

Untersuchungen zur Zellteilungsaktivität von Zellsuspensionskulturen von *Lupinus polyphyllus*

ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR und RITA WILKENS

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Stabile Zellsuspensionen von *L. polyphyllus* haben in allen Stadien des Wachstumszyklus relativ große Zellen (Schäfer-Menuhr, 1989). Gereinigte Protoplastenpräparationen enthalten zwar unterschiedlich große Protoplasten, die jedoch alle reich an Vakuolen sind (Schäfer-Menuhr, 1988). Einerseits sind die vakuolenreichen Protoplasten gute morphologische Marker bei Fusionen mit Blattprotoplasten, andererseits sollte bei einem Einsatz von Zellkulturprotoplasten folgende Parameter bekannt sein:

1. Wie hoch ist der Ploidiegrad der Kultur
2. Ist die Kultur synchronisiert
3. Welche Mitoseraten liegen zum Zeitpunkt der Fusion vor.

Material und Methoden

Die Zelllinie Mina 1₁ von *L. polyphyllus* ist wie bei Schäfer-Menuhr (1988, 1989) beschrieben isoliert und charakterisiert worden.

Für die Kernuntersuchungen wurden die Zellen nach der Methode von Pfoesser und Kandel (1989) aufgearbeitet und die Zellkerne durch Einfrieren auf Trockeneis auf den Objektträgern fixiert. Die Objektträger wurden 2 Tage bei Zimmertemperatur getrocknet und erst unmittelbar vor der Auswertung für 30 min in Phosphatpuffer inkubiert. Anschließend wurden sie mit 1 µg/ml 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Interphasekerne und Mitosen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Erregerfilter IV, Sperrfilter 0/0/41) ausgezählt.

Das Trockengewicht wurde wie beschrieben bestimmt (Schäfer-Menuhr, 1989). Dieselben Proben wurden für die Proteinbestimmung wie folgt aufgeschlossen: ungefähr gleiche Mengen der gefriergetrockneten Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingewogen, mit 1 ml 1% SDS versetzt, 5 min geschüttelt und 3 x je 30 min bei -20° C eingefroren und bei Zimmertemperatur getaut. Anschließend wurden die Proben 3 min gekocht, 10 min hochtourig abzentrifugiert und der Überstand erneut 10 min abzentrifugiert. Die Proteinbestimmung erfolgte in den 1:5 verdünnten Überständen mit einer modifizierten Methode nach Lowry (Koeppel et al., 1983)

Ergebnisse und Diskussion

Erste Kernmessungen ergaben, daß die Ausgangskulturen sehr heterogen waren (Pfoesser, unveröffentl. Ergebnisse). Die Kulturen enthielten einen hohen Anteil an Zellen mit 4C-Gehalten und einen breiten Peak bei 8C. Der Peak bei 2C entspricht dem Anteil der diploiden Zellen in der G₁-Phase. Im

4C-Peak werden Kerne mit dem doppelten DNA-Gehalt erfaßt, also Zellen in der G₂-Phase, Zellen in Mitose und tetraploiden Zellen in der G₁-Phase. Der 8C-Peak enthält nicht nur tetraploide oder polyploide Kerne sondern auch Kerne mit durch Über- oder Unterreplikation veränderten Chromosomensätzen. Protoplasten aus einer solchen Suspensionskultur sind für Fusionen ungeeignet (Harms, 1985).

Von den Ausgangskulturen sind inzwischen stabile Zelllinien isoliert worden (Schäfer-Menuhr, 1989). Die Zelllinie Mina 1₁, aus der Protoplasten hergestellt werden können (Schäfer-Menuhr, 1988) wurde in 3-tägigen Intervallen subkultiviert. Die Subkultur während der linearen Phase des Wachstums und nicht wie sonst üblich zu Beginn der stationären Phase sollte selektiv das Wachstum der Zellen mit stabilen Chromosomenzahlen fördern (Evans und Gamberg, 1982), in diesem Fall 2n=48.

