

"

REGENERATION VON RAPSPFLANZEN ÜBER

SOMATISCHE EMBRYONEN

L.C. LI und H.W. KOHLENBACH

Botanisches Institut der Universität Frankfurt-am-Main.

"

EINFÜHRUNG

Vor 80 Jahren sagte Haberlandt, der von der Totipotenz aller Zellen überzeugt war, die Anzucht "artifizieller Embryonen" aus vegetativen Zellen voraus. Es dauerte dann jedoch noch 56 Jahre bis unabhängig voneinander Reinert und Stewart erstmals somatische Embryonen in Kulturen pflanzlicher Gewebe erhielten, als sie mit Daucuscallus arbeiteten, der sich von grösseren Gewebeexplantaten ableitete. Später konnte dann aber auch das eigentliche von Haberlandt anvisierte Ziel, nämlich die Entwicklung von Embryonen bei der Kultur isolierter ausdifferenzierter Organismuszellen, in Versuchen mit mechanisch isolierten Blattzellen von Macleaya erreicht werden (Kohlenbach, 1965 ; Lang und Kohlenbach, 1975.)

Die somatische Embryogenese, die mittlerweile bei einer Anzahl von Objekten beschrieben wurde, erweist sich sowohl für die Grundlagenforschung wie auch für eine mit Methoden der Zellkulturforschung arbeitende unkonventionelle Pflanzenzüchtung, die entscheidende Impulse Melchers (1975) verdankt, von grosser Bedeutung, zumal dann, wenn sie in Kulturen isolierter Protoplasten erzielt werden kann. Isolierte Protoplasten werden gebraucht, wenn die Verbesserung von Kulturpflanzen mit Methoden des genetical engineering durchgeführt werden soll. Nach genetischer Manipulation der Protoplasten muss es möglich sein, ein Teilungswachstum und die Regeneration ganzer Pflanzen auszulösen. Können dabei bi-polare Embryonen induziert werden, so erhält man besonders schnell bewurzelte Pflanzen.

ERGEBNISSE

In Fortsetzung von Untersuchungen von Kartha et al. (1974), Thomas et al. (1976) und Kohlenbach et al. (1982) fanden wir (7) bei kürzlich durchgeführten Versuchen mit zwei Kultursorten von *Brassica napus* (cv. "Loras" und cv. "Tower") eine bislang für isolierte Mesophyll-protoplasten von Raps ungewöhnlich starke embryogene Reaktion.

Es bedarf dazu eines Vierstufenverfahrens, bei dem jede Stufe ihr spezifisches Kulturmedium verlangt.

1. Stufe : Mod. Nitsch Medium mit (in mg/l)
M-I 0.5 2,4-D ; 0.5 NAA ; 0,5 BAP ; 0.55 M Mannit 3 Wochen
2. Stufe : MS-13 Medium mit (in mg/l)
M-II 0.2 2,4-D ; 3.0 Kinetin ; 0.4 M Mannit 2-3 Wochen
3. Stufe : MS-13 Medium
M-III Hormone nach Tab.2 ; 0.4 M Mannit 4-7 Wochen
4. Stufe : MS Medium
M-IV ohne Hormone ; ohne Mannit wenigstens 4 Wochen.

Nach der Induktion eines Teilungswachstums der isolierten Protoplasten bei Dunkelheit in M-I entstehen am Licht grüne Zellverbände, aus denen in Medium II Mikrokolonien hervorgehen, in deren Zentren in der Regel einzelne kompakte und kleinzellige Strukturen, Proembryonen, gebildet werden können. Sie können bereits in dieser Stufe eine ovale Form mit einem grünen, dem späteren Keimblatt- und Plumulabereich und einem farblosen Pol, dem späteren Wurzelbereich, annehmen.

In Medium III entwickeln sich diese Proembryonen zu Embryonen, wobei die sie umgebenden wenigen unorganisierten Zellen degenerieren.

Für Stufe I und besonders für Stufe II ist die Dauer der Einwirkung des jeweiligen Mediums von Bedeutung. Nur ein Aufent-

halt der Zellverbände von 2-3 Wochen in Medium II führt zu normal ausgebildeten Embryonen. Kürzere Aufenthaltszeiten fördern einseitig den Kotyledonenbereich, längere den Wurzelbereich. Ganz entscheidend ist auch, dass für die Induktion der Zellteilung und der Embryogenese Phytohormone in relativ hoher, für die Fortentwicklung der einmal induzierten Proembryonen zu Embryonen in reduzierter Konzentration eingesetzt werden müssen.

