

Ein Adsorbens als Speicher für Phytohormone in einer pflanzlichen Suspensionskultur

An Adsorbent as Phytohormone Reservoir in a Plant Cell Suspension Culture

Rolf Beiderbeck und Bernd Knoop

Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 360, D-6900 Heidelberg 1

Z. Naturforsch. 39c, 45–49 (1984); received October 26/November 21, 1983

Suspension Culture, Adsorbent Culture, Phytohormone Reservoir, *Nicotiana tabacum*,
Activated Charcoal

The addition of an adsorbent (activated charcoal) to plant cell suspension cultures often decreases the growth rate, in a tobacco cell culture accompanied by alterations of protein content and cell size. All these effects can be reversed in part or even totally after pretreatment of the adsorbent with phytohormones.

Einleitung

Bei vielen Gelegenheiten ist Gewebekulturen das Adsorbens Aktivkohle (AC) zugesetzt worden, so zur Wachstumsverbesserung von Antherenkulturen und zur Stimulierung von Embryogenesen. Die AC adsorbiert aus den Medien Substanzen, die von den kultivierten Zellen produziert und abgegeben werden und dann Entwicklungsvorgänge hemmen [1–3]. Beim Verfahren der Adsorbentskultur [4] wird das Adsorptionsvermögen der AC sogar zur Gewinnung sekundärer Pflanzenstoffe ausgenutzt.

Der Zusatz von AC zu Zellkulturmedien birgt jedoch stets auch die Gefahr, daß wichtige Bestandteile der verwendeten Medien adsorbiert werden.

So konnte gezeigt werden, daß AC eine Reihe von Substanzen adsorbiert, die für eine anhaltende Zellvermehrung der meisten Zellkulturen unentbehrlich sind (Vitamine, Phytohormone) und damit Wachstum und Entwicklung einer Zellkultur negativ beeinflußt [5, 6].

Dieser Nachteil eines AC-Zusatzes kann sich besonders bei solcher Kultur bemerkbar machen, bei der die AC über eine längere Zeitspanne in der Zellsuspension verbleiben muß, damit sie auf dem Wege einer Gleichgewichtsbeladung Stoffwechselprodukte der kultivierten Zellen adsorbiert [4]. Es wurde daher versucht, AC durch Inkubation mit Phytohormonen und Vitaminen so mit diesen Substanzen anzureichern, daß nach Zusatz der so

Sonderdruckanforderungen an: Prof. Dr. R. Beiderbeck.
0341-0382/84/0100-0045 \$ 01.30/0

vorbehandelten AC zum Kulturmedium Abweichungen von der Normalkultur einer phytohormon-heterotrophen Tabaksuspension möglichst gering werden.

Material und Methoden

1. *Stammkultur* war eine Suspensionskultur von *Nicotiana tabacum* L. cv. Maryland. Sie wurde routinemäßig in einem MS-Medium mit $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ α -Naphtylessigsäure (NAA) und $0.03 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Kinetin (KIN) kultiviert [7]. Kulturbedingungen: 25°C , Dunkel, Schüttlerfrequenz $100 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$; wöchentliche Passage von 4 ml Kultur zu 20 ml frischem Medium in 200-ml-Flaschen.

2. Vorbehandlung der AC mit Phytohormonen und Vitaminen

In der Regel wurde jeweils 1 g AC (granuliert; $2.5 \text{ mm } \varnothing$; Merck, Darmstadt) mit 100 ml Lösung von MS-Makroelementen inkubiert, die je nach Fragestellung verschiedene Konzentrationen von NAA und/oder KIN enthielt. Vitamine wurden in der 100fachen Normalkonzentration des MS-Mediums angeboten. Inkubationsbedingungen: pH 5.8; 21 h bei 25°C ; Dunkel, Schüttlerfrequenz $100 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$.

