

Embryonen im Bioreaktor

Neue Wege bei der Vermehrung von Alpenveilchen

Annette Hohe,
Martina Seyring,
Klaus-Thomas Hänsch
(Erfurt-Kühnhausen)
Eric Sarnighausen,
Stefan Rensing,
Ralf Reski (Freiburg)

Alpenveilchen gehören bei uns zu den beliebtesten Zierpflanzen. In Deutschland wurden nach der letzten Erhebung im Jahr 2000 rund 23 Millionen Pflanzen produziert. Von den Kulturen mit hoher wirtschaftlicher Bedeutung im Zierpflanzenbau sind sie eine der wenigen Arten, die nicht über Stecklinge, sondern ausschließlich über Saatgut vermehrt werden. Daher ist es bei Alpenveilchen sehr schwierig, einheitliche Pflanzenbestände zu erzeugen. Außerdem ist die Saatguterzeugung arbeitsintensiv und das Saatgut bzw. die Jungpflanze somit relativ teuer. Aus diesem Grunde besteht ein großes Interesse daran, Alpenveilchen auf effiziente Weise vegetativ zu vermehren, wodurch man einen Pflanzenbestand erhält, der mit der Mutterpflanze genetisch identisch und dadurch natürlich auch in sich homogen ist. Auf konventionellem Wege, also über Stecklinge wie bei Chrysanthemen oder Weihnachtssternen, ist dies bei Alpenveilchen nicht möglich.

Somatische Embryogenese

Als Alternative zur konventionellen Vermehrung von Alpenveilchen wurde ein Vermehrungssystem über somatische Embryogenese etabliert. Hierbei werden einzelne Zellen des eigentlichen Pflanzenkörpers (also „somatische“ Zellen, im Gegensatz zu den Geschlechtszellen) durch bestimmte Kulturbedingungen dazu angeregt, Embryonen zu bilden. Dies geschieht auf speziellen Nährmedien unter keimfreien Bedingungen im Labor. Ein solcher somatischer Embryo ähnelt in seiner äußeren Entwicklung sehr stark einem zygotischen Embryo, wie er sich im Samen befindet, der aus einer befruchteten Eizelle (Zygote) hervorgegangen ist. Daher wird angenommen, dass nach dem Start der Entwicklungsprozesse in beiden Fällen grundsätzlich dieselben entwicklungsbiologischen Prozesse ablaufen, also dieselben Gene in derselben Reihenfolge „angeschaltet“ werden und dadurch die einzelnen Prozesse wie Zellteilung, Differenzierung oder Einlagerung bestimmter Speicherstoffe steuern. Um den Entwicklungsprozess der somatischen Embryo-

genese erfolgreich für die Pflanzenvermehrung einzusetzen, kommt es also auf zwei Dinge an: Zum einen muss der „Schalter“, das heißt die Kulturbedingungen, die die somatische Embryogenese auslösen (und möglichst die dabei aktivierten Gene), identifiziert werden. Zum anderen ist die nachfolgende Entwicklung kein sich selbst steuernder Prozess. Ein zygotischer Embryo im Samen wird von Nährgewebe umgeben, das seine Kohlenhydrat- und Mineralstoffversorgung sicherstellt, darüber hinaus aber vermutlich auch Entwicklungssignale setzt. Somatische Embryonen befinden sich „nackt“ im Medium, also müssen sowohl die Nährstoffversorgung gewährleistet sein, als auch die richtigen Entwicklungssignale zur richtigen Zeit gesetzt werden, um eine normale Entwicklung des Embryos zu gewährleisten.

Bioreaktoren

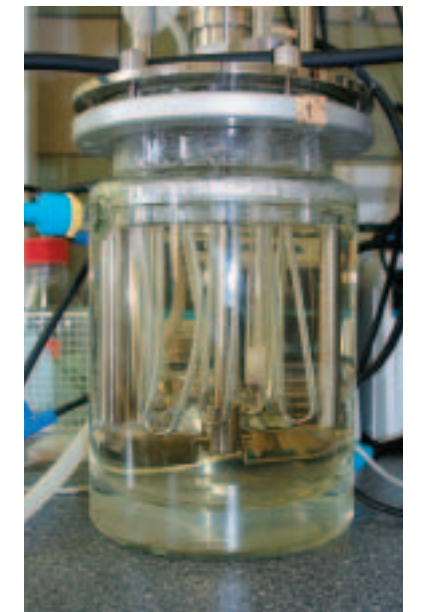
Um die Entwicklung somatischer Embryonen zu untersuchen ist es daher notwendig, die Kulturbedingungen – also alle Umweltreize, die auch als Signal für die Steuerung der Entwicklung der somatischen Embryonen dienen können – möglichst exakt zu steuern. Bei Flüssigkultursystemen ist dies in Bioreaktoren möglich. Hier werden bestimmte chemische und physikalische Umweltparameter wie Temperatur, pH-Wert des Mediums oder der Partialdruck bestimmter Gase gemessen und bei Bedarf entsprechend einem vorgegebenen Sollwert geregelt.

