

Der Einsatz von Embryokultur zur Gewinnung von Artbastarden aus der Kreuzung *Lupinus mutabilis* x *Lupinus hartwegii*

ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR, TOMASZ CZERWINSKI und ALMUT BUSMANN

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Ein vorrangiges Ziel in der Lupinenzüchtung ist das Einkreuzen von determinierten Wuchsformen in die großsamigen Kulturformen, um den Hülsenansatz am Haupttrieb zu erhöhen. Diese interspezifischen Kreuzungen sind durch Barrieren nur in den seltensten Fällen realisierbar (Jaronowski, 1962; Kazimierski, 1964; Williams et al., 1980; Roy and Gladstones, 1985; Swiecicki, 1985), d.h. es wurden lebensfähige Samen erhalten. In den meisten Fällen jedoch wurde überhaupt kein Embryo gebildet, oder die Embryonen starben kurz nach der Befruchtung ab.

Mit *in vitro* Techniken sollte es möglich sein, abortive Embryonen zu retten und zu Hybridpflanzen zu regenerieren. Bei Lupinen ist die Embryokultur bisher nur erfolgreich bei Embryonen von geselbsteten Pflanzen im Kotyledonenstadium angewendet worden (Sator, 1985; Schäfer-Menuhr, 1986; Vuillaume und Hoff, 1986). Bei einigen Lupinenarten konnten in einigen Fällen auch aus früheren Stadien Pflanzen erhalten werden (Schäfer-Menuhr, 1986).

Diese Arbeit soll aufzeigen, daß es auch möglich ist, globuläre oder deformierte Embryonen aus der Kreuzung *L. mutabilis* x *L. hartwegii*, die sich auf der Pflanze nicht weiter entwickeln können und absterben, *in vitro* zu Pflanzen zu regenerieren.

Material und Methoden

Die Versuchspflanzen von *L. mutabilis* (Ökotyp Peru) und *L. hartwegii* (Wildform, Linie 7/3 Schröder) wurden in Phytosolarien (16 h Licht, 20 °C Tag, 15 °C Nacht, 60% rel. Luftfeuchtigkeit) angezogen und gekreuzt, indem eine mit Pollen gefüllte Schiffchenspitze auf die Narbe gesetzt wurde.

Die Hülsen wurden 15 min. in einer 1.5 %igen Calciumhypochloridlösung behandelt und anschließend mit sterilem Wasser gespült. Die Samenanlagen wurden unter aseptischen Bedingungen entnommen und bis zur weiteren Verwendung in MB Medium (Schäfer-Menuhr und Stürmer, 1987) gelegt. Zur Isolierung der Embryonen wurden die Samenanlagen mit einem Skalpell horizontal zerteilt. Der Embryo wurde unter einem Stereomikroskop aus dem oberen Teil der Samenanlage mit einer Eppendorfpipette entnommen. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C (12 h Tag) bei einer Lichtintensität von 4-6 klx in quadratischen Petrischalen (35 x 35 mm), die in Klarsichtdosen zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit gestellt worden waren.

Die Sprosse bzw. Pflanzen wurden bei einer Größe von ca 3 cm zunächst in 15 ml Reagenzgläser überführt, die zu einem

Drittel mit MB Agar gefüllt waren, nach weiteren 2-3 Wochen Kultur in größere Gefäße. Einige Sprosse wurden *in vitro* vermehrt, indem Sproßabschnitte, die Achselknospen enthielten, auf Steinwolle gesetzt wurden, die mit MB Medium angefeuchtet war. Bewurzelte Sprosse wurden bei einer Größe von 10 cm in Perlite gepflanzt. Das Substrat war mit 1:2 verdünntem MB Medium, das kein Zucker enthielt, angefeuchtet, um die Pflanze für das Umsetzen in Erde vorzubereiten. Nach 2 Wochen wurden die Pflanzen in eine autoklavierte Erdmischung getopft, die aus 3 Teilen Torf, 1 Teil Kompost und 0.5 Teilen Sand bestand. Zu Beginn wurden die Pflanzen durch Plastiktüten vor dem Austrocknen geschützt.

