

# Der Einfluß von Protoplastenmedien auf die Tumorinduktion an *Kalanchoe*-Blättern

The Influence of Protoplast Media on the Tumor Induction on *Kalanchoe* Leaves

Rolf Beiderbeck

Botanisches Institut der Universität Heidelberg

(Z. Naturforsch. **30 c**, 73–76 [1975]; eingegangen am 23. Oktober/4. November 1974)

Plant Protoplasts, Media, Crown-gall

Experiments concerning tumor transformation of plant cells or protoplasts need complete knowledge of the effects of media components. Here inhibiting effects of cellulase Onozuka, glucose, sucrose and mannitol (up to 0.3 M), of tissue culture media, and of the antibiotic aureomycin on the tumor initiation process in *Kalanchoe* leaves are reported. Also the influence of these substances on the growth of the tumor inducing *Agrobacterium tumefaciens* is studied. The results lead to the design of conditions which should be favourable to *in vitro* transformation.

In tierischen Systemen kann eine Tumorinduktion erfolgreich *in vitro* durchgeführt werden<sup>1,2</sup>. Bei Pflanzen ist dagegen bisher Tumorinduktion an ganzen Individuen<sup>3,4</sup> oder einzelnen Organen<sup>5,6</sup> möglich, nicht an Zellen oder Zellkulturen. Die Bedingungen der Infektion mit dem tumorinduzierenden *Agrobacterium tumefaciens* sind daher nur ungenau zu kontrollieren, die Analyse des Infektionsvorgangs ist erschwert. Experimente, pflanzliche Protoplasten mit *Agrobacterium* zu transformieren, sind fehlgeschlagen<sup>7</sup>, die Gründe solcher Fehlschläge nicht analysiert. Sicher ist, daß wir nur unvollständige Kenntnis von der Wirkung von Protoplastenmedien auf die Pflanzenzelle, die Bakterien und die Tumorinduktion haben. Es wurde daher der Einfluß von Substanzen, die man zur Bereitung und Kultur von Protoplasten verwendet, auf die Tumorinduktion *in situ* (an Blättern von *Kalanchoe*) geprüft.

## Material und Methoden

*Agrobacterium tumefaciens*, Stamm B6 (Bopp) wurde in vollsynthetischem Medium<sup>8</sup> oder in Nährbrühe kultiviert. Wäßrige Bakteriensuspensionen mit bekannter Zellkonzentration (gemessen als E<sub>660</sub>) wurden in verwundete Blätter von *Kalanchoe daigremontiana* inkuliert<sup>4</sup>, zu testende Substanzen dem Inokulum zugesetzt und die gebildeten Tumoren 3 Wochen nach der Infektion ausgezählt.

Als Gewebekulturmedien wurden Medium A und AOK (ohne Wuchsstoffe)<sup>9</sup> verwendet.

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. Beiderbeck, Botanisches Institut, D-6900 Heidelberg, Hofmeisterweg 4.

## Ergebnisse

### Versuche mit Cellulase

Cellulase Onozuka R10, häufig für die Produktion von Protoplasten verwendet, hemmt die Tumorinduktion durch *A. tumefaciens* an Blättern von *Kalanchoe* konzentrationsabhängig (Tab. I), ähn-

Tab. I. Wirkung verschiedener Konzentrationen von Cellulase Onozuka R10, gelöst in H<sub>2</sub>O, auf die Tumorinduktion. Im Inokulum 10<sup>6</sup> Zellen von *A. tumefaciens* pro ml. Angegeben Mittelwerte aus je 3 Experimenten, in Klammern Standardabweichungen.

Cellulase im Inokulum [mg/ml]	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
0	0,82 (0,06)
1	0,69 (0,04)
2	0,38 (0,04)
3	0,32 (0,05)
5	0,20 (0,03)
10	0,06 (0,03)

lich wirkt Cellulase von Roth. Beide Cellulasen (0,25–1,0%) beeinflussen das Wachstum von *Agrobacterium* *in vitro* nicht, und Agrobakterien, die in Gegenwart von Cellulasen gewachsen sind, sind genauso infektiös wie Kontrollbakterien (3 Experimente). Cellulasen sind also ohne Einfluß auf die Infektionsfähigkeit der Bakterien.

Für die Hemmung der Tumorinduktion ist es entscheidend, ob die Cellulase gleichzeitig mit den Bakterien, vor ihnen oder nach ihnen in die Wunde gelangt (Tab. II). Stets senkt die Cellulase das Ausmaß der Tumorbildung, wenn sie sich zusammen mit *Agrobacterium* im Inokulum befindet, unabhängig davon, ob in eine frische Wunde inkuliert wird



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. II. Bedeutung des Zeitpunktes der Zugabe von Cellulase (5 mg/ml) zu den infizierten Blättern. Bedingungen s. Tab. I.

