

Vergleich des Wachstumsverhaltens einiger Zellsuspensionskulturen von *Lupinus polyphyllus* und *Lupinus hartwegii*

ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Seit mehr als 20 Jahren werden Zellsuspensionskulturen routinemäßig für biochemische und molekularbiologische Arbeiten und für Untersuchungen über Stofftransport und Bio-transformation eingesetzt. Zellsuspensionskulturen haben gegenüber Pflanzenteilen oder Calluskulturen den Vorteil, daß sie schneller wachsen, feiner verteilt sind und sich dadurch viele Techniken der Mikrobiologie auf Zellen höherer Pflanzen übertragen lassen. In Suspensionen können Radioisotope, Antibiotika und andere Wirkstoffe viel besser appliziert werden, als über feste Nährböden. Die wohl bekannteste Zelllinie ist die Sojakultur SB-1 aus Saskatoon, Canada (Gamborg et al., 1968), die sich sehr schnell teilt und für die vielfältigsten Untersuchungen eingesetzt wird.

Auch bei Lupinen werden Zellsuspensionskulturen eingesetzt: für Untersuchungen an t-RNA (Sroga, 1984), Synthese von Alkaloiden (Wink et al., 1980, 1983) und Protoplastenisolation zum Einsatz bei Fusionen (Schäfer-Menuhr, 1988). Sroga hat das Wachstumsverhalten der Zellkulturen von *L. angustifolius* cv. Turkus, die sie für ihre molekularbiologischen Arbeiten einsetzt, genau analysiert (1983). Darüber hinaus gibt es in der Literatur keine Daten über das Wachstum von Zellkulturen anderer Lupinenarten.

Vom züchterischen Standpunkt aus sind *L. polyphyllus* und *L. hartwegii* besonders interessant, weil sie determinierten Wuchs haben, den man durch Protoplastenfusion auf unsere Kulturformen übertragen möchte. Da es nicht nur für die Gewinnung von Protoplasten aus Zellkulturen dieser Lupinenarten sondern auch für den Fusionserfolg entscheidend ist, daß Protoplasten aus der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt werden, wurde das Wachstumsverhalten der Zellsuspensionskulturen von *L. hartwegii* und *L. polyphyllus* untersucht.

Material und Methoden

Zellsuspensionskulturen von *L. hartwegii* wurden wie die Zellsuspensionskulturen von *L. polyphyllus* angezogen (Schäfer-Menuhr, 1988) und wöchentlich subkultiviert. Bei *L. hartwegii* handelte es sich um eine Wildform, Linie 7/3 Schröder, und bei *L. polyphyllus* um den Typ Russel, einer im Handel unter der Bezeichnung Minarette erhältlichen F₁ Hybride. Der Wachstumsverlauf wurde entweder durch Messung des Sinkvolumens unter sterilen Bedingungen (Schäfer-Menuhr, 1988) verfolgt oder indem 10 ml Proben entnommen wurden, in denen folgende Parameter bestimmt wurden: 1. das Sinkvolumen nach 20 min Sedimentation in graduierten 10 ml Röhrchen, 2. das Frischgewicht derselben Probe, die mit einer Vakuumpumpe abgesaugt wurde, 3. der pH-Wert des

Abbildung 1: Vergleich der Sinkvolumina von vier Subkulturen der Zelllinie Mina 11