Die Extrakte für die Elektrophorese wurden aus voll entwickelten Blättern hergestellt, indem 0.5 g Blätter mit 0.5 g Polyclar AT (Serva), 5 g Quarzsand, 0.5 ml 1 molare Tris/HCl (pH 6.8), 20 µl 0.1 molares 1,4-Dithioerythrit und 1 ml H₂O im Mörser bei 0 °C zerrieben wurden. Der Extrakt wurde 15 min bei 27 000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde in flüssigem N₂ eingefroren. Die Proteine wurden in einem nativem 7.5 %igen Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) aufgetrennt (4 °C, 70 Volt, 16 h). Die Gele wurden mit Servablau R 250 gefärbt.

Ergebnisse und Diskussion

L. mutabilis und *L. hartwegii* gehören zum amerikanischen Formenkreis und haben beide einen diploiden Chromosomensatz von 48. Kreuzungsbarrieren sind zwischen diesen beiden Arten weniger stark ausgeprägt als bei Kreuzungen zwischen den amerikanischen und europäischen Arten. Kreuzungen zwischen *L. mutabilis* und *L. hartwegii* können zwar erfolgreich durchgeführt werden, lebensfähige Samen werden aber nur dann erhalten, wenn *L. mutabilis* als Pollenspende eingesetzt wird. Bei der reziproken Kreuzung, *L. mutabilis* x *L. hartwegii*, sterben die Embryonen in einem frühen Entwicklungsstadium ab. Um aus diesen Embryonen Pflanzen zu bekommen, könnte man die Samenanlagen oder Embryonen zu einem früheren Zeitpunkt entnehmen und *in vitro* kultivieren. Man sollte bei solchen Versuchen allerdings im Auge behalten, daß diese Embryonen, obwohl noch nicht abgestorben, durch Ernährungsschäden so defekt sein können, daß keine normale Pflanze regeneriert werden kann.

Bei der Kreuzung *L. mutabilis* x *L. hartwegii* betrug der Hülsenansatz etwa 16 %. Die Hülsen enthielten 1-3 unterentwickelte Samen, in denen die Embryonen in frühen Entwicklungsstadien abgestorben waren.

Untersuchungen an geselbseten Pflanzen haben gezeigt, daß die Entwicklung der Embryonen bei allen Lupinenarten

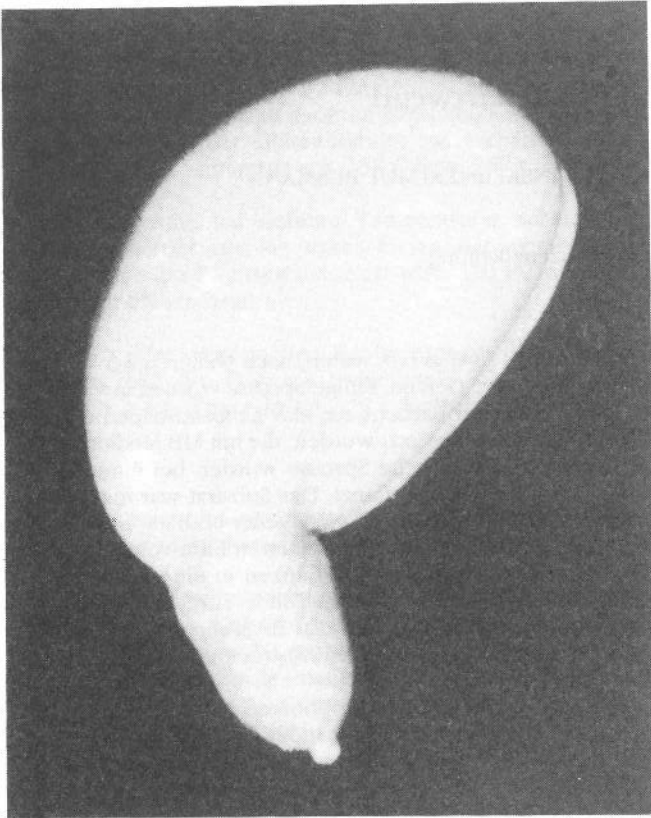


Abb. 1: **Embryonen 18 Tage nach Bestäubung**
a. *L. mutabilis* x *L. mutabilis* (x 35)