Eine Charakterisierung der Zelllinie auf der Basis von Trockengewicht und Proteingehalten ist in Abb. 1 dargestellt. Die Kurve für das Trockengewicht verläuft steiler als bei den Kulturen, die routinemäßig in der frühen stationären Phase umgesetzt wurden (Schäfer-Menuhr, 1989). Der Proteingehalt steigt während der ersten zwei Kulturstage stärker an als das Trockengewicht und verläuft dann parallel zur Trockengewichtskurve. Die Proteinmenge verdoppelt sich zu Beginn in durchschnittlich 0,8 Tagen, während der Wert für das Trockengewicht bei 2,1 Tagen liegt. Der Proteingehalt bezogen auf das Trockengewicht steigt während der ersten zwei Tage von 3-4% auf ca. 10% an und ändert sich nach 3 und 4 Tagen Kulturdauer nicht. Die geringeren Proteingehalte pro Trockengewicht zum Zeitpunkt 0, d.h. nachdem ein Drittel einer 3 Tage alten Kultur in frisches Medium überführt wurde, sind ein Phänomen, das ohne weitere Versuche nicht erklärbar ist. Rein rechnerisch liegen die Werte für das Trockengewicht zum Zeitpunkt 0 zu hoch und für das Protein zu niedrig. Die Erhöhung des Trockengewichtes zum Zeitpunkt 0, d.h. praktisch in der 1. Stunde nach dem Umsetzen, war bis auf wenige Ausnahmen bei allen Versuchen mit Zellkulturen von Lupinen beobachtet worden und könnte mit einer verstärkten Aufnahme von Nährstoffen erklärt werden. Über die rein rechnerisch zu niedrigen Proteinwerte zum Zeitpunkt 0 kann nur spekuliert werden, da es in der Literatur keine Hinweise über vergleichbare Versuche an Lupinenkulturen gibt.

Von Kolben dieser Zelllinie, die in 3-tägigen Intervallen subkultiviert wurden, um die Chromosomenzahl stabil zu erhalten, wurden Kernuntersuchungen durchgeführt. Die Anfärbung mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) war weitaus unproblematischer als Feulgen- oder Carbofuchsinfärbungen. Die Objektträger waren gut auswertbar, wenn der enzymatische Abbau der Zellwände hinreichend lange durchgeführt worden war, weil Zellfetzen zum Teil stark leuchten.

