

Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten

III. Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen von *Lupinus polyphyllus*

ANGELIKA SCHÄFER-MENUHR

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Die großsamigen Kulturlupinen, z.B. *L. angustifolius* und *L. luteus*, haben qualitativ hochwertige Inhaltsstoffe, vergleichbar mit denen der Sojabohne, liegen aber im Samenertrag zu niedrig, um konkurrenzfähig zu sein. Eine Steigerung des Ertrages wäre denkbar durch Übertragung der Gene für determinierten Wuchs, wie sie z.B. *L. polyphyllus* hat, eine bei uns heimische kleinsamige Art amerikanischen Ursprungs. Da Artkreuzungen bei Lupinen bisher nur bei wenigen sehr nahe verwandten Arten erfolgreich durchgeführt werden konnten, ist eine Übertragung dieser Gene in naher Zukunft vielleicht eher durch Protoplastenfusion möglich.

Bei der Protoplastenfusion werden vegetative Zellen nach enzymatischem Verdau der Zellwände durch chemische Mittel oder elektrischen Puls miteinander verschmolzen. Fusionsprodukte können unter einem Mikroskop oder Invertoskop erkannt und isoliert werden, wenn sich die Fusionspartner morphologisch unterscheiden. Protoplasten aus Blattzellen sind durch die grünen Protoplasten leicht von den Protoplasten zu unterscheiden, die aus Wurzelzellen oder Zellsuspensionskulturen hergestellt wurden, weil diese Protoplasten eine weiße bis gelbliche Farbe haben und von Cytoplasmasträngen durchzogen sind.

Während es Methoden gibt, Protoplasten aus Blättern von Lupinen zu isolieren und zu Calli zu regenerieren (Schäfer-Menuhr, 1987), müssen diese Techniken für die Isolierung der Protoplasten aus Zellkulturen von Lupinen noch getestet werden. Über Zellsuspensionskulturen von Lupinen ist in der Literatur berichtet worden (Sroga, 1983; Wink et al., 1980). Diese Autoren setzen die Suspensionskulturen für Untersuchungen über tRNA (Sroga, 1984) oder die Alkaloidsynthese ein (Wink, 1984).

In dieser Arbeit wird über den Einsatz von Suspensionskulturen zur Gewinnung von Protoplasten berichtet, um für später durchzuführende Fusionen Protoplasten von *L. polyphyllus* zur Verfügung zu haben, die sich morphologisch von Blattmesophyllprotoplasten anderer Lupinenarten unterscheiden.

Material und Methoden

Keimpflanzen von *L. polyphyllus* wurden steril angezogen (Schäfer-Menuhr, 1987). Die Samen stammten von wild wachsenden Pflanzen, im folgenden als Wildtyp bezeichnet und vom Typ Russel, einem im Handel unter der Bezeichnung Minarette erhältlichen FI-Hybrid. Etwa 2 mm dicke Wurzelabschnitte von 3 Wochen alten Keimpflanzen wurden zur Callusinduktion auf Nährböden gelegt und bei 24 h Licht und 23-25° C kultiviert. Als Nährmedium wurde das B5 Medium (Gamborg et al., 1968) verwendet, das einen Zusatz von 200 mg/l Caseinhydrolysat, 20 g/l Saccharose und 0,8 % Agar hatte und die Phytohormone 1-Naphthyllessigsäure (2 mg/l) und 6-Benzylaminopurin (1 mg/l) enthielt. Die Calli wurden nach 3 Wochen Kul-

tur auf das oben angegebene Medium umgesetzt. Für die Zellsuspensionskulturen wurde ein modifiziertes MS Medium (Gamborg, 1982) verwendet. Das Medium enthält die Makronährstoffe vom MS Medium (Murashige und Skoog, 1962), die Mikronährstoffe und Vitamine vom B5 Medium, 30 g/l Saccharose, zusätzlich 1 mM KH_2PO_4 und die Phytohormone 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (1 mg/l) und Kinetin (0,2 mg/l).