Die Pflanzenzellen, aus denen sich somatische Embryonen entwickeln sollen, befinden sich in diesem Fall in einer Suspensionskultur. Die Suspendierung der Kulturen wird in Bioreaktoren entweder durch Rühren (Rührkessel-Reaktoren) oder durch das Aufsteigen von Gasblasen (Airlift-Reaktoren) erreicht. Pflanzenzellen sind durch ihre Größe und vor allem auch durch ihre starre Zellwand relativ empfindlich gegenüber hydrodynamischen Spannungen, wie sie normalerweise im Bioreaktor auftreten. In Rührkessel-Reaktoren muss die Suspension daher durch entsprechende Konstruktion der Rührer möglichst langsam und schonend bewegt werden. Entsprechendes gilt für die Begasung, denn auch aufsteigende und an

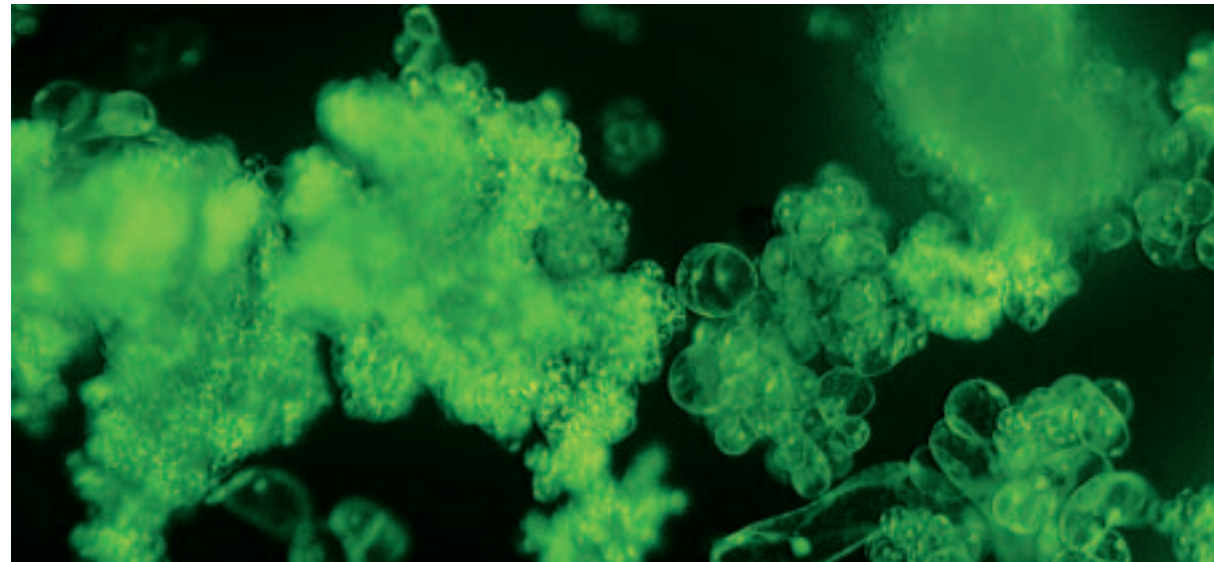
der Oberfläche zerplatzende Gasblasen üben hydrodynamische Spannungen auf die umgebenden Zellen aus. Hier gibt es die Möglichkeit der so genannten blasenfreien Begasung, wobei die Begasungsluft in einem Schlauch aus gasdurchlässigem Kunststoff, zum Beispiel Silikon, zirkuliert. In diesem Fall diffundieren die Gase nicht aus einer Gasblase direkt in die Suspension, sondern zusätzlich durch die Wand des Schlauches, der daher so dünn wie möglich sein sollte, um die Diffusion und somit den Gasaustausch mit der Suspension zu erleichtern.

Kultursteuerung

Welche Signale sollen nun zur Steuerung der Entwicklung der somatischen Embryonen gesetzt werden? Ein auslösender „Schalter“ des eigentlichen Differenzierungsprozesses ist die Überführung der Zellen aus einem Medium mit Wachstums-



Bioreaktor mit blasenfreiem Begasungssystem aus Silikon-schlauch. In einem Gefäß mit einem Arbeitsvolumen von zwei Liter befinden sich zwei Meter des Begasungsschlauchs, der einen Durchmesser von vier Millimeter und eine Wandstärke von 0,4 Millimeter aufweist. Im Schlauchsystem zirkuliert die Begasungsluft, die bei Bedarf z. B. mit Sauerstoff angereichert werden kann.