Bei orientierenden Versuchen mit einzelnen Phytohormonen wurden während der Inkubationszeit zu verschiedenen Zeiten Lösungsproben entnommen und auf restlichen Phytohormongehalt untersucht. Die Phytohormongehalte wurden



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.

spektralphotometrisch bei 281 nm (NAA) oder 266 nm (KIN) bestimmt. Bei solchen Messungen zeigt sich, daß die Hormone rasch aus der Lösung verschwinden und von der AC gebunden werden. Die Substanzabnahme in der Lösung folgt einer typischen Adsorptionsisotherme. Nach 6 h Inkubation sind bereits mehr als 99% der angebotenen ($50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) NAA oder mehr als 90% des angebotenen ($20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) KIN verschwunden. Eine mehr als 20-stündige Behandlungsdauer sollte danach zur Gleichgewichtsverteilung der Hormone zwischen AC und Lösung führen.

Entsprechend wurde in weiteren Experimenten AC für 21 h mit Hormonen in MS-Makroelement-Lösung inkubiert, anschließend 4mal kurz mit gleicher Lösung gewaschen und wieder in gleiche Menge hormonfreie Makroelement-Lösung überführt. Unter den beschriebenen Inkubationsbedingungen ist die Einstellung einer neuen Gleichgewichtsverteilung der Phytohormone zwischen der zuvor beladenen AC und der frischen Lösung nach 8 h erreicht, wie die photometrische Bestimmung der Hormonkonzentrationen in der Lösung im Vergleich zu Eichkurven zwischen 0,5 und $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ergab. Für KIN-AC stellte sich in der frischen Lösung die ursprüngliche Gleichgewichtskonzentration wieder ein, während für NAA etwa die Hälfte der ursprünglichen Konzentration gemessen werden konnte. Es ist also damit zu rechnen, daß ein Teil der NAA irreversibel an AC gebunden wird oder einen Umbau erfährt (Tab. I).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle Hauptversuche AC für 21 h vorbehandelt mit

NAA 0; 50; 100; 200; 300 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
KIN 0; 1; 10; 30; 50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Tab. I. Adsorption von NAA und KIN aus MS-Makroelementlösung an AC und Freisetzung der Hormone aus der AC in frische hormonfreie MS-Makroelementlösung.

Hormon	Konzentrationen [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]		
	in der Beladungs-lösung	im Überstand nach 21 h	nach 8 h in frischem Medium
NAA	300	2,8	1,2
	200	1,2	0,6
	100	0,4	0,1 – 0,2
KIN	150	1,4	1,2
	100	0,7	0,6
	50	0,3	0,2

sowie allen möglichen Kombinationen dieser beiden Hormone. Die solchermaßen vorbehandelte AC wurde im Kulturmedium autoklaviert und diente als einzige Hormonquelle für die Zellkultur.

3. Zellkultur in Gegenwart von AC

4 ml einer 1 Woche alten Stammkultur (s.o.) wurden in 20 ml hormonfreies Medium mit 0,2 g AC (vorbehandelt oder nicht) passagiert und unter den genannten Bedingungen für 1 Woche kultiviert. Als Kontrollen dienten Ansätze mit hormonhaltigem, AC-freiem Medium.

In einigen Experimenten wurde die Menge zugesetzter AC auf 1 g pro 24 ml Medium erhöht, um mögliche Wachstumshemmungen zu verstärken.

4. Frischgewichtsbestimmungen

Der Inhalt der Kulturgefäße wurde von der AC abdekantiert und für 4 min mit einer Wasserstrahlpumpe abgenutscht. Auf dem Filter angesammelte Zellen und Aggregate wurden abgeschabt und gewogen.

Für die Erstellung einer Wachstumskurve wurde alle 2 Tage eine Flasche geerntet und zur Frischgewichtsbestimmung verwendet.

5. Proteinbestimmungen

1 g Zellen wurden in der Kälte mit Seesand und 3 ml P-Puffer (50 mM, pH 6,8) zermörsert und 15 min bei 5000 U/min abzentrifugiert. 0,2 ml des Überstandes wurden mit 2 ml Bradford-Reagens [8] versetzt und nach 10–20 min bei 595 nm photometriert. Die angegebenen Proteinkräfte errechnen sich aus einer Eichkurve, die unter Verwendung von Rinder-Serumalbumin gewonnen wurde.