Weiche, locker gewachsene Calli wurden auf das Suspensionsmedium, das 0,8 % Agar enthielt, transferiert und dreimal in dreiwöchigen Abständen subkultiviert. Für die Suspensionskulturen wurden nur weiße und hellgrüne Calli mit hoher Wachstumsrate ausgewählt. Circa 1 g Callusgewebe wurde mit 5 ml Suspensionsmedium in 50 ml Erlenmeyerkolben bei 150 rpm (16 h Licht, 25° C) geschüttelt. Nach drei Tagen wurden weitere 5 ml Medium zugegeben und nach drei weiteren Tagen 20 ml. Nach einer weiteren Woche wurden die Kolben ausgewählt, in denen nur kleine Zellaggregate wuchsen und die die wenigsten rotbraun gefärbten Zellen enthielten. Der Inhalt dieser Kolben wurde zu 100 ml Medium (200 ml Erlenmeyerkolben) gegeben und wöchentlich subkultiviert, indem 50 ml Suspension zu 100 ml frischem Medium gegeben wurde. Die Kolben wurden mit Wattestopfen verschlossen.

Der Wachstumsverlauf der Zellsuspensionskulturen wurde durch Messung des Sinkvolumens bestimmt. Frisch subkultivierte Kolben wurden durch Schwenken gut gemischt und knapp 50 ml unter sterilen Bedingungen in sterile konische Kulturröhrchen (50 ml, Falcon) mit Graduierung gegossen. Nach 30 Min. wurde das Gesamtvolumen und das sedimentierte Zellvolumen abgelesen. Nach Durchmischung wurde der Inhalt der Röhrchen in die Kulturgefäße zurückgegossen und weiter unter Schütteln inkubiert. Die Messungen wurden täglich zur gleichen Stunde durchgeführt. Zur Auswertung wurde das Sinkvolumen in Relation zum Gesamtvolumen gesetzt. Eine Korrektur für die geringfügige Verdunstung des Mediums während des Kulturverlaufs wurde nicht vorgenommen.

Für die Isolation der Protoplasten wurden die Zellsuspensionen wie folgt aufgearbeitet: ca. 20 ml Suspension wurde auf ein Sieb (Porendurchmesser 50 μm) pipettiert und 3 x mit 50 ml Medium gewaschen. Der Rückstand im Sieb wurde 1 h in Plasmolyselösung pH 5,5 inkubiert und erneut über ein Sieb gegeben. Der Rückstand wurde in 20 ml Enzymlösung entweder stationär oder bei 50 rpm inkubiert. Die Lösungen, weitere Reinigungsschritte und die Kultur der Protoplasten sind wie beschrieben (Schäfer-Menuhr, 1987; Schäfer-Menuhr und Stürmer, 1987) durchgeführt worden oder sind im folgenden Text angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Zellsuspensionskulturen von *L. polyphyllus* wachsen als kleine Aggregate (Abbildung 2a), wenn die Passage der Kulturen alle 5-7 Tage erfolgt. Die Kulturen haben je nach

Zelllinie eine gelbliche bis hellgrüne Farbe. Zum Überimpfen wurden 50 ml Kultur in der späten logarithmischen Phase zu 100 ml frischem Medium gegeben. Nach einer lag-Phase von 2-3 Tagen beginnt die Phase vermehrter Zellteilung, in der Zellvolumen auf das 2,5-3,5fache ansteigt. Ab dem 6.-8. Tag beginnt die stationäre Phase, in der sich das Zellvolumen durch Zellvergrößerung weiter erhöht (s. als Beispiel die Wachstumskurve in Abb. 1). Der Wachstumsverlauf variiert innerhalb der Zelllinie und individueller Kolben und wird entscheidend beeinflusst von der Menge des angeimpften Zellvolumens und dem Zeitpunkt des Transfers, der in der späten logarithmischen Phase erfolgen sollte. Zelllinien vom Russeltyp wachsen langsamer als Wildtypkulturen, unterscheiden sich aber morphologisch nicht.

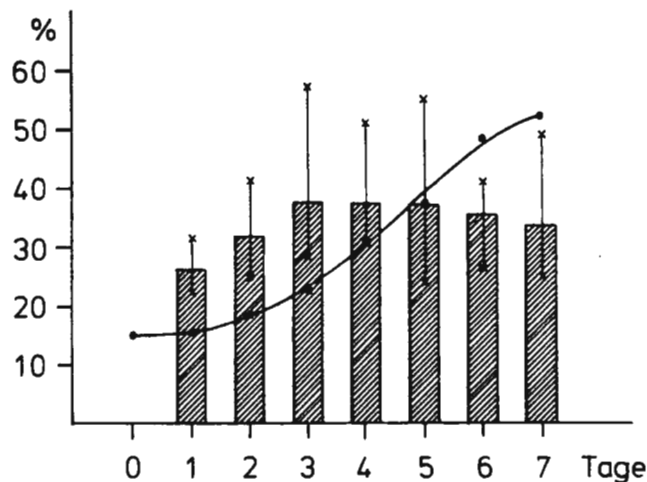


Abbildung 1: Vergleich der Protoplastenausbeute von Suspensionskulturen während einer Kulturperiode von 7 Tagen