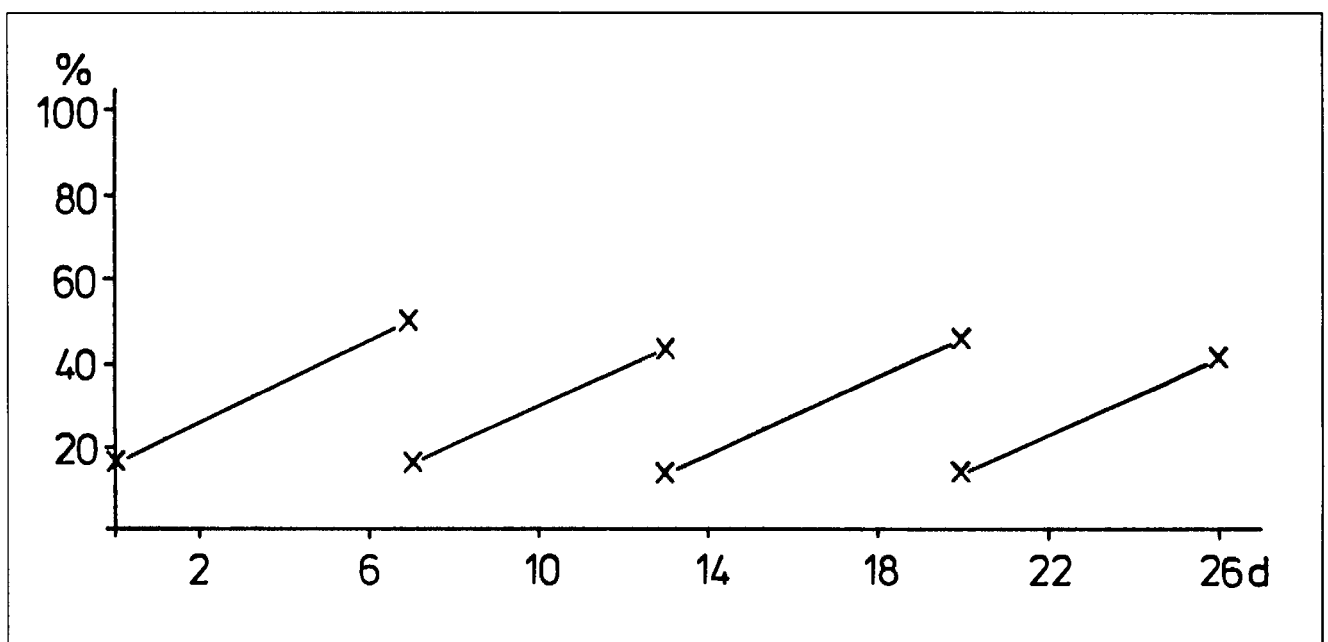


Tabelle 1: Sinkvolumen einiger Zellkulturen von *L. polyphyllus*

Linie	75 ml ¹		50 ml ²		
	x ³	s	x	s	
Wt 2/2	1	85,1	12,1	78,3	10,8
	2	b ⁴ 71,7	37,2	b 82,5	10,6
	3	b 69,2	18,1	b 84,0	12,7
	4	b 63,1	22,3	b 80,4	30,5
	5	b 34,7	10,5	b 42,8	7,4
	6	b 34,5	9,5	b 45,0	12,7
	7	71,0	11,8	45,3	22,6
	8	65,3	26,5	b 87,1	40,0
Wt 5/1	1	b 55,3	23,0	b 47,4	26,3
	2	b 27,7	10,1	b 39,5	7,8
	3	b 11,0	5,7	b 24,5	15,0
	4	b 50,8	10,5	b 60,9	14,0
	5	69,3	23,0	61,0	25,6
	6	b 26,3	11,0	b 45,0	-
	7	b 31,0	14,4	b 44,8	16,7
	8	56,8	10,3	69,1	32,4
Mina 1	1	76,9	27,3	68,4	6,9
	2	66,7	19,3	70,5	6,2
Mina 2	1	b 44,8	17,1	b 69,1	7,6
	2	61,8	11,2	61,0	7,2
	3	b 44,6	4,7	b 67,0	13,2
	4	b 55,0	13,9	b 63,7	18,0
	5	b 66,3	22,4	b 70,6	2,2
	6	b 41,8	4,4	b 57,0	12,7
	7	b 48,6	28,6	b 63,4	8,1
	8	b 60,3	16,2	b 63,0	12,7
	9	b 45,6	4,2	b 61,0	14,0
	10	64,7	9,7	70,3	5,8
Mina 5	1	b 38,8	1,5	57,4	8,7
	2	49,7	2,6	b 63,0	21,2
	3	50,7	12,3	b 51,3	9,0
	4	b 37,3	12,4	52,3	10,8

¹ 75 ml Kultur wurde zu 75 ml frischem Medium gegeben und alle 3 Tage subkultiviert.

² 50 ml derselben Kultur wurde zu 100 ml frischem Medium gegeben und alle 6-7 d subkultiviert.

³ Durchschnitt des Sinkvolumens in 150 ml von 6 Passagen, bzw. 4 Passagen bei mit b gekennzeichneten Kulturen.