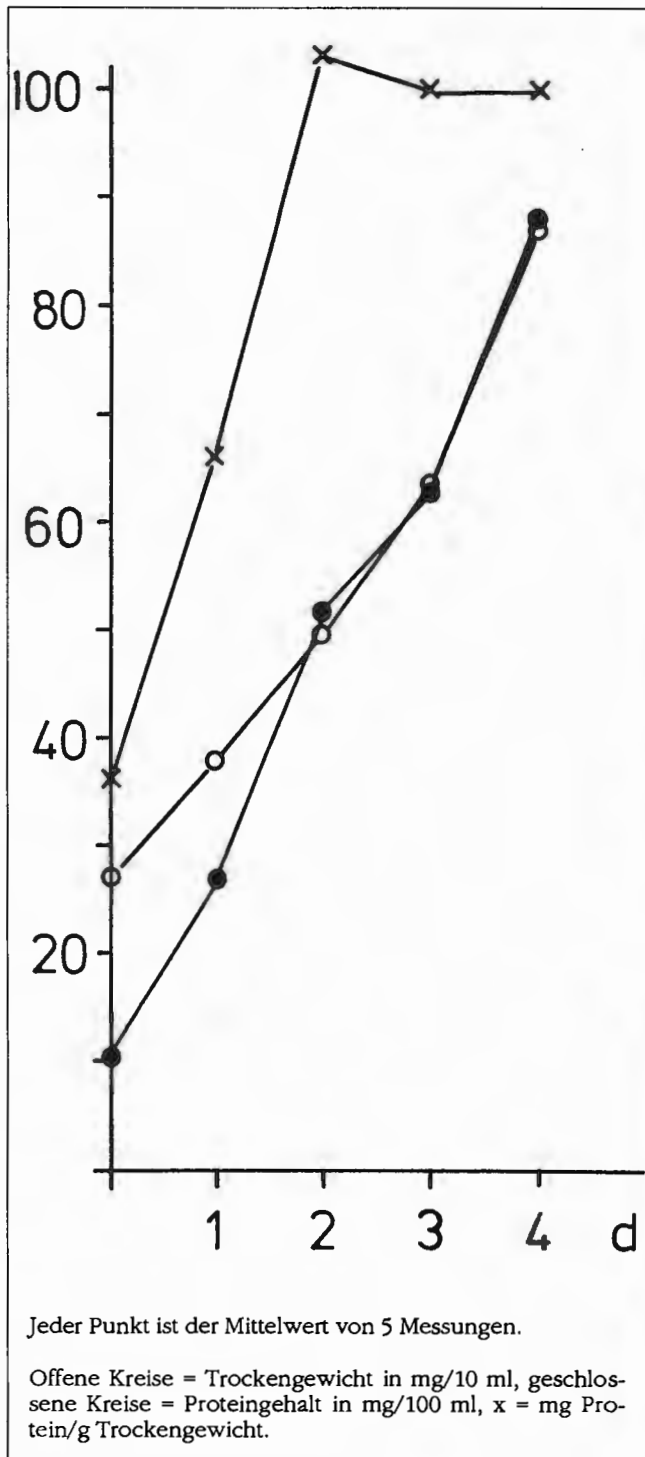


Abbildung 1: Änderung des Trockengewichtes und Proteingehaltes im Verlauf der Kultur

Die meisten beobachteten Mitosestadien waren Prophasen (Abb. 2 a). Andere Mitosestadien (Abb. 2 b) wurden verhältnismäßig selten beobachtet. Es war praktisch nicht möglich, Chromosomen auszuzählen, da die Chromosomen sehr klein sind und meistens nicht in einer Ebene liegen, so daß bei ausreichender Vergrößerung nicht alle Bereiche scharf eingestellt werden konnten. Obwohl Chromosomenzählungen nur Abschätzungen erlauben, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die Zellen in den untersuchten



Abbildung 2a:

Kernstrukturen in Zellsuspensionskulturen von *L. polyphyllus*

Zellkerne in Interphase und Prophase.



Abbildung 2b:

Kernstrukturen in Zellsuspensionskulturen von *L. polyphyllus*

Zellkerne in Anaphase.



Abbildung 3: Bildausschnitt eines mit DAPI gefärbten Objektträgers. Die Kerndurchmesser betragen 10-20 μm .

Kulturen diploid sind. In keinem Fall wurden tetraploide Kerne gefunden. Auffällige Veränderungen wie das Auftreten von Megachromosomen wurde nicht beobachtet.

Für die Bestimmung der Mitoseraten wurden Zellen von 2, 3 und 4 Tage alten Kulturen verwendet, da Protoplasten aus entsprechend alten Kulturen hergestellt werden und für Fusionen eingesetzt werden sollen. Die Probenahme erfolgte des-

Tabelle 1: **Mitoseraten der Zelllinie Mina 1₁ (L. polyphyllus) nach 2, 3 und 4 Tagen Kulturdauer**

	2 d	3 d	4 d
nach 24 h 0°C fixiert	18,3 (4,0)	19,0 (4,0)	21,8 (5,8)
direkt fixiert	19,5 (4,1)	23,2 (3,1)	24,7 (4,4)
Angegeben ist der Mittelwert in % und die Standardabweichung in Klammern.			

halb morgens zu der gleichen Zeit, wenn Protoplasten normalerweise hergestellt werden. Bei der ersten Versuchsreihe wurden die Zellen 24 h vor der Fixierung in Eis gestellt (Kao, 1982). Bei der zweiten Versuchsreihe wurden die Zellen nach 3maligem Waschen wie bei der Protoplastenherstellung sofort fixiert. Je Versuchsansatz wurden 800-1000 Kerne ausgezählt. Ein Bildausschnitt ist in Abb. 3 dargestellt. Mitosen sind von Interphasekernen, die stark leuchten, verhältnismäßig leicht zu unterscheiden, da sie strukturiert sind. In Grenzfällen wurden die Kerne als Interphasen gezählt.

In Tabelle 1 sind die Durchschnittswerte von beiden Versuchsansätzen dargestellt. Die Prozentzahlen der kaltebehandelten Versuche liegen geringfügig niedriger als die direkt fixierten Versuche. Die Kaltebehandlung lieferte kein besseres mikroskopisches Bild. Vergleichbarer mit den tatsächlichen Gegebenheiten sind die direkt fixierten Zellen. Die Mitoserate liegt nach 2 Tagen Kultur bei 20% und nach 3 und 4 Tagen Kulturdauer um 24%, wobei sich nur die Werte nach 2 und 4 Tagen Kulturdauer signifikant unterscheiden (Irrtumswahrscheinlichkeit 5%).