Die mittleren Protoplastenausbeuten von 4 Zelllinien sind als Balken dargestellt. Je Versuchsglied wurden 2 Enzymbehandlungen durchgeführt. Jede Probe wurde dreimal gezählt. Die Protoplastenzahl wurde als Prozent aller gezählten Partikel ausgedrückt. Extremwerte individueller Kolben sind als 'x' markiert. Die Inkubationslösung bestand aus 1 % Cellulase Onozuka R 10 und 0,5 % Macerozym in 0,3 M Plasmolyse Lösung pH 5,5. Die Inkubationsdauer betrug 2 h bei 25° C und einer Schüttelfrequenz von 50 rpm. In der Abbildung ist eine für *L. polyphyllus* typische Wachstumskurve eingezeichnet.

Um Protoplasten aus Zellkulturen herzustellen, wurde zunächst in Vorversuchen überprüft, welche Enzyme und Enzymmischungen in 0,3 M und 0,6-M Plasmolyse Lösung Protoplasten freisetzen. Wie Tabelle 3 zeigt, sind in 0,3 M Plasmolyse Lösung hergestellte Protoplasten vitaler als in 0,6 M Plasmolyse Lösung. Cellulase Onozuka R 10 ist in der verwendeten Konzentration nicht in der Lage, viele Protoplasten freizusetzen, auch nicht in der Kombination mit 1 % Rohament P oder 1 % Rohament P und 0,5 % Pectinase. Sehr viel mehr Protoplasten werden durch 1 % Driselase freigesetzt. Die Ausbeute kann durch Zugabe von 1 % Onozuka R 10 und 0,5 % Pectinase gesteigert werden. Bei letzterer Inkubationslösung sind jedoch auch gehäuft Zellbruchstücke zu beobachten.

Reinigungsversuche ergaben, daß Präparationen, die mit 1 % Driselase, 1 % Onozuka und 0,5 % Pectinase hergestellt worden waren, einen erheblichen Anteil nichtprotoplastierter Zellen enthielten und die Protoplasten nicht stabil waren. In weiteren Vorversuchen wurde deshalb getestet, ob

Tabelle 1: Einfluß verschiedener Enzyme auf die Protoplastenbildung

		0,3 M Plasmolyse Lösung	0,6 M Plasmolyse Lösung
Onozuka	1 %	wenige vitale Protoplasten, kaum Zellbruch	wenige Protoplasten schlechter Qualität, kaum Zellbruch
Rohament P	1 %	keine Protoplasten, kaum Zellbruch	keine Protoplasten, kaum Zellbruch
Driselase	1 %	viele vitale Protoplasten, etwas Zellbruch	viele Protoplasten unterschiedlicher Qualität, etwas Zellbruch
Onozuka	1 %	viele vitale Protoplasten, gehäuft Zellbruch	viele Protoplasten unterschiedlicher Qualität, gehäuft Zellbruch
Driselase	1 %		
Pectinase	0,5 %		
Onozuka	1 %	wenige vitale Protoplasten, kaum Zellbruch	wenige Protoplasten schlechter Qualität, kaum Zellbruch
Rohament P	1 %		
Pectinase	0,5 %		

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach 3-4 h Inkubation bei 23-25° C.

die Protoplastenausbeute durch eine höhere Konzentration Onozuka R 10 in Kombination mit dem pektolytisch wirksamen Enzym Macerozym gesteigert werden kann. Ein Vergleich der Enzymwirkung von 1 % Driselase und 2 % Onozuka R 10 mit 1 % Macerozym wird in Tabelle 2 gezeigt. Die drei Tage alte Kultur von *L. polyphyllus* (wt) hatte einige relativ große Einzelzellen und kleine Zellen in den Zellaggregaten. In beiden Behandlungsstufen waren nach 1 h Enzymverdau erste Protoplasten zu sehen. Nach 2-3 h Inkubation war das Optimum der Protoplastenbildung erreicht. Nach 2,5 und 3 h Inkubation wurden die Enzyme durch dreimaliges Waschen entfernt. Das Sediment wurde in Plasmolyse Lösung aufgenommen. Zählung der Protoplasten direkt nach dem Waschen ergab eine vergleichbare Ausbeute der beiden Behandlungsstufen. Unterschiede wurden bei der