⁴ Kulturen färbten sich braun und starben ab.

Filtrats und 4. das Trockengewicht der abgesaugten Probe, die in einer Gefriertrocknungsanlage bei -40 - +20°C getrocknet worden war.

Ergebnisse und Diskussion

Zellsuspensionskulturen von Lupinen sind von den Arten, die weiche Calli auf auxinreichen Medien bilden, relativ leicht zu erhalten. Dies sind hauptsächlich die kleinsamigen Arten

amerikanischen Ursprungs (2n=48) wie *L. elegans*, *L. hartwegii*, *L. nanus* und *L. polyphyllus*. Von *L. polyphyllus* und *L. hartwegii* wurden Zellsuspensionen angelegt, um sie für Fusionsexperimente einzusetzen. Die Zellkulturen von *L. polyphyllus* wachsen zwar schneller als die von *L. hartwegii*, haben jedoch die negative Eigenschaft, daß Kulturen, die vorher gut wuchsen, plötzlich braun werden und absterben. Es erschien deshalb notwendig, das Wachstumsverhalten der Zellkulturen zu untersuchen, um 1. Hinweise auf den optimalen Zeitpunkt für die Subkultur zu erhalten und 2. den Zeitpunkt der exponentiellen Wachstumsphase zu erkennen, in dem man am besten die Protoplasten herstellt, die für Fusionen eingesetzt werden.

Verschiedene Zelllinien von *L. polyphyllus* (Wildtyp = Wt und Typ Russel = Mina) wurden entweder zu gleichen Teilen oder im Verhältnis 1:3 in frisches Medium überführt und alle 3 Tage bei 1:2 verdünnten Kulturen und alle 6-7 Tage bei 1:3 verdünnten Kulturen subkultiviert. Ein geringeres Animpfvolumen wurde nicht gewählt, weil sich in vorangegangenen Versuchen gezeigt hatte, daß bei geringem Inokulum die Aggregatgröße anstieg und die Kulturen klumpig wuchsen. In Tabelle 1 sind die Durchschnitte der erzielten Sinkvolumina in 150 ml Gesamtvolumen dargestellt. Nach 4 Passagen waren die meisten Versuchsglieder abgestorben unabhängig davon, ob 50 oder 75 ml Kulturen eingesetzt worden waren. Das maximal erzielte Sinkvolumen lag bei etwa 50%. Vergleicht man die stabilsten Kulturen, so lag der Transfermodus für Wt 2/21 richtig, was durch eine verhältnismäßig niedrige Standardabweichung zum Ausdruck kommt. Das gleiche gilt für Mina 22 und Mina 210. Für Wt 2/27 scheint eine 1:2 Verdünnung mit frischem Medium günstiger zu sein als eine 1:3 Verdünnung. Für Mina 11 und Mina 12 ist eher das Gegenteil der Fall. Kulturen von Wt 2/28, Mina 52 und Mina 53 waren nur bei einer 1:2 Verdünnung stabil, während Mina 51 und Mina 54 eine 1:3 Verdünnung erforderten. Weder aus Tabelle 1 noch aus den Einzeldaten lassen sich Gründe für das Absterben der anderen Versuchsglieder herleiten. Die aufgrund dieser Daten selektierten Zelllinien Wt 2/21, Wt 2/22, Wt 5/15, Wt 5/18, Mina 11, Mina 12, Mina 22 und Mina 210 zeigten auch im weiteren Verlauf der Kultur eine verhältnismäßig geringe Neigung zur Braunfärbung.

Als Beispiel für eine stabil wachsende Kultur ist in Abb. 1 die Erhöhung des Sinkvolumens von der Zelllinie Mina 11 graphisch aufgetragen. Die Kulturen waren im Verhältnis 1:3 angeimpft und in dem Rhythmus 7-6-7-6 Tage subkultiviert worden. Die Steigung der eingezeichneten hypothetischen Geraden blieb während der 4 Passagen annähernd gleich und betrug bei den zwei durchgeführten Versuchen im Mittel 4.64 mit einer Standardabweichung von 0.47, d.h. 10%.