6. Zellgrößenbestimmungen

0,5 g Zellen und Zellaggregate wurden mit 6–8 ml eines Gemisches aus 30% H_2O_2 und Essigsäure (1:1) versetzt und für 24 h bei 60 °C inkubiert [9]. Die weitgehend mazerierten Aggregate wurden durch Aufziehen in eine Injektionsspritze vollständig mazeriert, die Zellängen mikroskopisch bei einer Vergrößerung von 100fach mit Hilfe eines Okularmikrometers vermessen.

Tab. II. Frischgewichtszunahme pro Woche, Proteingehalt und Zellgrößen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung zugesetzter AC (0,8%) mit NAA. Ausgangsgewicht 0,65 g pro Ansatz; Endgewicht bei MS: 6,1 g pro Ansatz. Angegeben Mittelwerte aus 3 Experimenten, in Klammern Standardabweichungen.

Medium bzw. Zusatz	Frischgewichtszunahme [%]	Proteingehalt [mg · g ⁻¹ Frischgew.]	max. Zellänge/häufigste Zellänge [μm]
MS	100 (-)	1,27 (0,22)	800/150
MS + AC	72,2 (17,2)	0,99 (0,35)	1150/220
MS - H	85,9 (9,5)	0,85 (0,36)	1170/370
MS - H + AC vorbeh. mit			
0 mg · l ⁻¹ NAA	68,5 (13,9)	0,82 (0,15)	1050/270
50 mg · l ⁻¹ NAA	72,3 (5,4)	1,14 (0,19)	710/170
100 mg · l ⁻¹ NAA	48,5 (13,2)	1,28 (0,11)	500/130
200 mg · l ⁻¹ NAA	35,3 (5,6)	1,47 (0,18)	390/110
300 mg · l ⁻¹ NAA	29,3 (8,0)	2,06 (0,56)	390/110

MS = Vollmedium mit Hormonen (s. Methodik, Abs. 1).

MS - H = Medium ohne Hormone.

Ergebnisse

1. Wachstum der Zellkultur

Die verwendete Zellkultur von *N. tabacum* wächst unter den angegebenen Bedingungen mit einer Generationszeit von ca. 35 h während der log-Phase. Bei wöchentlicher Passage steigt das Ausgangsgewicht 8–10fach an. In der nach 8–10 Tagen einsetzenden stationären Phase füllen die Zellen das Kulturmedium vollständig aus, die Kultur verfestigt sich. Sie besteht aus Einzelzellen bzw. Zellaggregaten und weist ausschließlich meristematische und parenchymatische Zelltypen auf. Weitergehende Zelldifferenzierungen wurden nie beobachtet.

2. Kultur der Zellen in Gegenwart von AC

Zusatz von unbehandelter AC (0,8%) zum kompletten MS-Medium bewirkt eine Reduktion des erreichten Frischgewichts. Zugleich wird der Proteingehalt/Frischgewicht reduziert, und die Zellen werden verlängert (Tab. II). Werden in einem hormonfreien Medium die Hormone durch Zugabe verschieden vorbehandelter AC angeboten, zeigen die Zellen ein abweichendes Verhalten:

Je höher die über AC angebotene NAA-Konzentration ist, desto geringer ist das in 1 Woche erreichte Frischgewicht der Zellen. Bei einer Verwendung von AC, die mit der hohen Konzentration von 300 mg · l⁻¹ NAA vorbehandelt wurde, wird schließlich nur noch ein Drittel des Frischgewichts der Kontrollen erhalten (Tab. II), entsprechend dem

Verhalten von Standardkulturen bei überoptimaler Auxinkonzentration [10]. Zugleich nehmen mit zunehmender NAA-Konzentration in der AC die max. Zellänge und die häufigste Zellänge ab, der Proteingehalt/Frischgewicht steigt bis auf das Doppelte an (Tab. II). Zusatz von AC, die mit 50 mg · l⁻¹ NAA vorbehandelt wurde, führt im Hinblick auf durchschnittliche Zellgröße und Proteingehalt/Frischgewicht die Werte der Kontrolle (komplettes MS-Medium) wieder ein, die Frischgewichtszunahme pro Woche wird dagegen durch die verwendeten vorbeladenen ACs nicht normalisiert.