Behandlung	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
Wunde+B6	0,87 (0,06)
Wunde, nach 24 Std. B6	0,54 (0,01)
Wunde+Cellulase, nach 24 Std. B6	0,05 (0,08)
Wunde, nach 24 Std. B6+Cellulase	0,10 (0,08)
B6+Cellulase	0,33 (0,05)
B6, nach 8 Std. Cellulase	0,63 (0,13)
B6, nach 24 Std. Cellulase	0,73 (0,11)
B6, nach 48 Std. Cellulase	0,90 (0,07)
B6, nach 96 Std. Cellulase	0,90 (0,03)

oder in eine 24 Stunden alte. Vorbehandlung der Wunde mit Cellulase hemmt spätere Tumorbildung durch *Agrobacterium* ebenso. Wird die Cellulase nach den Bakterien in die Wunde gegeben, so hemmt sie die Tumorbildung um so schwächer, je später dies geschieht. Zugabe von Cellulase 48 Stunden nach der Infektion ist ohne Einfluß auf die Tumorbildung (Tab. II).

Aus Tabn. I und II ergibt sich, daß Cellulase die Tumorbildung über die Wirtszelle beeinflußt. Trotzdem kann eine Hemmung durch Cellulase durch eine Steigerung der Bakterienkonzentration überwunden werden (Tab. III), möglicherweise

Tab. III. Hohe Bakterienzahlen heben den hemmenden Effekt der Cellulase (5 mg/ml) auf die Tumorentwicklung auf. Bedingungen s. Tab. I.

Bakterienzahl im Inokulum/ml	Cellulase	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
$0,4 \times 10^6$	—	0,39 (0,05)
$0,4 \times 10^6$	+	0,10 (0,05)
$1,8 \times 10^7$	+	0,82 (0,09)
$1,8 \times 10^8$	+	0,95 (0,03)

Tab. IV. Einfluß von Glucose (0,28 M) auf die Hemmung der Tumorentwicklung durch Cellulase (5 mg/ml).

Inokulum	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
B6, H <sub>2</sub> O	0,63 (0,01)
B6, Cellulase	0,21 (0,03)
B6, Cellulase+Glucose	0,09 (0,08)

über einen Abbau des hemmenden Prinzips durch die Bakterien. Die Natur der hemmenden Substanz in den Cellulase-Präparationen ist unklar. Die Wirkung von Cellulase auf Watte kann durch 0,3 M

Glucose aufgehoben werden<sup>10</sup>; für die Tumorbildung trifft dies jedoch nicht zu (Tab. IV), hier verstärkt vielmehr ein Zusatz von Glucose die Hemmwirkung.

Wird die Cellulase-Präparation 10 min gekocht, über Nacht gegen H<sub>2</sub>O dialysiert oder mit 20 mg/ml Aktivkohle ausgeschüttelt, so wird dadurch ihre Hemmwirkung nicht zerstört.

#### Versuche mit Osmotica

Mischt man verschiedene Konzentrationen von Saccharose dem Inokulum bei, wird die Tumorbildung gehemmt (Tab. V). Bei 0,29 M Saccharose werden die Blätter vorübergehend schlaff, sind aber nach 24 Stunden wieder voll turgeszent. Ähnlich wirken Glucose und Mannit.

Tab. V. Einfluß von Zuckern auf die Tumorentwicklung. Bedingungen s. Tab. I.

Inokulum [M]	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
Saccharose	
0,000	0,92 (0,08)
0,015	0,91 (0,08)
0,073	0,81 (0,05)
0,146	0,53 (0,04)
0,292	0,38 (0,03)
Glucose	
0,278	0,23* (0,04)

\* Umgerechnet aus Experimenten mit verminderter Bakterienkonzentration.

Auch für den Einfluß des Osmotica auf die Tumorentwicklung ist es wichtig, wann sie am Infektionsort appliziert werden: Nur Glucose, die vor oder zugleich mit den Bakterien in die Wunde kommt, hemmt die Tumorentwicklung (Tabn. VI, VII). Vorbehandlung der Wunde mit 0,28 M Glucose vermindert die Infizierbarkeit. Die Osmotica rufen ihre Wirkung auf die Tumorentwicklung nicht über eine Hemmung des Bakterienwachstums hervor. Wird *Agrobacterium in vitro* im synthetischen Medium mit Zusatz von 0,28 M Saccharose kultiviert, erreicht die Kultur gleiche Zelldichte wie im Medium allein (24 Stunden Kultur, 3 Experimente). Ebenso geben Bakterien, die 2 Stunden in 0,28 M Glucose gestanden haben, den gleichen Infektionserfolg wie solche, die in Puffer aufbewahrt wurden (3 Experimente). Die Wirkung der Osmotica erfolgt offenbar über die Pflanzenzelle.