Die sehr stabil wachsende Zelllinie Mina 11 und die am schnellsten wachsende Zelllinie von *L. hartwegii*, hart 3, wurden näher charakterisiert, indem täglich 10 ml Proben entnommen wurden, in denen das Sinkvolumen, das Frischgewicht, der pH-Wert und das Trockengewicht bestimmt wurden. Durchschnittswerte sind in Abb. 2 dargestellt. Der Kurvenverlauf der Werte für Sinkvolumen, Frischgewicht und Trockengewicht von Mina 11 ist einer typischen Wachstumskurve ähnlich, wenn auch die lag-Phase von 2 Tagen nicht stark ausgeprägt ist, sondern eher schon der log-Phase zuzuordnen ist, die nach ca. 3 Tagen Kultur in die lineare Wachstumsphase übergeht. Nach 6 Tagen Kultur ist die stationäre Phase erreicht, in der der Zuwachs an Frischgewicht und Sinkvolumen stagniert und das Trockengewicht leicht abnimmt. Bei dem in Abb. 2 verwendeten Maßstab verlaufen die Kurven der Wachstumsparameter nahezu parallel. Bei hart 3

dagegen ist der Kurvenverlauf sehr viel flacher als bei Mina 11. Die Kurve von hart 3 für das Trockengewicht ist fast linear und für das Sinkvolumen und das Frischgewicht nach 3-4 Tagen Kultur linear. Die Übergänge von der lag- in die log- und lineare Phase sind praktisch nicht erkennbar. Im Gegensatz zu den Wachstumskurven von Mina 11 ist nach 8 Tagen Kultur die stationäre Phase noch nicht erreicht. Der pH-Wert des Mediums sinkt bei beiden Lupinenarten auf einen Wert von etwa pH 4 ab und bleibt dort annähernd konstant. Bei Mina 11 steigt er nach 4 Tagen Kultur wieder steil an und erreicht nach 7 Tagen Werte um pH 6, einem Zeitpunkt, bei dem es schon zu einer Abnahme der Trockengewichte kommt. Bei hart 3, der sehr viel langsamer wachsenden Kultur, erfolgt während des 1. Kulturtages eine Abnahme des pH-Wertes auf etwa pH 4, der dort während der folgenden 7 Tage Kultur annähernd konstant bleibt.

Vergleicht man die Wachstumskurven von *L. polyphyllus* und *L. hartwegii* mit denen von Zellsuspensionen von *L. angustifolius* cv. *Turkus* (Sroga, 1983), so ist der Wachstumsverlauf ähnlicher dem von *L. hartwegii* als dem von *L. polyphyllus*. Die Zellkultur von *L. angustifolius* erreicht nach etwa 12 Tagen Kultur die stationäre Phase. Im Gegensatz zu Kulturen von *L. hartwegii* ist jedoch das Verhältnis von Frischgewicht zu Trockengewicht weiter als bei *L. hartwegii* und eher mit dem von *L. polyphyllus* vergleichbar.

Die in Abb. 2 dargestellten Kurven sind Durchschnittswerte aus 6 Versuchen von Mina 11 und 8 Versuchen von hart 3. Aus diesen Daten von hart 3 und zusätzlichen in anderen Versuchen erhaltenen Werten von Mina 11 wurde die Verdopplungszeit nach der Formel $TD = T \log 2 / \log n - \log n_0$ berechnet. In Abb. 3 ist die Verdopplungszeit des Frischgewichtes in Abhängigkeit von der Konzentration des Inokulums aufgetragen. Bei Mina 11 ist eine Abhängigkeit der Verdopplungszeit vom Inokulum nicht so stark ausgeprägt wie bei hart 3 und schwankt

nur zwischen 2 und 3 Tagen. Bei hart 3 jedoch kann die Verdopplungszeit 3 bis 7 Tage betragen und ist umso höher, je stärker das Inokulum konzentriert ist.