ähnlich verläuft. Neun Tage nach Bestäubung haben die Embryonen ein frühes Globularstadium erreicht. Etwa 3 Tage später werden die Cotyledonprimordien sichtbar. Die eigentliche Differenzierung des Embryos ist nach 18 Tagen abgeschlossen. Danach nimmt der Embryo nur noch an Größe zu (Abb. 1a). In Abbildung 1b ist zum Vergleich ein Hybridembryo 18 Tage nach Bestäubung dargestellt. Während bei den geselbsteten Vergleichspflanzen die Differenzierung abgeschlossen ist, ist bei den Hybridembryonen das Wachstum im Globularstadium stehengeblieben.

Um Kulturbedingungen für abortive Hybridembryonen zu finden, wurden zunächst Vorversuche mit Embryonen von geselbsteten Pflanzen durchgeführt (Schäfer-Menuhr, 1986). Differenzierte Embryonen konnten ohne Schwierigkeiten *in vitro* kultiviert werden. Die Pflanzen unterschieden sich nicht von Pflanzen, die direkt aus reifen Samen angezogen wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Vuillaume und Hoff (1986) berichtet. Die Regeneration wurde problematischer, wenn Embryonen im frühen Herzstadium kultiviert wurden. Nur etwa 50 % konnten zu Pflanzen regeneriert werden. Bei den gleichen Kulturbedingungen starben Embryonen im Globularstadium ab. Ein Wachstum dieser Embryonen konnte nur erreicht werden, wenn den Kulturmedien Phytohormone zugesetzt wurden. Es wurde jedoch sehr schnell Callus gebildet, in dem keine Sproßbildung induziert werden konnte.

Ausgehend von diesen Erfahrungen wurde bei der *in vitro* Kultur der Hybridembryonen von *L. mutabilis* x *L. hartwegii* folgende Strategie verfolgt: 1. die Embryonen so lange wie möglich an der Mutterpflanze "reifen" zu lassen, 2. ein Kultursystem zu entwickeln, bei dem entweder Nährstoffe aus geselbsteten Ausgangspflanzen zugesetzt wurden oder die Phytohormonkonzentration allmählich reduziert wurde.