Bei cv. "Tower" können auf der Grundlage von 27% embryoproduzierenden Mikrokolonien und der Entwicklung von mehr als 5000 Mikrokolonien und Proembryonen in einer Petrischale von 6 cm Durchmesser 1355 Embryonen und ca. 1000 normale Pflanzen erhalten werden. Die für einen Regenerationszyklus (von der Isolierung der Protoplasten bis zur bewurzelten Pflanze) benötigte Zeit beläuft sich auf etw 4 Monate.

DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.

1) In Kulturen isolierter Blattprotoplasten von *Brassica napus* (cv. "Loras" und cv. "Tower") lassen sich Pflanzen über somatische Embryonen erhalten. Die Regenerationsrate ist bereits relativ hoch, die Dauer des Regenerationszyklus kurz. Daher dürfte das Verfahren schon jetzt für erste Einsätze bei Züchtungsexperimenten geeignet sein.

2) Jeder Embryo entsteht auf einem sehr direkten Wege ohne Zwischenschaltung einer eigentlichen Kallusphase in einer Mikrokolonie von ca. 0,5 mm Durchmesser aus einem mit Bezug auf Embryogenese- undeterminierten Blattprotoplasten. Bei einer als möglich anzusehenden weiteren Steigerung der Regenerationsrate könnte daher ein System zur Analyse der somatischen Embryogenese ab initio entwickelt werden.

Sie könnte zu einem weiteren Verstehen der somatischen Embryogenese beitragen und uns letztlich befähigen, in vitro-Techniken auch bei solchen Objekten zum Einsatz zu bringen, die sich bislang

ihnen gegenüber gesperrt haben und zu denen leider noch viele Kulturpflanzen zählen. Zur Zeit gibt es kein System, das bereits für eine solche Analyse geeignet wäre. Das in diesem Zusammenhang häufig benutzte "Daucus-System" enthält einen systematischen Fehler, auf den wiederholt aufmerksam gemacht wurde (Kohlenbach, 1978), insofern hier bei Auxinentzug nicht die Induktion von embryogenen Zellen, sondern lediglich die Freisetzung eines bereits früher bei hoher Auxinkonzentration entstandenen embryogenen Zustandes zu seiner vollen Entfaltung untersucht wird.

Wir danken dem BMFT und der GFP für wertvolle Unterstützung unserer Arbeit.

Regeneration Frequencies of Microcolonies derived from Mesophyll protoplasts of Brassica napus cv. "Tower" (L7) in M III supplemented with different Combinations of 2,4-D and BAP and different Combinations of GA₃ and BAP.

Hormone concentration (mg/l)	2,4-D		GA ₃			
	0.05	0.01	0.5	0.05	0.5	0.05
	BAP		BAP			
	1.0	1.0	1.0	1.0	0.25	0.25
No. of microcolonies inoculated	363	284	54	66	56	58
No. of embryos obtained after 40 days	25	27	4	12	6	7
	% 6.9	9.5	% 7.4	18.4	10.7	18.1
after 47 days x ₁	46	77				
	% 12.7	27.1				

x₁ After inoculation in the original medium for 40 days, the medium was renewed with the same composition. The second score was made after 7 days in the renewed medium.

LITERATUR

- HABERLANDT G. : Sitz.-Ber. Mat.-Nat. Cl. Kais. Akad. Wiss. Wien 111, (1), 69-92 (1902).
- KARTHA K.K., M.R. MICHAYLUK, K.N. KAO, O.L. GAMBORG, and F. CONSTABEL : Plant Science Letters 3, 265-271 (1974).
- KOHLBACH H.W. : Planta 64, 37-40 (1965).

4. KOHLENBACH H.W. in : *Frontiers of Plant Tissue Cultures*. 1978. T.A. THORPE (Ed.) Calgary. 59-66 (1978)
5. KOHLENBACH H.W., G. WENZEL and F. HOFFMANN : *Z. Pflanzenphysiol.* 105, 131-142 (1982).
6. LANG H. and H.W. KOHLENBACH : in : *Form, Structure and Function in Plants*. (Prof. B.M. Johri, Commemoration Volume, Meerut, India), 125-133 (1975).
7. LI L.C. and H.W. KOHLENBACH : *Plant Cell Reports.* 1, 209-211 (1982).
8. MELCHERS G. : *Planta Medica Suppl.* 5-34 (1975).
9. REINERT J. : *Ber. Deutsch Bot. Ges.* 71, 15 (1958).
10. STEWARD F.C. , M.O. MAPES and K. MEARS : *Am. J. Bot.* 45, 705-708 (1958).
11. THOMAS E.F. HOFFMANN, I. POTRYKUS and G. WENZEL : *Mol. gen. Genet.* 145, 245-247 (1976).

Herr Li Liang-cai war als Humboldt-Stipendiat Gast in Frankfurt-am-Main. Für diesen Aufenthalt wurde es vom Institut für Genetik der Chinesischen Akademie der Wissenschaften in Peking beurlaubt.