Unterschiedliche Vorbehandlung der eingesetzten AC mit KIN beeinflusst die hier untersuchten Parameter der Zellkultur nicht, da die verwendete Kultur nur einen geringen Cytokininbedarf hat. Daher

Tab. III. Frischgewichtszunahme/Woche Kultur in MS-Vollmedium bei Zusatz von 4% AC mit unterschiedlicher Vorbehandlung. Ausgangsgewicht: 0,58 g pro Ansatz; Endgewicht in MS: 5,5 g pro Ansatz. Angegeben Mittelwerte aus 3–6 Experimenten, in Klammern Standardabweichung.

Medium bzw. Zusatz	Frischgewichtszunahme [%]
MS	100 (-)
MS + AC, unbehandelt	7,7 (7,5)
MS + AC, vorbehandelt mit	
0 mg · l ⁻¹ NAA/30 mg · l ⁻¹ KIN	1,6 (1,8)
50 mg · l ⁻¹ NAA/30 mg · l ⁻¹ KIN	53,4 (21,6)
300 mg · l ⁻¹ NAA/30 mg · l ⁻¹ KIN	22,4 (15,0)
50 mg · l ⁻¹ NAA/30 mg · l ⁻¹ KIN/VIT	58,3 (16,8)

wurden Daten für Experimente mit unterschiedlichen Cytokininkonzentrationen nicht gegeben. Wird die AC-Menge im Medium von 0,8 auf 4% erhöht, verstärkt sich die Hemmung der Frischgewichtszunahme erheblich (vgl. Tab. II und III). Diese Hemmung kann durch Zusatz der als günstig erkannten, mit $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ NAA beladenen AC zum Teil wieder aufgehoben werden (Tab. III). Beladung der AC mit höheren NAA-Konzentrationen oder Vitaminen wirkt sich nicht zusätzlich positiv aus; ebenso wird durch Zusatz von KIN allein – wie im Experiment mit 0,8% AC – das Wachstum der Kultur nicht normalisiert (Tab. III).

Diskussion

Zusatz von 0,8% AC zu einer wachsenden Zellkultur von *N. tabacum* reduziert die Frischgewichtszunahme. Diese Reduktion verstärkt sich mit steigender Menge zugesetzter AC und ist interpretierbar als Folge der Adsorption der Phytohormone des Mediums an die AC. Argumente für diese Deutung liefert die in der Einleitung genannte Literatur. Die Reduktion der Frischgewichtszunahme wird begleitet von einer Steigerung der Zellgröße und einer Abnahme des Proteingehaltes der Zellen, beides Symptome der Zellseneszenz [11].

Der Einfluß von AC auf die untersuchten Kulturparameter kann durch Vorbehandlung der AC mit geeigneten Phytohormonkonzentrationen rückgängig gemacht werden: Bei Verwendung geringer AC-Mengen (0,8%) ist die Normalisierung bei bestimmten Konzentrationen hinsichtlich Proteingehalt und Zellgröße vollständig, während die Frischgewichtszunahme reduziert bleibt (Tab. II). Bei Verwendung höherer AC-Konzentrationen (4%, stärkere Wachstumshemmung) wird auch die Frischgewichtszunahme durch Hormonbeladung der AC teilweise normalisiert (Tab. III). Möglicherweise beruht die verbleibende Hemmung auf dem Entzug von Konditionierungsfaktoren.

Für die Produktion von Sekundärstoffen in Flüssigkeitskulturen ist eher der physiologische Zustand der Zellen (hier Größe und Proteingehalt als

Beispiel) ausschlaggebend als eine hohe Zuwachsrate. Deshalb liefert die Vorbeladung des Adsorbens mit Phytohormonen die Voraussetzungen, das Verfahren der Adsorbenskultur, welches für eine hormonautrophe Tumorkultur entwickelt wurde [4], auch auf hormonbedürftige Suspensionskulturen auszudehnen.