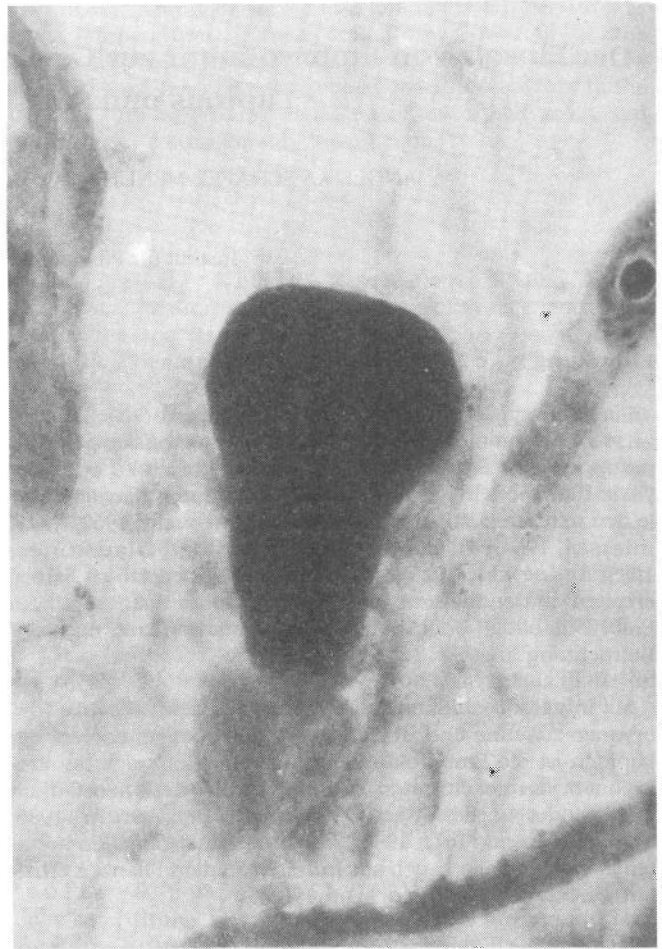


Abb. 1: **Embryonen 18 Tage nach Bestäubung**
b. *L. mutabilis* x *L. hartwegii* (x 54)

Um ein Kultursystem zu entwickeln, sind normalerweise umfangreiche Testreihen erforderlich. Stehen aber nur 47 Hybridhülsen mit 1-3 Samenanlagen zur Verfügung, sind die Variationsmöglichkeiten erheblich eingeschränkt, so daß 5 Versuchsansätze in Folge durchgeführt wurden, in die sukzessiv die Ergebnisse der vorausgegangenen Versuche einfließen konnten, da die Kreuzungen über einen Zeitraum von 6 Monaten durchgeführt wurden. Auf eine Ausdehnung der Versuche auf globuläre Embryonen der geselbsteten Eltern wurde verzichtet, weil sich bei vorher durchgeführten Versuchen artspezifische Kultureigenschaften gezeigt hatten. Embryonen von *L. mutabilis* färbten sich wie auch Frischexplantate aus Stengelabschnitten sehr schnell braun, während Embryonen von *L. hartwegii* grün blieben, aber zu starker Callusbildung neigen, auch ohne Zugabe von Phytohormonen.

Im ersten Versuch wurden 4 globuläre Embryonen aus 3 Hülsen (17 Tage nach Bestäubung) in 10 µl 1%ige Agarose eingegossen, die mit flüssigem MB Medium benetzt wurde. Die Embryonen waren nach 5 Tagen abgestorben.

Bei dem 2. Versuch wurde zu 4 Embryonen (18 Tage nach Bestäubung) Endosperm von *L. hartwegii* zugesetzt, das aus Hülsen 10 Tage nach Selbstung isoliert wurde. Die Embryonen waren nach 5 Tagen abgestorben.



Abb. 2: Regenerierte Hybridpflanze Nr. 36

Im 3. Versuch wurden Samenhälften aus 12 Hülsen (15-22 Tage nach Bestäubung), die globuläre Embryonen enthielten, kultiviert. In die Samenhälften wurde entweder Endosperm von *L. mutabilis* oder von *L. hartwegii* zugegeben, das 10 Tage nach Selbstung isoliert worden war. 5 Tage nach Kultur waren in einigen Samenhälften vitale Embryonen zu sehen, die sich jedoch nicht weiter differenziert hatten. Im weiteren Kulturverlauf war ein starkes Wachstum der Samenhälften zu beobachten. Nach 14 Tagen konnten in den Samenhälften keine Embryonen gefunden werden.

Der 4. und 5. Versuch wurde mit angereicherten Medien durchgeführt, wie sie auch für die Kultur von Lupinenprotoplasten eingesetzt werden. Das Agarmedium T39 enthält: die Nährstoffe des B 5 Mediums (Gamborg et al., 1968), Natrium-pyruvat 45 μ M, Zitronensäure 48 μ M, Äpfelsäure 75 μ M, Fumarsäure 86 μ M, Fruktose 0.7 mM, Ribose 0.8 mM, Xylose 0.8 mM, Mannose 0.7 mM, Cellobiose 0.4 mM, Calciumpantothenat 10 μ M, Folsäure 0.5 μ M, p-Aminobenzoessäure 0.07 μ M, Biotin 0.02 μ M, Cholinchlorid 3.6 μ M, Ascorbinsäure 5.7 μ M, Vitamin B 12 0.007 μ M, Caseinhydrolysat 200 mg/l, Saccharose 87 mM, Glucose 25 mM und 0.8% Agar. Nachdem der T39 Agar abgekühlt war, wurde in jede Petrischale mit einem heißen kleinen Löffelspatel 4 Vertiefungen gedrückt, in die je ein Tropfen T19/4 Medium gegeben wurde, das ein T39 Medium ohne Glukose ist und folgende Zusätze hat: Mannit

