen Petrischalen 50 und mehr Calli gefunden. Diese Calli wachsen nicht nur im und am Agarose tropfen, sondern auch im umgebenden Medium. Ein ähnliches Ergebnis wird durch den Austausch der Phytohormone

Tabelle 1: Callusbildung in den Grundmedien AS 19, K, 8p und 8pm nach 28 Tagen Kulturdauer

	Petrischalen angesetzt	Petrischalen mit Callus	1-10	Petrischalen mit 10-50	> 50	Petrischalen mit Callus im Agarose-tropfen	im Agarose-tropfen u. Medium
AS 19	12	9	6	3	0	9	0
K	23	14	3	0	11	1	13
8p	8	1	1	0	0	0	1
8pm	8	0	0	0	0	0	0

Tabelle 2: Modifikation der Grundmedien AS 19 und K durch Austausch von Stoffgruppen

	AS 19	K	AS 19/1	K 1	AS 19/2	K 2	AS 19/3	K 3	AS 19/4	K 4	AS 19/5	K 5	AS 19/6	K 6	AS 19/7
Grundmedien	AS 19	K	AS 19	K	AS 19	K	AS 19	K	AS 19	K	AS 19	K	AS 19	K	AS 19
Ausgetauschte Stoffgruppe *1	-	-	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7
Anzahl der Petrischalen mit Callus (%)	75	61	17	17	44	20	82	14	76	36	83	86	86	14	17
Anzahl der Petrischalen mit > 50 Calli (%)	0	46	17	0	11	0	55	0	52	0	17	71	75	0	17
Einfluß auf das Grundmedium *2			-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
*1	Ausgetauschte Stoffgruppen, in denen sich Komponenten im AS 19 und K Medium unterscheiden														
1	Zuckerzusatz: das K Medium enthält zusätzlich Saccharose 0,37 mM, Rhamnose 0,7 mM, Sorbit 0,7 mM und Mannit 0,7 mM														
2	Kohlenhydratquelle und osmotische Stabilisatoren: ausgetauscht werden Saccharose 150 mM und Mannit 150 mM (AS 19 Medium) gegen Glucose 340 mM (K Medium)														
3	Aminosäuren: das AS 19 Medium enthält Asparagin 1,33 mM, Glutamin 1,33 mM und Serin 1,33 mM														
4	Phytohormone und Wachstumsstoffe: ausgetauscht werden NAA, BA, 2,4 D, 2iP, GA ₃ (je 0,5 mg/l) (AS 19 Medium) gegen 2,4 D 0,2 mg/l, Zeatin 0,5 mg/l, NAA 1 mg/l und Kokosnußmilch 10 ml (K Medium).														
5	Anorganische Salze: ausgetauscht werden KNO ₃ 25 mM, MgSO ₄ · 7 H ₂ O 1 mM, CaCl ₂ · H ₂ O 0,68 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 mM, NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 1,1 mM und Fe · EDTA 0,1 mM (AS 19 Medium) gegen NH ₄ NO ₃ 7,5 mM, KNO ₃ 19 mM, MgSO ₄ · 7 H ₂ O 1,2 mM, CaCl ₂ · 2 H ₂ O 4 mM, KH ₂ PO ₄ 1,2 mM, KCl 4 mM und Fe · Sequestrene 0,07 mM (K Medium). Beide Medien enthalten keinen Aminosäurezusatz														
6	Vitamine: ausgetauscht werden Calciumpantothemat 10 µM und Vitamin E 2 µM (AS 19 Medium) gegen Calciumpantothemat 1 µM, Vitamin A 0,02 µM und Vitamin D ₃ 0,01 µM (K Medium). Beide Medien enthalten keinen Aminosäurezusatz														
7	Kokosnußmilch: Es werden 10 ml/l Kokosnußmilch zugegeben.														
*2															
+	das Grundmedium wird verbessert. Es werden in mehr Petrischalen Calli gebildet und/oder pro Petrischale werden mehr Calli gebildet														
-	das Grundmedium wird verschlechtert														

und Wachstumsstoffe (AS 19/4 und K 4) erhalten. Während das K Medium mit den AS 19 Hormonen zu einer Verringerung der Callusbildung führt, die zudem nur in hohen Protoplastendichten auftritt, fördert das AS 19/4 Medium eine verstärkte Callusbildung gerade im niedrigen Dichtebereich. Dieser Effekt wird anscheinend durch die veränderten Phytohormone bewirkt und nicht durch die Zugabe von Kokosnußmilch, da ein Zusatz von Kokosnußmilch zum AS 19 Medium (AS 19/7) einen hemmenden Einfluß auf die Callusbildung hat. Während die Callusbildungsrate im AS 19 Medium durch Austausch der anorganischen Salze des K Mediums (AS 19/5) nur leicht erhöht wird, wird das K Medium durch die anorganischen Salze des AS 19 Mediums (K 5) wesentlich verbessert. Gleich gute Callusbildung wird bei dem AS 19 Medium erreicht, wenn die Vitamine ausgetauscht werden und keine Aminosäuren zugesetzt werden (AS 19/6). Das K Medium wird durch die Vitamine des AS 19 Mediums (K 6) verschlechtert.