Tab. VI. Bedeutung des Zeitpunktes der Glucose-Zugabe (0,278 M) zum Inokulum. Bedingungen s. Tab. I.

Behandlung	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
B6	0,90 (0,04)
B6+Glucose	0,34 (0,12)
B6, nach 2 Std. Glucose	0,86 (0,03)
B6, nach 4 Std. Glucose	0,83 (0,05)
B6, nach 8 Std. Glucose	0,88 (0,02)

Tab. VII. Einfluß einer Vorinkubation der Wunden mit 0,278 M Glucose. Angegeben Werte aus 2 unabhängigen Experimenten.

Inokulum	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
Wunde+B6	0,63
Wunde, nach 24 Std. B6	0,21
Wunde+Glucose, nach 24 Std. B6	0,08
	0,84
	0,31
	0,07

### Versuche mit Gewebekultur-Medien

Zur Kultur von Protoplasten werden typische Gewebekultur-Medien verwendet. So ist z. B. das Medium nach Nagata und Takebe<sup>11</sup> ein modifiziertes Gewebekultur-Medium nach Murashige und Skoog<sup>12</sup>. Auch solche Medien können die Tumorbildung beeinflussen. Ein modifiziertes Medium<sup>12, 9</sup>, auf dem eine Reihe pflanzlicher Gewebe gut wachsen, beeinträchtigt die Tumorbildung durch *Agrobacterium*, wenn es dem Inokulum zugefügt wird (Tab. VIII). Dabei scheinen die Salze im Medium

Tab. VIII. Einfluß von Gewebekultur-Medien (nach Murashige &amp; Skoog, modifiziert) auf die Tumorinduktion. Stets pH 5,9.

Inokulum	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
B6+H <sub>2</sub> O	0,93 (0,05)
B6+Medium AOK	0,53 (0,04)
B6+Salze aus Medium AOK	0,59 (0,13)
B6+Vitamine aus Medium AOK	0,85 (0,01)

und die Zucker (s. o.) eine Rolle zu spielen. Zugeleich läßt sich zeigen, daß in den Gewebekultur-Medien das Wachstum zweier Stämme von *Agrobacterium* langsamer erfolgt als in Bakterien-Nährösung (Tab. IX).

Tab. IX. Wachstum von *Agrobacterium tumefaciens*, B6, und *A. rhizogenes*, 15834, in verschiedenen Medien. B6 stets angezogen in synthetischem Nährmedium<sup>8</sup>, 15834 in Nährbrühe. 0,2 ml Ausgangskultur wurden zum Zeitpunkt 0 (Beginn) mit 4 ml frischen Mediums verdünnt.  $E_{660}$  zu Beginn zwischen 0,07 und 0,04. Bei 15834 Messungen nach 24 und 48 Stunden.

Stamm	Medium	Bakterienkonzentration ( $E_{660}$ ) nach 17 Std.	nach 41 Std.
B6	Synthet.	0,81 (0,10)	>1,0
	A	0,25 (0,16)	0,37 (0,17)
	AOK	0,28 (0,13)	0,43 (0,11)
	15834	1,04 (0,30)	1,35 (0,20)
		0,10 (0,03)	0,12 (0,04)
		0,11 (0,05)	0,11 (0,03)

### Versuche mit Aureomycin

Das Antibioticum Aureomycin ist verwendet worden, um das Wachstum von Bakterien in Gegenwart von Pflanzen<sup>13</sup> und Protoplasten<sup>14, 7</sup> zu hemmen. In eigenen Versuchen hemmten  $1 - 10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  Aureomycin das Wachstum von *A. tumefaciens*, B6, in Nährösungen komplett. (Synthetische Nährösung und Medium A.) Im gleichen Konzentrationsbereich wird das Wachstum von *A. rhizogenes* unterdrückt. Auch die Tumorinduktion wird durch Aureomycin gestört, bei  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  findet praktisch keine Tumorinduktion mehr statt (vergleiche Tab. X). Vor-

Tab. X. Einfluß des Zeitpunktes der Aureomycingabe auf die Tumorinduktion. 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aureomycin.