150 mM, Saccharose 150 mM, 1-Naphthyl-essigsäure 1.5 mg/l und 6-Benzylaminopurin 0.4 mg/l.

Die Embryonen wurden in die mit Flüssigkeit gefüllten Vertiefungen gesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert. Aus 22 Hülsen wurden 51 Embryonen isoliert, von denen nach einer Woche Kultur noch 18 Embryonen vital waren, an Größe zugenommen hatten und zum Teil Callus bildeten. Da zu diesem Zeitpunkt die Embryonen nicht mehr mit Flüssigkeit bedeckt waren, wurde erneut ein Tropfen T19/4 Medium in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren Woche wurde flüssiges MB Medium ohne Phytohormonzusatz zugegeben. Im weiteren Verlauf der Kultur wurden Differenzierungen erkennbar, bei einigen Embryonen war ein abnormes Wachstum der Keimblätter zu beobachten. Nur 4 Embryonen waren mit Pilzen oder Bakterien kontaminiert. Der "älteste" Embryo, Versuchsnummer 36, der 43 Tage nach Bestäubung isoliert worden war und zu diesem Zeitpunkt stark deformiert war, entwickelte sich am schnellsten. Ohne Callusstadium wurde nach wenigen Tagen eine Wurzel ausgebildet. Die ersten Blätter waren nach 2 Wochen Kultur erkennbar. Auch bei den übrigen Embryonen entwickelten sich Sproßansätze, von denen 10 jedoch stark verkümmert oder abnorm waren. Bei den Versuchsnummern 30, 32 und 33 (24, 19 und 18 Tage nach Bestäubung isoliert) entwickelten sich die Sprosse normal, es wurde jedoch eine Vielfachsproßbildung beobachtet ohne daß Wurzeln ausgebildet wurden.