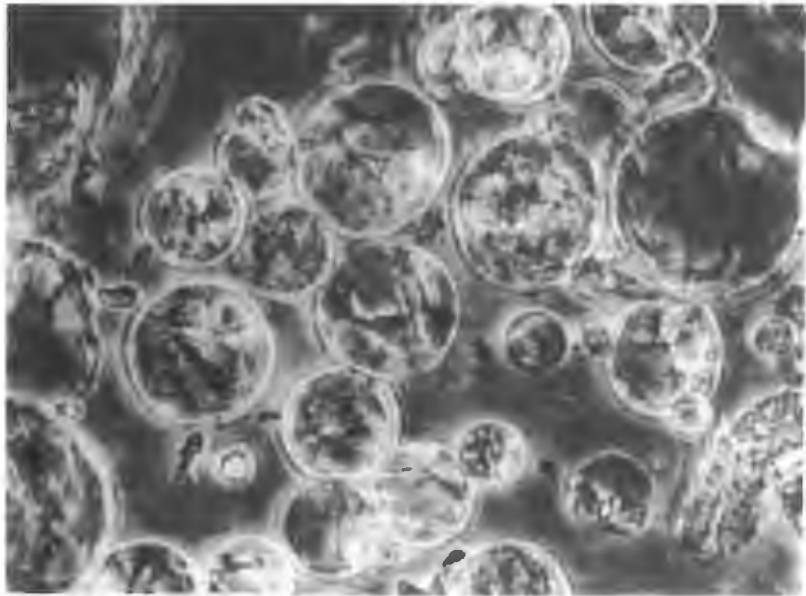
Tabelle 2: Einfluß zellwandabbauender Enzyme auf die Stabilität und Vitalität der Protoplasten

	1 % Driselase	2 % Onozuka R 10 1 % Macerozym
0 h	einige große Einzelzellen, kleine Zellen in den Aggregaten	
1 h	erste Protoplasten gebildet	
2 h	sehr viele Protoplasten gebildet	
2,5 h	$8,7 \times 10^6$ /ml	$8,3 \times 10^6$ /ml
3 h	$8,5 \times 10^6$ /ml	12×10^6 /ml
8 h	schlechte Qualität	gute Qualität
24 h	geringe Anzahl vitaler Protoplasten	gute Stabilität und Vitalität

Die Enzyme wurden in 0,3 M Plasmolyse Lösung pH 5,5 gelöst. Die Zellkultur war 3 Tage alt. Nach 2,5 und 3 h Inkubation bei 23-25° C wurde die Enzymlösung durch Waschen entfernt. Die Protoplasten wurden in einer Zählkammer gezählt und in 0,3 M Plasmolyse Lösung pH 5,5 für weitere 24 h inkubiert. Die Ausbeute ist pro ml Pellet nach dem letzten Waschvorgang angegeben.



a. ▲



b. ▲



c. ▲



d. ▲

- a. Zellkultur
b. Protoplasten nach der 1. Reinigungsstufe
c. Protoplastenbande auf der Saccharoselösung
d. Gereinigte Protoplastenfraktion

Abbildung 2: Isolation und Anreicherung von Protoplasten aus Zellkultur von *Lupinus polyphyllus*

sich anschließenden Inkubation in 0,3 M Hasmolyselösung deutlich. Während sich die Qualität der Protoplasten, die mit Driselase hergestellt worden waren, zunehmend verschlechterte, blieben die mit Onozuka R 10 und Macerozym hergestellten Protoplasten über einen längeren Zeitraum vital.

In weiteren Experimenten wurde versucht, die Reinheit der Protoplastenpräparation zu steigern, indem die Protoplastenausbeute während einer Kulturperiode von 7 Tagen verglichen wurde (Abbildung 1). Die angegebenen Durchschnittswerte von 4 Zelllinien zeigen, daß die Protoplastenausbeute in der logarithmischen Wachstumsperiode am höchsten ist. Zur Verdeutlichung der Schwankungsbreite innerhalb der Zelllinien und individueller Kolben sind in Abbildung 1 die Extremwerte eingetragen. Diese Werte zeigen, daß bei keinem getesteten Kolben zu keinem Zeitpunkt der Kultur mehr als 60 % Protoplastenausbeute erreicht wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden bei relativ langsam wachsenden Zellkulturen anderer Pflanzenarten gemacht (Eriksson, 1985), bei denen der Prozentsatz sich aktiv teilender Zellen verhältnismäßig gering ist.