Behandlung	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
B6+Wunde	0,95 (0,07)
Wunde, nach 24 Std. B6	0,63 (0,20)
Wunde, nach 24 Std. B6+Aureomycin	0,07 (0,09)
B6+Aureomycin	0,03 (0,01)
B6, nach 4 Std. Aureomycin	0,25 (0,11)
B6, nach 8 Std. Aureomycin	0,20 (0,02)
B6, nach 24 Std. Aureomycin	0,91 (0,03)

behandlung der pflanzlichen Wunde mit Aureomycin setzt die Tumorbildung herab, und ebenso ist eine Behandlung der bereits infizierten Wunden mit Aureomycin in der Lage, Tumorbildung zu hemmen. Die Hemmung wird aber um so geringer, je später das Antibioticum gegeben wird (Tab. X). Lebende Bakterien müssen für eine erfolgreiche Infektion eine gewisse Zeit in der Wunde wirken.

## Diskussion

Die Experimente zeigen, daß eine Reihe von Substanzen, die bei der Herstellung oder Kultur von Protoplasten und isolierten Zellen verwendet werden, den Prozeß der Tumorinduktion (vor allem in den ersten 2 Tagen nach der Infektion) stören: Cellulase-Präparationen; Osmotica, Gewebekultur-Medien und Aureomycin. Der Mechanismus der Hemmungen ist nicht in allen Fällen erkennbar, denn Cellulase-Präparationen und Gewebekultur-Medien bestehen aus vielen Komponenten, deren Wirkung ungeprüft ist. Interessant ist der hemmende Einfluß der Zucker, der nur solange auftritt, als das Osmoticum vor oder gleichzeitig mit den Bakterien in die Wunde gelangt. Offenbar ist ein fester Zusammenhalt von Zellwand und Plasma in den Wundrandzellen für eine erfolgreiche Infektion nötig. Schon das Phänomen der „Tumor sites“<sup>15</sup> spricht für eine

Beteiligung der Zelloberfläche an der Transformation.

Durch die angeführten Hemmeffekte findet der Fehlschlag von Versuchen zur Infektion von Protoplasten Erklärung. Zugleich liefern die Experimente Informationen über Bedingungen, die für eine *in vitro* Transformation geeignet erscheinen:

- a. Gesteigerte Bakterienzahl kann hemmende Effekte der Cellulase-Präparationen aufheben;
- b. minimale Konzentrationen von Osmotica und Medien sollten angestrebt werden;
- c. Antibiotica wie Aureomycin sollten erst 1–2 Tage nach der Infektion zugegeben werden.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung durch die DFG durchgeführt. Ihr sei herzlich gedankt. Ebenso danke ich Herrn H. Keutner für die Anzucht der Testpflanzen und Frl. R. Müller für sorgfältige Hilfe bei den Experimenten.

<sup>1</sup> H. M. Temin u. H. Rubin, Virology **6**, 669 [1958].

<sup>2</sup> R. Dulbecco, Science **166**, 962 [1969].

<sup>3</sup> J. A. Lippincott u. G. T. Heberlein, Amer. J. Bot. **52**, 856 [1965].

<sup>4</sup> R. Beiderbeck, Z. Naturforsch. **25 b**, 407 [1970].

<sup>5</sup> R. M. Klein, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **44**, 350 [1958].

<sup>6</sup> R. Beiderbeck, G. T. Heberlein u. J. A. Lippincott, J. Virol. **11**, 345 [1973].

<sup>7</sup> L. Schilde-Rentschler, Colloq. Intern. CNRS, 1973, Versailles, Abstr. 479.

<sup>8</sup> M. Bopp, Z. Naturforsch. **20 b**, 899 [1965].

<sup>9</sup> R. Beiderbeck, Arch. Mikrobiol. **97**, 253 [1974].

<sup>10</sup> K. Selby u. C. C. Maitland, Biochem. J. **104**, 716 [1967].

<sup>11</sup> T. Nagata u. I. Takebe, Planta **99**, 12 [1971].

<sup>12</sup> T. Murashige u. F. Skoog, Physiol. Plant. **15**, 473 [1962].

<sup>13</sup> I. Hayashi, A. C. Hildebrandt u. U. Riker, The Bot. Magazine, Tokyo, **77**, 270 [1964] (zit. nach Schilde-Rentschler).

<sup>14</sup> J. W. Watts u. J. M. King, Planta **113**, 271 [1973].

<sup>15</sup> B. B. Lippincott u. J. A. Lippincott, J. Bacteriol. **97**, 620 [1969].