Abb. 3a: Regenerierte Embryopflanze mit Vielfachsproßbildung

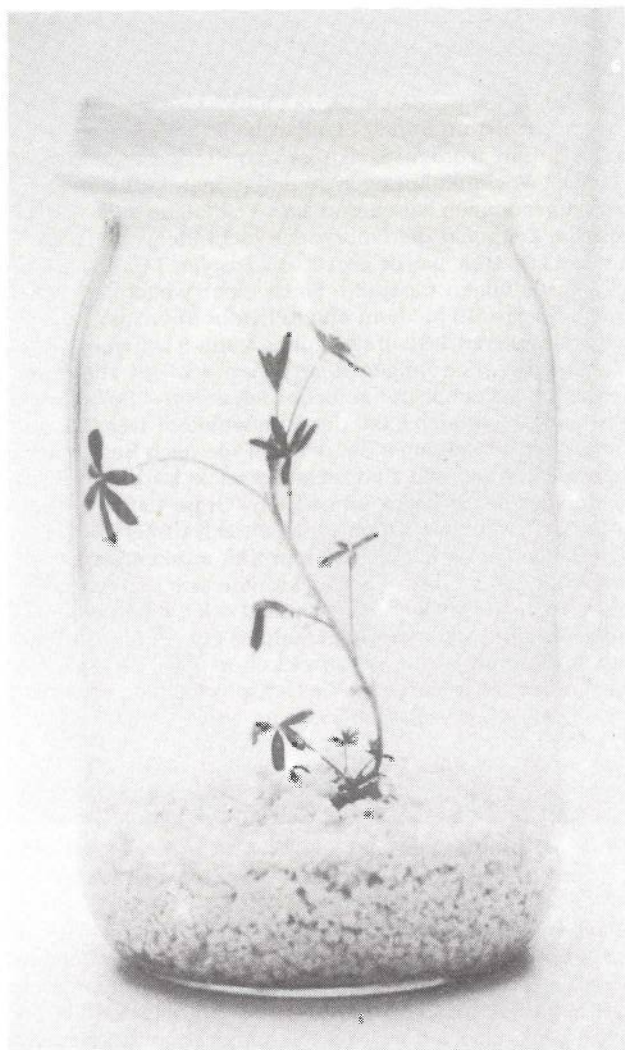


Abb. 3b: **Bewurzelter Sproß derselben Embryopflanze**

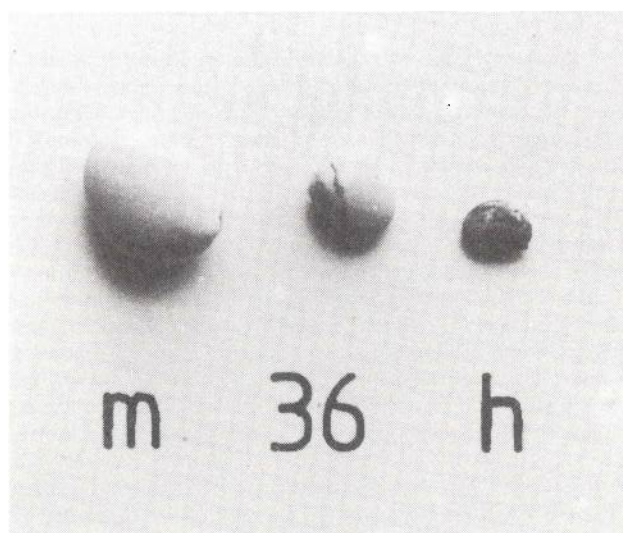


Abb. 4: **Samen der Hybridpflanze Nr. 36**
Als Vergleich links Samen von *L. mutabilis*, rechts Samen von *L. hartwegii*

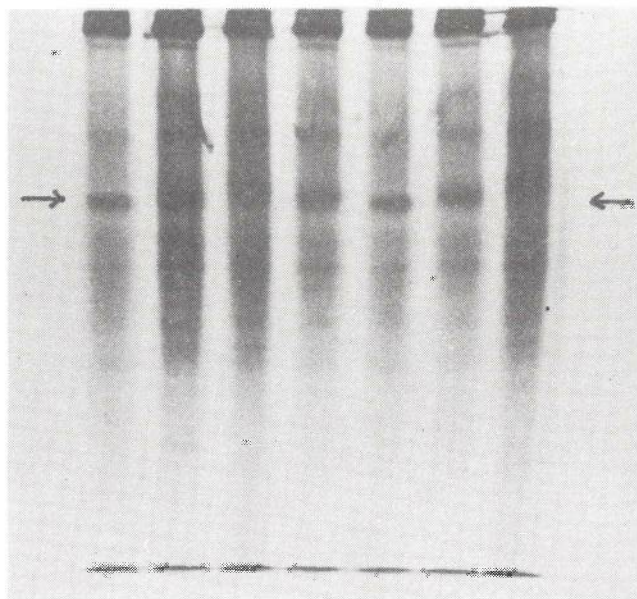


Abb. 5: **Natives Proteingel von Blattextrakten**
Von links nach rechts: *L. hartwegii*, Hybrid, *L. mutabilis* Hybrid, *L. hartwegii*, Hybrid, *L. mutabilis*

In einem weiteren Versuch wurde die Einwirkungszeit der Phytohormone auf 3 Tage verkürzt, mit dem Ziel, die anfängliche Callusbildung bei 14 tägiger Hormoneinwirkungszeit zu unterdrücken, um die Sproßbildung zu fördern. Die Embryonen wurden aus 10 Hülsen isoliert, die 18-27 Tage nach Bestäubung geerntet worden waren. Nach einer Woche Kultur waren von den 18 kultivierten Embryonen nur noch 3 Embryonen vital, von denen einer (Versuchsnummer 42) einen normal ausgebildeten Sproß hatte.