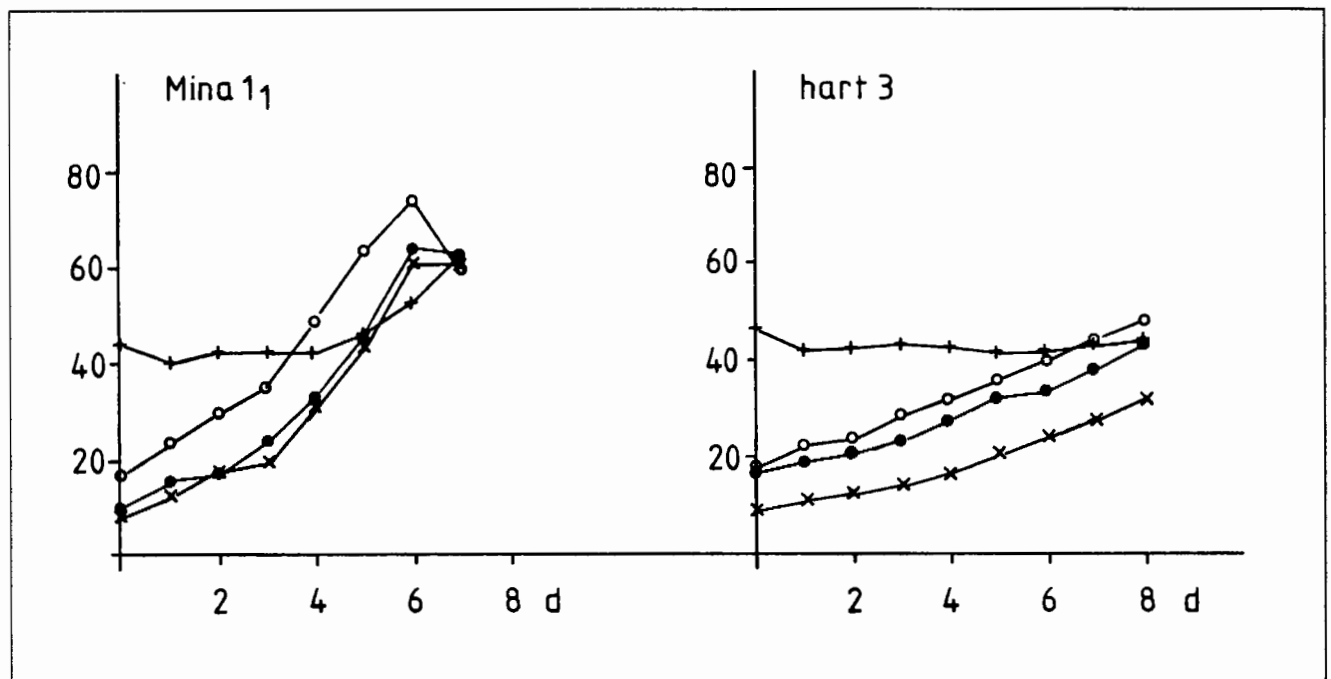
Vergleicht man die Frischgewichte, die maximal erhalten wurden, so ergeben sich für Mina 11 0.459 g/ml bei einer Kultur, die mit 0.062 g/ml angeimpft worden ist (7.5fache Erhöhung), 0.433 g/ml bei einer Kultur, die mit 0.044 g/ml verhältnismäßig niedrig angeimpft worden ist (10fache Erhöhung) oder 0.421 g/ml bei einer mit 0.074 g/ml hoch angeimpften Kultur (5.6fache Erhöhung). Bei den Trockengewichten waren es 14.5 mg/ml bei einer mit 2.2 mg/ml niedrig angeimpften Kultur (6.6fach), 16.2 mg/ml bei einer Kultur, die mit 3.6 mg/ml angeimpft worden ist (4.5fach) oder 11.0 mg/ml bei einer Kultur, die mit 4.0 mg/ml Trockengewicht angeimpft worden ist (2.7fache Erhöhung).

Bei hart 3 liegen die Werte niedriger, denn nach 1 Woche haben anscheinend noch nicht alle Kulturkolben die stationäre Wachstumsphase erreicht. Abhängig von der Konzentration des Inokulums erhöht sich das Frischgewicht nach 7 Tagen Kulturdauer auf 0.228 g/ml (2.7fach) von einem Inokulum von 0.077 g/ml und das Trockengewicht auf 9.3 mg/ml (3.2fach) von 2.9 mg/ml Inokulum oder auf 9.1 mg/ml (2.1fach) von 4.3 mg/ml Inokulum.