Aus dem Vergleich der modifizierten Grundmedien (Tab. 2) ergeben sich einige grundsätzliche Schlußfolgerungen für weitere Versuche. Das Grundmedium AS 19 ist für die Kultur von Lupinenprotoplasten besser geeignet als das K Medium. Zwar werden im K Medium Calli sowohl im dichten Protoplastenbereich wie auch im umgebenden Medium gebildet, jedoch ist der Prozentsatz der Petrischalen mit Callusbildung geringer als im AS 19 Medium und kann nur dadurch gesteigert werden, daß die anorganischen Salze gegen die des AS 19 Mediums ausgetauscht werden. Alle anderen Modifikationen des K Mediums führen zu einer Verschlechterung der Callusbildungsrate. Im AS 19 Medium wird in einem hohen Prozentsatz der Petrischalen Callus gebildet, jedoch nur im hohen Dichtebereich. Wesentlich mehr Calli, d. h. auch im Bereich mit niedrigerer Protoplastendichte, wachsen in den modifizierten AS 19 Medien AS 19/3, AS 19/4 und AS 19/6. Das AS 19 Medium kann durch drei Stoffgruppen verbessert werden:

1. kein Aminosäurezusatz
2. Vitamine des K Mediums und
3. Phytohormone des K Mediums.

In weiteren Versuchen wurde die Callusbildungsrate in den Grundmedien AS 19 und K mit den durch veränderten Phytohormonzusatz modifizierten Grundmedien verglichen. Wie Tabelle 3 zeigt, führen fast alle Hormonzusätze zu einer Verbesserung der Grundmedien. Die höchste Callusbildungsrate wird im AS P1 Medium gefunden. In fast 90 % der angesetzten Petrischalen entwickelten sich Calli. Die Callusbildung findet nicht nur im dichten Protoplastenbereich statt, sondern auch in großer Zahl (> 50 Calli/Petrischale) im umgebenden Medium. Beim AS P2 und AS P3 Medium werden zwar auch verstärkt Calli im umgebenden Medium gebildet, jedoch in einer geringeren Anzahl von Petrischalen. Von den modifizierten K Medien sind das K P2 und K P3 Medium besser als das Grundmedium. Es wurden in mehr Petrischalen Calli gebildet als im Grundmedium. Im Gegensatz zu den modifizierten AS 19 Medien, in denen Mikrocalli frühestens nach zwei Wochen Kulturdauer gefunden werden, können in den modifizierten K Medien erste Mikrocalli schon nach einer Woche beobachtet werden. Im weiteren Kulturverlauf wachsen die Calli in den modifizierten AS 19 Medien jedoch schneller als die Calli im K Medium oder modifizierten K Medien. Nach vierwöchiger Kulturdauer ist das Erscheinungsbild der Calli in allen verbesserten Medien gleich (Abb. 1). Der Agarosetropfen ist durch Ausscheidungsstoffe der Protoplasten dunkelbraun bis schwarz gefärbt. Ein großer Anteil der Protoplasten im Agarosetropfen hat zwar Zellwände regeneriert, diese Pro-

Tabelle 3: Modifikation der Grundmedien AS 19 und K durch Veränderung der Phytohormone

	AS 19	AS P1	AS P2	AS P3	K	K P1	K P2	K P3
*1								
Phytohormone:								
BA	0,5	0,4	1	—	—	0,4	1	—
NAA	0,5	1,5	—	—	1	1,2	—	—
2,4 D	0,5	—	1,2	1	0,2	—	1,2	1
2ip	0,5	—	—	—	—	—	—	—
GA ₃	0,5	—	—	—	—	—	—	—
Zeatin	—	—	—	1	0,5	—	—	1
Anzahl der Petrischalen mit > 50 Calli (%)	0	89	50	50	46	38	77	82
*2								
Einfluß auf das Grundmedium		+	+	+		—	+	+
Die Grundmedien sind für ASP Medien AS 19 (Schäfer-Menuhr, 1987) ohne die dort angegebenen Phytohormone, für die KP Medien K Medium (Kao, 1977) ohne die dort angegebenen Phytohormone und ohne Riboflavin								
*1 Angaben der Phytohormone in mg/l								
*2 Das Grundmedium wird verbessert (+). Das Grundmedium wird verschlechtert (—)								