Die Mitoseraten liegen verhältnismäßig hoch. Bei *Datura* wurden 20-32 h nach dem Umsetzen maximal 20% gefunden (Evans und Gamberg, 1979), bei Wurzelspitzen von *L. luteus* 11% (Wrobel, 1986) und 12-30% bei speziell vorbehandelten Protoplasten von Weizen (Szabados und Dutton, 1980). Es wäre sehr spekulativ anzunehmen, daß die Kulturen durch den Umsetzmodus synchronisiert oder wie häufig beschrieben "teilweise" synchronisiert sind. Zwar unterliegen die Kulturen einem Tag/Nacht-Rhythmus, es wurden aber keine Untersuchungen darüber angestellt, welche Mitoseraten z.B. eine Probenahme am Nachmittag oder eine kontinuierliche Analyse in festen Stundenintervallen ergeben würden. Solche Untersuchungen wären jedoch mehr von akademischem Interesse, da die Zellen für die Isolation von Protoplasten zum Fusionieren immer morgens genommen werden.

Weitaus realistischer sind folgende zwei Erklärungen: daß entweder die Prophase lange dauert oder Kerne im G₂-Stadium als Prophasen mitgezählt wurden. Für Wurzelspitzen von *L. luteus* wurden für die G₁-Phase 3.6 h, S-Phase 4.8 h, G₂-Phase 2.1 h und die Mitose 2.5 h ermittelt (Wrobel, 1986). Wie weit diese Angaben auf Zellsuspensionskulturen von *L. polyphyllus* übertragbar sind, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilt werden. Interessant ist jedoch der Hinweis des Autors, daß der Übergang von der G₂- zur Prophase und damit Mitose nicht immer leicht zu erkennen war. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß ein Teil von G₂-Kernen als Prophasen gezählt wurden. Der Anteil an "falsch" gezählten Prophasen dürfte jedoch nicht sehr hoch sein, da die als Prophasen gezählte Kerne im Mittel eine größere Fläche aufwiesen als die Interphasekerne. Die Volumenzunahme der Zell-

kerne zwischen der G₁- und G₂-Phase beträgt im allgemeinen das 1.5 - 1.8fache (Nagl, 1976), was theoretisch einer 1.2-1.3fachen Vergrößerung der Fläche oder 1.15-1.22fachen Vergrößerung des Durchmessers betragen würde. Am wahrscheinlichsten ist daher die Erklärung, daß in den Suspensionskulturen die Prophase verhältnismäßig lange dauert.

Offen bleibt weiterhin die Frage, welche Auswirkungen Fusionen von Protoplasten haben, die sich in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befinden. Blattmesophyllprotoplasten sollen sich fast ausschließlich in der G₀- bzw. G₁-Phase befinden (Ashmore und Gould, 1982). Sowohl für Fusionen wie auch für Transformationen scheint es besonders geeignete (competent) Stadien zu geben, d.h. die späte G₁-Phase (Gould und Ashmore, 1982; Ashmore und Gould, 1982). Fusionen von Weizenprotoplasten in der Mitose und Reisprotoplasten in der Interphase führte in vielen Fällen zu "premature chromosome condensation" (PCC) (Szabados und Dutton, 1980). Ein Verlust von Chromosomen hat jedoch auch einen positiven Aspekt, denn gerade bei Fusionen von Arten mit hohen Chromosomenzahlen, wie das bei Lupinen der Fall ist, könnten Fertilitätsprobleme bei den regenerierten Hybridpflanzen auftreten.

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 0318942A/A23/87-Z.F. gefördert. Besonderer Dank gilt Herrn Ing. Martin Pfosser, Universität für Bodenkultur, Wien, für die praktische Einführung in die DAPI-Färbetechnik und Frau Claudia Matthes für ihre exzellente technische Assistenz.