Daß die erzielten Maximalwerte von der Konzentration des Inokulums abhängig sind, ist zum großen Teil damit zu erklären, daß mit dem Inokulum auch das alte Medium überführt wird. Da es sich bei den Schüttelkulturen um stationäre Systeme handelt, werden beim Wachstum Nährstoffe verbraucht und zwar umso mehr, je mehr Zellen in dem alten Medium gewachsen sind (Hahlbrock, 1975). Führt man in den Medien Leitfähigkeitsmessungen und Zuckerbestimmungen durch, so findet man z.B. nach 3 Tagen Kultur 70% der Leitfähigkeit und 65% des Zuckergehaltes und zwar nicht bezogen auf das fri-

Abbildung 2: Änderung der Wachstumsparameter im Verlauf der Kultur

Jeder Punkt ist der Mittelwert von 6 Messungen bei Mina 11 und 8 Messungen bei hart 3. Gefüllte Kreise = Sinkvolumen in %, x = Frischgewicht in g/150 ml, offene Kreise = Trockengewicht in mg/5 ml, Pluszeichen = pH-Wert.



sche Medium, sondern auf die Mischung, die sich aus der Mischung von frischem Medium mit altem Medium ergibt. Wenn also ein hohes Anfangsinokulum verwendet wird, das an Nährstoffen stärker durch erhöhtes Zellwachstum verarmt ist, schafft man damit gleichzeitig einen niedrigeren Ausgangswert an Nährstoffen und kommt dadurch sicher auch zu niedrigeren Wachstumsraten.

Während diese Abhängigkeit bei Mina 11 verhältnismäßig gering ist und zu einer Verschiebung der Verdopplungszeit für das Frischgewicht von 2 auf 3 Tage verantwortlich ist, ist sie bei hart 3 wesentlich ausgeprägter und kann nicht nur mit einer Verarmung des Mediums an Nährstoffen erklärt werden. Mikroskopische Untersuchungen zeigen bei Mina 11 ein relativ uniformes Bild der Zellen vom Zeitpunkt des Umsetzens bis zum Beginn der stationären Phase (Abb. 4 A). Die Zellen haben eine verhältnismäßig einheitliche Größe und Form und sind reich an Vakuolen auch in der logarithmischen Phase. Bei hart 3 ist die Größe und Form der Zellen heterogener (Abb. 4 B). Es werden häufig längliche Zellen gefunden, die jedoch nicht ausdifferenziert sind, sondern sich an den Polen teilen, wodurch z.T. lange Zellketten entstehen (Abb. 4 C). Neben den langgestreckten Zellen treten wie bei *L. polyphyllus* runde Zellen auf. Der Anteil beider Zelltypen schwankt nicht nur im Verlauf der Kulturperiode sondern auch innerhalb der Versuchsglieder und ist möglicherweise ein Grund für die Verlängerung der Verdopplungszeit für das Frischgewicht bei hoher Konzentration des Inokulums. In weiteren Experimenten soll versucht werden, Zelllinien zu selektieren, die nur einen Zelltyp enthalten.

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 0318942 A/A 23/87-Z.F. gefördert. Besonderer Dank gilt Frau Claudia Matthes und Frau Rita Wilkens für ihre exzellente technische Assistenz.

Zusammenfassung

Von *Lupinus polyphyllus* wurden Zelllinien selektiert, die eine geringe Neigung zur Braunfärbung haben. Die sehr stabil wachsende Zelllinie Mina 11 und die am schnellsten wachsende Zelllinie von *Lupinus hartwegii*, hart 3, wurden näher charakterisiert. Mina 11 hat eine nicht stark ausgeprägte lag-Phase von 2 Tagen, an die sich die log-Phase anschließt, die nach ca. 3 Tagen Kultur in die lineare Wachstumsphase übergeht. Nach 6 Tagen Kultur ist die stationäre Phase erreicht, in der der Zuwachs an Frischgewicht und Sinkvolumen stagniert und das Trockengewicht leicht abnimmt. Hart 3 wächst langsamer. Nach 8 Tagen Kulturdauer ist die stationäre Phase noch nicht erreicht. Die Wachstumskurve ist annähernd linear. Die Übergänge von der lag- in die log- und lineare Phase sind nicht klar erkennbar. Bei beiden Lupinenarten ist die Verdopplungszeit für das Frischgewicht von der Konzentration des Inokulums abhängig. Während es bei Mina 11 nur zu einer Verschiebung von 2 auf 3 Tage kommt, kann bei hart 3 eine höhere Zelldichte die Werte bis auf 7 Tage verschieben. Maximal wurden bei Mina 11 Frischgewichte von 0.45 g/