toplasten haben sich aber nicht geteilt und sind abgestorben. Einige Protoplasten im Agarosetropfen haben sich geteilt und grüne Calli gebildet. In den verbesserten Medien teilen sich mehr Protoplasten, die sich in sehr geringer Protoplastendichte im umgebenden Medium befinden. Diese Calli sind meist etwas kleiner als die, die auf dem Agarosetropfen wachsen. Nach 4 Wochen Kulturdauer ist in keinem der verbesserten Medien Ansätze zur Differenzierung erkennbar.

Durch die Optimierungsversuche wurden 9 Medien (AS P1, AS P2, AS P3, AS 19/3, AS 19/4, AS 19/6, K P2, K P3)

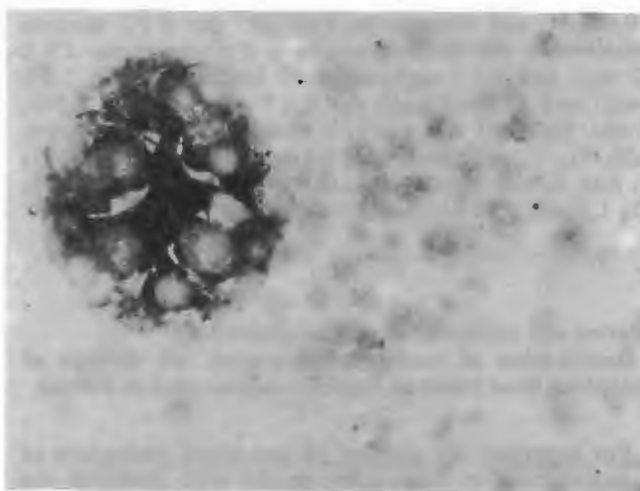


Abb. 1: Callusbildung nach vierwöchiger Kulturdauer. In den verbesserten Medien wachsen die Calli auf dem Agarosetropfen in sehr hoher Protoplastendichte und im umgebenden Medium in sehr geringer Protoplastendichte. Das Karoraster hat eine Kantenlänge von 5 mm.

K P3, K 5) gefunden, durch die eine schnelle Callusformation bei Protoplasten von *L. angustifolius* erreicht werden kann. Obwohl bei den Untersuchungen über den Einfluß von unterschiedlichen Nährmedien auf die Protoplastenkultur versucht wurde, alle anderen Faktoren konstant zu halten, zeigte sich ein „Petrischaleneffekt“, wie er häufig bei pflanzlichen Gewebekulturen beobachtet wird, d.h. bei gleichen Kulturbedingungen findet in den meisten Petrischalen gutes Wachstum statt, in einer oder einigen wenigen Petrischalen überhaupt kein Wachstum. Es wurde deshalb auch bei dem besten Medium (AS P1) nicht in 100 % der Petrischalen Callusbildung erzielt. Bei den verbesserten Medien ist dieser „Petrischaleneffekt“ jedoch gering. Die oben angeführten Untersuchungen lassen keinen Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung erfolgreicher Medien erkennen. Sie unterscheiden sich sowohl in den Hormonzusätzen als auch in den osmotischen Stabilisatoren und in anderen Komponenten. Das AS 19 Medium scheint für Modifikationen mehr Spielraum zu lassen als das K Medium, das anscheinend so ausgewogen ist, daß kleine Veränderungen häufiger zu einem negativen Effekt führen als beim AS 19 Medium. Weitere Versuche müssen zeigen, welches der 9 Medien besser geeignet ist, Calli zu induzieren, die zur Morphogenese befähigt sind.