Darüber hinaus bietet sich allgemein AC als Reservoir für Phytohormone (oder evtl. weitere Substanzen) in Suspensionskulturen an: Wird das Medium für eine Zellkultur in konventioneller Weise hergestellt, ist die Konzentration der angebotenen Hormone ausschließlich für den Passagezeitpunkt bekannt. Innerhalb von wenigen Stunden setzt in der Kultur eine rasche Metabolisierung der Hormone ein: Glykosidierung von 2,4 D [12] und Akkumulation in der Vakuole [13], Konjugation von 2,4 D mit Aminosäuren [14] sowie Decarboxylierung von IAA [15] sind nur einige Beispiele. Der aktuelle Hormongehalt des Mediums ist zu jedem späteren Zeitpunkt weder bekannt noch konstant. Verwendung phytohormonbeladener AC in solchen Kulturen kann über längere Kulturzeiten hinweg für ein gleichmäßigeres Angebot an Hormonen sorgen, da alle an AC adsorbierbaren Stoffe sich zwischen der AC und dem umgebenden Medium nach einem Gleichgewicht verteilen [16]. Anzustreben ist für die Erreichung des beschriebenen Ziels der hormonkonstanten Medien die Verwendung weiterer, mehr für die Hormone spezifischer Adsorbentien an Stelle von AC.

Der Vergleich von Tab. I mit Tabn. II + III belegt darüber hinaus, daß die für ein rasches Wachstum notwendigen Hormonkonzentrationen der flüssigen Medienphase bei konstanter Nachlieferung aus der AC wesentlich geringer sein können als bei direkter Einwaage ins Medium.

Die aktuelle NAA-Konzentration im Medium beträgt z. B. bei Verwendung einer mit $300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ vorbeladenen AC $1,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Tab. I), was etwa der Ausgangskonzentration in der kohlefreien Kontrolle entspricht. In der Adsorbenskultur ist diese Konzentration jedoch schon weit überoptimal (Tabn. II + III).

- [1] G. Fridborg, M. Pedersen, L.-E. Landström und T. Eriksson, *Physiol. Plant.* **43**, 104 (1978).
- [2] L. Johansson, B. Andersson und T. Eriksson, *Physiol. Plant.* **54**, 24 (1982).
- [3] M. A. Weatherhead, J. Burdon und G. G. Henshaw, *Z. Pflanzenphysiol.* **89**, 141 (1978).
- [4] B. Knoop und R. Beiderbeck, *Z. Naturforsch.* **38c**, 484 (1983).
- [5] M. J. Constantin, R. R. Henke und M. A. Mansur, *In Vitro* **13**, 293 (1977).
- [6] M. A. Weatherhead, J. Burdon und G. G. Henshaw, *Z. Pflanzenphysiol.* **94**, 399 (1979).
- [7] A. Schlitzberger, Diplomarbeit Heidelberg (1981).
- [8] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- [9] E. Wienenga, Dissertation Heidelberg (1978).
- [10] H. E. Street, *Plant tissue and Cell Culture*. Blackwell Scientific Publ., Oxford 1977.
- [11] L. E. Jones, A. C. Hildebrandt, A. J. Riker und J. H. Wu, *Am. J. Bot.* **47**, 468 (1960).
- [12] G. H. Davidonis, R. H. Hamilton und R. O. Mumma, *Plant Physiol.* **65**, 94 (1980).
- [13] R. Schmitt und H. Sandermann, *Z. Naturforsch.* **37c**, 772 (1982).
- [14] M. J. Montague, R. K. Enns, N. R. Siegel und E. G. Jaworski, *Plant Physiol.* **67**, 701 (1981).
- [15] E. Epstein und S. Lavee, *Plant & Cell Physiol.* **16**, 553 (1975).
- [16] J. S. Mattson und H. B. Mark, *Activated Carbon*. Marcel Dekker Inc., New York 1971.