Abbildung 3: Einfluß der Zelldichte des Inokulums auf die Verdopplungszeit des Frischgewichts

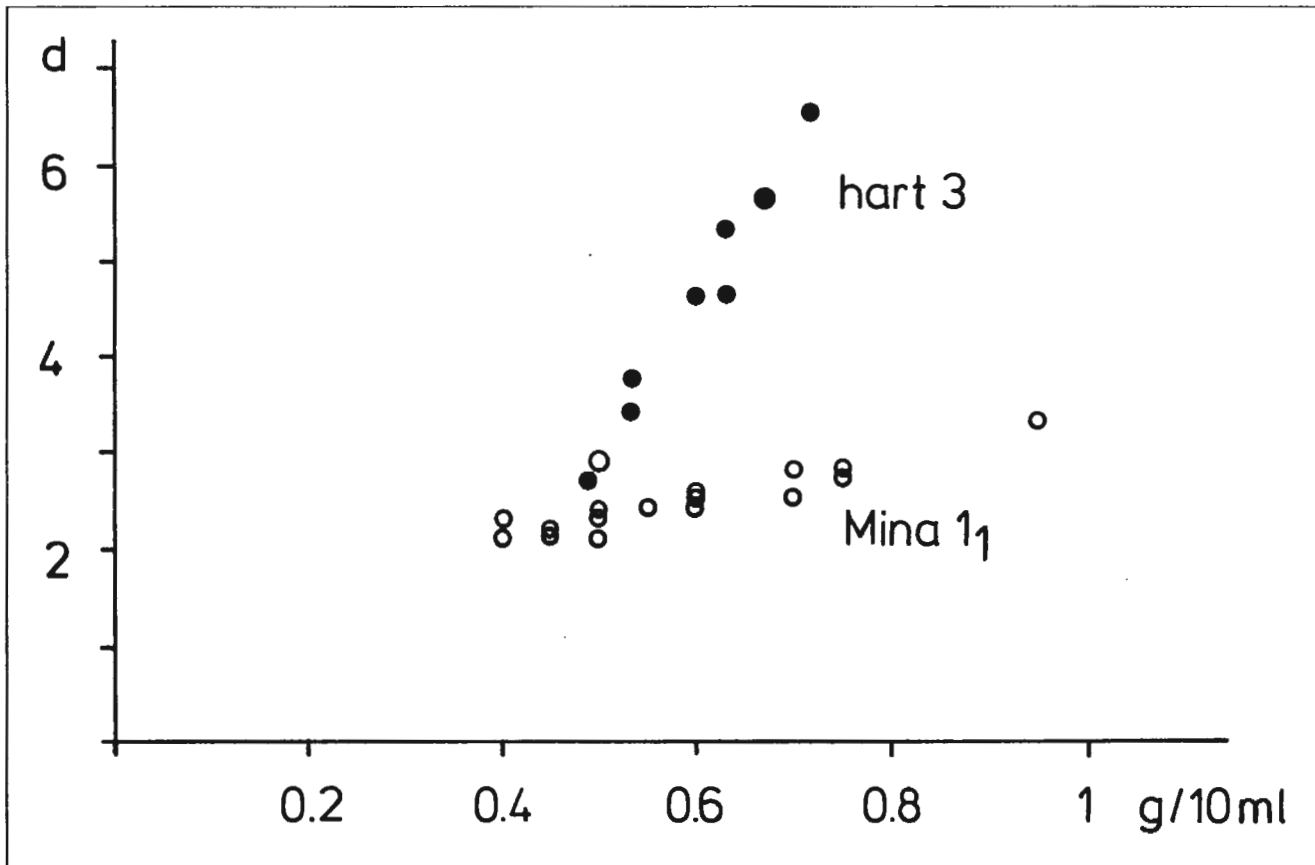
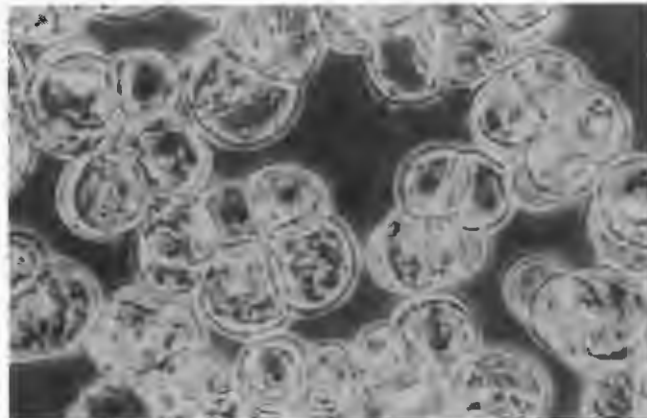