Zusammenfassung

Für eine beschleunigte Zellteilung von Mesophyllprotoplasten von *L. angustifolius* Sorte Kubesa wurden das AS 19 Medium (Schäfer-Menuhr, 1987) und K Medium ohne Riboflavin (Kao, 1977) modifiziert. Neun der modifizierten Nährmedien zeigten eine höhere Callusbildungsrate und früheres Einsetzen der Zellteilung als die Grundmedien. Die neun Medien haben folgende Zusammensetzung: das AS P1 Medium enthält statt der dort verwendeten Phytohormone NAA 1,5 mg/l und BA 0,4 mg/l; das AS P2 Medium 2,4 D 1,2 mg/l und BA 1 mg/l; das AS P3 Medium 2,4 D 1 mg/l und Zeatin 1 mg/l; das AS 19/3 Medium enthält kein Asparagin, Glutamin und Serin; das AS 19/4 Medium enthält statt der Phytohormone des AS 19 Mediums 2,4 D 0,2 mg/l, NAA 1 mg/l, Zeatin 0,5 mg/l und Kokosnußmilch 10 ml/l; statt Calciumpantothenat 10 µM, Vitamin E 2 µM, Asparagin, Glutamin und Serin enthält das AS 19/6 Medium Calciumpantothenat 1 µM, Vitamin A 0,02 µM und Vitamin D₃ 0,01 µM; das K P2 Medium enthält statt der dort verwendeten Phytohormone 2,4 D 1,2 mg/l und BA 1 mg/l; das K P3 Medium enthält 2,4 D 1 mg/l und Zeatin 1 mg/l; das K 5 Medium enthält KNO₃ 25 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,68 mM, (NH₄)₂SO₄ 1 mM, NaH₂PO₄ 1,1 mM und Fe·EDTA 0,1 mM statt NH₄NO₃ 7,5 mM, KNO₃ 19 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 4 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, KCl 4 mM und Fe·Sequestrene 0,07 mM.

Isolation and culture of lupin protoplasts

II. Modification of media for improved cell division of protoplasts from leaves of *Lupinus angustifolius* cv Kubesa

For improved cell division of mesophyll protoplasts of *L. angustifolius* cv Kubesa two media were modified, the AS 19 medium (Schäfer-Menuhr, 1987) and the K medium without riboflavin (Kao, 1977). Nine of the modified media showed a higher rate of callus formation and an earlier onset of cell division than the basic media. These nine media have the following composition: in the AS P1 medium phytohormones are substituted by NAA

1,5 mg/l and BA 0,4 mg/l; in the AS P2 medium by 2,4 D 1,2 mg/l and BA 1 mg/l; in the AS P3 medium by 2,4 D 1 mg/l and Zeatin 1 mg/l; in the AS 19/3 medium asparagine, glutamine and serine are omitted; in the AS 19/4 medium the phytohormones are substituted by 2,4 D 0,2 mg/l, NAA 1 mg/l, Zeatine 0,5 mg/l and coconut water 10 ml/l; in the AS 19/6 medium calcium pantothenate 10 µM, vitamin E 2 µM, asparagine, glutamine and serine are substituted by calcium pantothenate 1 µM, vitamin A 0,02 µM and vitamin D₃ 0,01 µM; in the K P2 medium phytohormones are substituted by 2,4 D 1,2 mg/l and BA 1 mg/l; in the K P3 medium by 2,4 D 1 mg/l and zeatine 1 mg/l; in the K 5 medium NH₄NO₃ 7,5 mM, KNO₃ 19 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 4 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, KCl 4 mM and Fe·sequestrene 0,07 mM are substituted by KNO₃ 25 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,68 mM, (NH₄)₂SO₄ 1 mM, NaH₂PO₄ 1,1 mM and Fe·EDTA 0,1 mM.

Literatur

- Binding, H.: Regeneration of plants. — In: Plant Protoplasts. Fowke, L.C. und Constabel, F. (Hrsg.): CRC Press, Boca Raton, Florida (1985), S. 21–37.
- Fowke, L.C. und Constabel, F. (Hrsg.): CRC Press, Boca Raton, Florida (1985), S. 21–37.
- Dos Santos, A.V.P.; Outka, D.E.; Cocking, E.C. und Davey, M.R.: Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. — Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 99 (1980), S. 261–270.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. — Exp. Cell Res. 50 (1968), S. 151.
- Kao, K.N.: Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean — *Nicotiana glauca*. — Molec. gen. Genet. 150 (1977), S. 225–230.
- Kao, K.N. und Michayluk, M.R.: Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. — Planta 126 (1975), S. 105–110.
- 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.
- Saxena, P.K.; Gill, R. und Rashid, A.: Isolation and culture of protoplasts from mesophyll tissue of the legume *Cyamopsis tetragonoloba* L. — Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6 (1986), S. 173–176.
- Schäfer-Menuhr, A.: Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten. I. Protoplasten aus Blättern von *Lupinus angustifolius* Sorte Kubesa. — Landbauforschung Völkenrode 37 (1987), Heft 3, S. 117–120.
- Verfasser: Schäfer-Menuhr, Angelika, Dr. agr.; Stürmer, Sabine, Dipl.-Biol., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Institutsleiter: Prof. Dr. agr. Manfred Dambroth.