Die Reinheit der Protoplastenfraktion (Abbildung 2b) ist für Fusionsexperimente oder Regenerationsversuche nicht ausreichend. Es sind weitere Reinigungsschritte erforderlich. Von den getesteten Methoden wie differentielle Zentrifugation und Gradientenzentrifugation kann eine hohe Anreicherung der Protoplasten schon dadurch erzielt werden, daß die Protoplasten auf ein 0.4 M Saccharosekissen (10 min., 100 x g) zentrifugiert werden (Abb. 2c). Zellen und Bruchstücke werden durch die Saccharoselösung pelletiert. Die Protoplasten banden auf der Grenzschicht von Plasmolyse- und Saccharoselösung. Diese Protoplastenfraktion ist sehr rein (Abb. 2d) und über längeren Zeitraum stabil, wenn die Protoplasten mit Onozuka R 10 und Macerozym hergestellt wurden. Die Protoplasten variieren in der Größe stärker als die Protoplasten aus Blattmesophyllzellen (Schäfer-Menuhr, 1987). Die Cytoplasmastränge mit Stärkekörnern sind gute Marker für das Auffinden von Fusionsprodukten, wenn diese Protoplasten mit chloroplastenhaltigen Protoplasten aus Blattzellen fusioniert werden. Kulturversuche mit gereinigten Protoplasten aus Zellkulturen haben gezeigt, daß diese Protoplasten im AS 19 Medium (Schäfer-Menuhr, 1987) Callus bilden. Eine Sproßbildung wurde bisher nicht beobachtet.

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 Rita Wilkens für ihre exzellente technische Assistenz.

Zusammenfassung

Aus Zellsuspensionskulturen von *Lupinus polyphyllus* wurden Protoplasten in hoher Ausbeute und Reinheit isoliert, die im AS 19 Medium (Schäfer-Menuhr, 1987) zu Calli regenerieren können. Zur Auflösung der Zellwände wurde eine Mischung aus 2 % Cellulase Onozuka R 10 und 1 % Macerozym verwendet. Die Ausbeute lag im Mittel bei 37 %, wenn die Protoplasten als Zellkulturen gewonnen wurden, die sich in der logarithmischen Wachstumsperiode befanden. Eine hohe Anreicherung der Protoplasten wurde durch Zentrifugation auf ein 0.4 M Saccharosekissen erzielt.

Isolation and culture of lupin protoplasts

III. Protoplasts from cell suspension culture of *Lupinus polyphyllus*

Protoplasts of *Lupinus polyphyllus* were isolated from cell suspension culture in high yield and purity. They are able to regenerate up to callus in the AS 19 medium (Schäfer-Menuhr, 1987). For the removal of all walls a mixture of 2 % cellulase Onozuka R 10 and 1 % Macerozyme was used. Yield of protoplasts was on the average 37 %, when the protoplasts were isolated from cell cultures in the logarithmic growth phase. These protoplasts were further purified centrifugation on a 0.4 M sucrose cushion.

Literatur

Eriksson, T.R.: Protoplasts Isolation and Culture. — In: Plant Protoplasts. Fowke, L.C. und Constabel, F. (Hrsg.): CRC Press, Boca Raton, Florida (1985), S. 1-20.

Gamborg, O.L.: Callus and Cell Culture. — In: Plant Tissue Culture Methods. Wetter, L.R. und Constabel, F. (Hrsg.): NRCC Press, Saskatoon, Saskatchewan (1982), S. 1-18.

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.

Schäfer-Menuhr, A.: Isolation und Kultur von Lupinenprotoplasten. I. Protoplasten aus Blättern von *Lupinus angustifolius* Sorte Kubesa. — Landbauforschung Völkenrode 37 (1987), S. 117-120.

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.

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.: Stoffwechsel und Funktion von Chinolizidinalkaloiden in Pflanzen und pflanzlichen Zellkulturen. — Habilitationsschrift, TU Braunschweig (1984).

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

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