Ein Vergleich der 5 Versuchsansätze ist zwar nur bedingt möglich, es können aber dennoch Schlußfolgerungen für weitere Versuche gezogen werden. 1. Die Erfolgsaussichten, eine Pflanze zu erhalten sind größer, wenn die Hybridhülsen mindestens 18 Tage auf der Mutterpflanze verbleiben können. 2. Das Zweiphasensystem, bei dem die anfangs zugesetzten Phytohormone allmählich verdünnt werden, ist geeignet, ein Absterben der Embryonen zu verhindern.

Die Entwicklung der Pflanzen bzw. Sprosse von Versuchsnummern 30, 32, 33, 36 und 42 verlief unterschiedlich. Während bei Versuchsnummer 36 (Abb. 2) sofort eine Pflanze erhalten wurde, trat bei den übrigen Versuchsgliedern zunächst eine Vielfachsproßbildung mit verkümmert Wurzel auf (Abb. 3a). Eine Bewurzelung war nur bei den in vitro vermehrten Sprossen möglich. Diese Sprosse jedoch konnten in einer für die Lupinenanzucht günstigeren Jahreszeit bewurzelt werden, so daß ein besserer Hülsenansatz zu erwarten ist, als das bei Versuchspflanze 36 der Fall war, die im Winter blühte. Abb. 4 zeigt einen Vergleich der geernteten Samen. Die Größe der geernteten Samen liegt zwischen denen von geselbsteten Samen aus *L. mutabilis* und *L. hartwegii*.

Die Hybridnatur war bei den Embryopflanzen schon im frühen Entwicklungsstadium an der Behaarung erkennbar. Der Blatt- und Wuchstyp war ähnlich dem von *L. mutabilis*.

Der Hybridcharakter der Embryopflanzen konnte durch Gelelektrophorese bestätigt werden (Abb. 5). In nativen Proteingelen unterscheiden sich die Hauptbanden bei Blattextrakten von *L. mutabilis* und *L. hartwegii*. Während die Bande 1 (in Abb. 5 mit Pfeil markiert) bei *L. hartwegii* schneller läuft als die entsprechende Bande von *L. mutabilis*, die sich darüber hinaus noch in 3-4 Unterbanden aufspaltet, liegt diese Bande bei den Embryopflanzen dazwischen.

Die regenerierten Embryopflanzen sind Arthybriden. Sie können nicht nur für weitere züchterischen Arbeiten eingesetzt werden, sondern sind auch hervorragend als Ausgangsmaterial für in vitro Untersuchungen geeignet wie die Protoplastenisolierung.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau Rita Wilkens für ihre exzellente technische Assistenz.

Zusammenfassung

Abortive Embryonen aus der Kreuzung *L. mutabilis* x *L. hartwegii* können in vitro zu Pflanzen regeneriert werden, wenn die Embryonen aus noch vitalen Hülsen isoliert werden, die wenigstens 18 Tage an der Mutterpflanze verblieben sind. Für den Kulturerfolg ist ein Phytohormonzusatz zu Beginn der Kultur von ausschlaggebender Bedeutung. Mit einem Zweiphasensystem wurden 5 Arthybridpflanzen regeneriert. Der Hybridcharakter wurde durch Vergleich morphologischer Eigenschaften und Analyse der Proteinmuster nachgewiesen.

The Use of Embryo Culture for the Regeneration of Interspecific Hybrids from *L. mutabilis* x *L. hartwegii*

Crosses of *L. mutabilis* x *L. hartwegii* do not yield viable seeds because the embryos stop growing in the late globular stage. Attempts were made to cultivate these abortive embryos in vitro.