Zusammenfassung

Eine Zelllinie von *L. polyphyllus* wurde in 3-tägigen Intervallen subkultiviert, um den diploiden Status zu erhalten. In diesen Kulturen verdoppelte sich das Trockengewicht in 2.3 Tagen und der Proteingehalt in 0.7 Tagen. Nach 2 Tagen Kultur betrug der Proteingehalt 10% des Trockengewichtes. Mikroskopische Untersuchungen der Zellkerne nach einer Anfärbung mit DAPI lassen nur auf diploide Zellen schließen, tetraploide Kerne oder auffällige Chromosomenveränderungen wurden nicht beobachtet. Die Kulturen hatten eine verhältnismäßig hohe Mitoserate, nach 2 Tagen Kulturdauer 20% und nach 3 und 4 Tagen Kulturdauer 23 und 24%.

Cell division activity of cell suspension cultures of *Lupinus polyphyllus*

A cell line of *Lupinus polyphyllus* was subcultured in 3 day intervals to maintain the diploid status of the cells. In these cultures dry weight doubled in 2.3 days, whereas the doubling time of protein was 0.7 days. Protein constituted 10% of dry matter after 2 days of culture. Microscopic examinations of nuclei stained with DAPI indicated only diploid cells. Tetraploid cells or major abnormalities of chromosomes were not observed. The cultures had a relatively high rate of mitosis, 20% after 2 days of culture and 23% and 24% after 3 and 4 days of culture.

Literatur

- Ashmore, S.E. und Gould, A.R.: Protoplast Fusion and the Cell Cycle. - *Plant Cell Reports* 1 (1982), S. 225-228.
- Evans, D.A. und Gamburg, O.L.: Effects of Para-Fluorophenylalanine on Ploidy Levels of Cell Suspension Cultures of *Datura Innoxia*. - *Environ. Expt. Bot.* 19 (1979), S. 269-275.
- Evans, D.A. und Gamburg, O.L.: Chromosome Stability of Cell Suspension Cultures of *Nicotiana* spp. - *Plant Cell Reports* 1 (1982), S. 104-107.
- Gould, A.R. und Ashmore, S.E.: Interaction of Purified DNA with Plant Protoplasts of Different Cell Cycle Stage: The Concept of a Competent Phase for Plant Cell Transformation. - *Theor. Appl. Genet.* 64 (1982), S. 7-12.
- Harms, C.T.: Hybridization by Somatic Cell Fusion. - In: *Plant Protoplasts*. Fowke, L.C. und Constabel, F. (Hrsg.): CRC Press, Boca Raton, Florida (1985), S. 169-203.
- Kao, K.N.: Staining Methods for Protoplasts and Cells. - In: *Plant Tissue Culture Methods*. Wetter, L.R. und Constabel, F. (Hrsg.): NRCC Press, Saskatoon, Saskatchewan (1982), S. 67-71.
- Koepsell, H., Menuhr, H., Ducis, I. und Wissmüller, Th.F.: Partial Purification and Reconstitution of the Na⁺-D-glucose Cotransport Protein from Pig Renal Proximal Tubules. - *J. Biol. Chem.* 258 (1983), S. 1888-1894.
- Nagl, W.: *Zellkern und Zellzyklen*. Ulmer, Stuttgart (1976).
- Pfossier, M. und Kandler, R.: Intraspecific DNA Content Variation Among *Vicia Faba* Cultivars as Detected by Flow Cytometry of DAPI Stained Cell Nuclei. - *Plant breeding* (im Druck).
- Schäfer-Menuhr, A.: Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten. III. Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen von *Lupinus polyphyllus*. - *Landbauforschung Völkenrode* 38 (1988), S. 99-102.
- Schäfer-Menuhr, A.: Vergleich des Wachstumsverhaltens einiger Zellsuspensionskulturen von *Lupinus polyphyllus* und *Lupinus hartwegii*. - *Landbauforschung Völkenrode* 39 (1989), S. 100-104.
- Szabados, L. und Dudits, D.: Fusion between interphase and mitotic plant protoplasts. Induction of premature chromosome condensation. - *Exp. Cell. Res.* 127 (1980), S. 442-226.
- Wrobel, B.: Duration of cell cycle of meristematic cells in *Lupinus luteus* L. root. - *Acta Univ. Nicolai Copernici Biol.* 28 (1986), S. 37-50.

Verfasser: Schäfer-Menuhr, Angelika, Dr. agr., Wilkens, Rita, biol. tech. Ass., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. agr. Manfred Dambrot.