Abbildung 4: Mikroskopische Bilder der Zellkulturen von oben nach unten:
 Mina 11 nach 3 Tagen Kultur [A]
 Hart 3 nach 5 Tagen Kultur [B]
 Lange Zellketten in Kulturen von hart 3 [C]



ml erhalten (10fache Erhöhung) und bei hart 3 0.23 g/ml (2.7fache Erhöhung). Mikroskopische Untersuchungen zeigen bei Mina 11 ein relativ uniformes Bild. Die Zellen haben eine verhältnismäßig einheitliche Größe und Form. Bei hart 3 dagegen werden häufig auch längliche Zellen gefunden, die sich an den Polen teilen. Der Anteil beider Zelltypen schwankt nicht nur im Verlauf der Kulturperiode sondern auch innerhalb der Versuchsglieder.

Comparison of growth curves of cell suspension cultures of *Lupinus polyphyllus* and *Lupinus hartwegii*

Stable cell lines were selected from *Lupinus polyphyllus*. One of them, Mina 11, and the fastest growing cell line of *Lupinus hartwegii*, hart 3, were characterized. Cultures of *L. polyphyllus* have terminated the log-phase of growing after 3 days of culture and are entering the linear phase. The stationary phase is reached after 6 days of culture. Cell cultures of *L. hartwegii* grow much slower and the curves are more leveled. A determination of phase changes is hardly possible. The doubling time of the fresh weight is influenced by the cell density of the inoculum. At a maximum a fresh weight of 0.45 g/ml (10-fold increase) was reached for *L. polyphyllus* and 0.23 g/ml (2.7-fold increase) for *L. hartwegii*. Microscopic examinations show that cells of *L. polyphyllus* are nearly uniform in size and shape throughout the culture period. Cultures of *L. hartwegii*, however, contain in addition also long cells which are not fully differentiated but are dividing at the poles.

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. 151-158.

Hahlbrock, K.: Further Studies on the Relationship between the Rates of Nitrate Uptake, Growth and Conductivity Changes in the Medium of Plant Cell Suspension Cultures. - Planta 124 (1975), S. 311-318.

Schäfer-Menuhr, A.: Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten. III. Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen von *Lupinus polyphyllus*. - Landbauforschung Völkenrode 38 (1988), S. 99-102.

Sroga, G.E.: Callus and Suspension culture of *Lupinus angustifolius* cv. Turkus. - Plant Science Letters 32 (1983), S. 183-192.

Sroga, G.E.: Half-life of tRNA and the Initial Rate of tRNA Accumulation in Plant Cells from Cell Suspension Cultures of *Lupinus angustifolius* cv. Turkus and *Petroselinum hortense* cv. Berlinska Growing at Different Rates. - J. Plant Physiol. 116 (1984), S. 81-89.

Wink, M., Witte, L., Schiebel, H.-M. and Hartmann, T.: Alkaloid Pattern of Cell Suspension Cultures and Differentiated Plants of *Lupinus polyphyllus*. - Planta medica 38 (1980), S. 238-245.

Wink, M., Witte, L., Hartmann, T., Theuring, C., and Volz, V.: Accumulation of Quinolizidine Alkaloids in Plants and Cell Suspension Cultures: Genera *Lupinus*, *Cytisus*, *Baptisia*, *Genista*, *Laburum*, and *Sophora*. - Planta medica 48 (1983), S. 253-257.

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