For a successful culture the age of the embryo was of great importance. Pods had to be at least 18 days old.

The embryos require the addition of phytohormones during the first days of culture. The following combination of agar and liquid medium turned out to be superior to other systems tested. T39 agar is poured into 35 mm square petri dishes. The agar contains: the nutrients of the B5 medium (Gamborg et al., 1968), sodium pyruvate 45 µM, citric acid 48 µM, malic acid 75 µM, fumaric acid 86 µM, fructose 0.7 mM, ribose 0.8 mM, xylose 0.8 mM, mannose 0.7 mM, cellobiose 0.4 mM, D-calciumpantothenate 10 µM, folic acid 0.5 µM, p-aminobenzoic acid 0.07 µM, biotin 0.02 µM, choline chloride 3.6 µM, ascorbic acid 5.7 µM, vitamin B 12 0.007 µM, casamino acids 200mg/l, sucrose 87 mM, glucose 25 mM, and agar 0.8 %. After cooling small wells were pressed into the agar with a small hot spatula. Droplets of T19/4 medium were placed into the wells in which the embryos were cultured. The T19/4 medium contains the compounds of T 39 with the exception of glucose plus the following additions: mannitol 150 mM, sucrose 150 mM, NAA 1.5 mg/l, and BA 0.4 mg/l.

After one week a fresh drop of T19/4 medium was added and after another week drops of hormone free MB medium

(Schäfer-Menuhr und Stürmer, 1987). Petri dishes were cultured in humid boxes at 23-25 °C, 4-6 klx for 12 hrs.

Five plantlets were obtained. One of them was directly transferred to the greenhouse. Seeds were obtained which were in size between those of *L. mutabilis* and *L. hartwegii*. The other plantlets were propagated in vitro and some of them rooted in spring for better yield of pods during the growing season.

Comparison of morphological characters and analysis of polypeptide patterns were used to prove the hybrid nature of the regenerated plantlets.

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.

Jaronowski, J.: Fertilization and embryo development in the genus *Lupinus*. - Genetica Polonica 3 (1962), S. 333-368.

Kazimierski, T.: Interspecific crossing in the Mediterranean and American lupin species. - Wiss. Zeitschrift d. Karl-Marx-Universität Leipzig. Math. Naturwiss. Reihe 13 (1964), S. 697-698.

Laemmli, U.K. - Nature (London) 277 (1970), S. 680 ff.

Roy, N.N. and Gladstones, J.S.: Prospects for interspecific hybridization of *Lupinus atlanticus* Gladst. with *L. cosentinii* Guss. - Theoretical and Applied Genetics 71 (1985), S. 238-241.

Sator, Ch.: Regeneration von Lupinenpflanzen aus Embryonen. - Landbauforschung Völkenrode 35 (1985), S. 1-4.

Schäfer-Menuhr, A.: Embryo culture of lupin species. - Proc. 4th Int. Lupin Conference, (1986) Perth, Australia, S. 288.

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.

Swiecicki, W.: studies on the interspecific hybrid *Lupinus hispanicus* Boiss. et Reut. x *Lupinus luteus* L. - Lupin Newsletter 8 (1985), S. 24-25.

Vuillaume, E. and Hoff, T.: Development in vitro d'embryons immatures de *Lupinus albus* L. et de *Lupinus mutabilis* Sweet par culture de gousses, d'ovules ou d'embryons isoles. - Agronomie 6 (1986), S. 925-930.

Williams, W., Akhtar, M.A. and Faluyi, M.: Cross compatibility between European and American *Lupinus* species. - Bot. J. Lin. Soc. 81 (1980), S. 225-232.

Verfasser: Schäfer-Menuhr, Angelika, Dr. agr. und Busmann, Almut, Dipl.-Ing. agr., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Institutsleiter: Prof. Dr. agr. Manfred Dambroth; Czerwinski, Tomasz, M. Sc., Plant Breeding Station Wiatrowo, Polen.