Somatische Embryogenese bei Alpenveilchen (*Cyclamen persicum*): Undifferenzierte Zellen in wachstumsregulatorhaltigem Medium.

regulatoren in ein regulatorfreies Medium. Über die Bedingungen, die die Embryonen für ihre weitere Entwicklung benötigen, ist bislang wenig bekannt. Man kann vermuten, dass sie möglichst den Bedingungen ähneln sollten, wie sie für einen zygotischen Embryo im sich entwickelnden Samenkorn vorliegen, wobei aber auch hier vieles im Dunkeln liegt. Wahrscheinlich ist der Gasaustausch mit der Umgebung reduziert, sodass möglicherweise Kohlendioxid sowie Ethylen als gasförmiges Phytohormon akkumulieren. Dies kann man bei einer blasenfreien Begasung in Bioreaktoren simulieren, indem das Begasungssystem nach außen geschlossen

ist und die Begasungsluft im System zirkuliert. Die Grafik auf Seite 27 zeigt, dass in diesem Fall Kohlendioxid bis zu einer Konzentration von 25 Prozent und Ethylen bis zu 0,6 ppm akkumulieren. Im Vergleich dazu waren beide Gase im Kopfraum von Erlenmeyerkolben, die als Kontrolle dienten, beinahe nicht nachweisbar, da hier ein sehr guter Gasaustausch mit der Umgebungsluft erfolgt. Während der dreiwöchigen Differenzierungsphase wurden in diesem Versuch im Bioreaktor 150 Embryonen pro Milliliter gebildet, in den Erlenmeyerkolben nur 100. Bei der nachfolgenden Überführung auf festes Nährmedium keimten im ersten Fall

(Bioreaktor) 19 Prozent, im zweiten (Erlenmeyerkolben) nur 15 Prozent, sodass die Jungpflanzenausbeute bei der Bioreaktorkultur 28 Pflanzen pro Milliliter und bei Kultur im Erlenmeyerkolben 15 Pflanzen pro Milliliter der ursprünglichen Suspension betrug. Es liegt also die Vermutung nahe, dass die Akkumulation der Gase die Entwicklung der somatischen Embryonen beeinflusst.

Analog kann so der Einfluss weiterer Parameter empirisch ermittelt werden. Vermutlich ist die Wirkung auch abhängig vom Entwicklungsstadium der somatischen Embryonen, sodass auch die gezielte Applikation einzelner Faktoren in bestimmten Zeitfenstern denkbar wäre. Grundsätzlich werden mit diesen Untersuchungen aber nur Korrelationen zwischen Ursache und Wirkung ermittelt. Die genauen physiologischen Vorgänge werden nicht erfasst, hierfür sind Untersuchungen auf molekularer Ebene erforderlich.

Molekulare Ebene

Wie oben beschrieben, entwickelt sich ein zygotischer Embryo innerhalb des ihn umgebenden Gewebes, das vermutlich auch an der Steuerung von Differenzierungsvorgängen des Embryos beteiligt ist. Denkbar wäre hier eine Weiterleitung von Signalen über Proteine, die vom umgebenden Gewebe abgegeben werden. Übertragen auf die Situation somati-



Bioreaktoren zur Kultur pflanzlicher Zellsuspensionen mit einem Arbeitsvolumen von zwei Liter (links) bzw. fünf Liter (rechts) mit den dazugehörigen Mess- und Regeleinrichtungen.



Oben links: Somatische Embryonen ca. drei Wochen nach Beginn der Differenzierung in wachstumsregulatorfreiem Medium. Mitte: Embryonen mit deutlich gestrecktem Keimblatt. Rechtes Bild: Keimende somatische Embryonen.

scher Embryonen, die sich zusammen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen in einer Suspension befinden, wären diese extrazellulären Proteine im Kulturmedium zu finden. Diese Proteine können extrahiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Ein Vergleich der Proteinstmuster von embryogenen und nicht-embryogenen Suspensionen sowie von Kulturen in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung kann so zur Isolierung von Proteinen führen, deren Auftreten mit bestimmten Entwicklungsschritten korreliert ist. Durch die Identifizierung der jeweiligen Proteine sind Rückschlüsse auf ihre Funktion im Prozess der Embryogenese möglich.

Durch Isolierung von mRNA, also der in RNA umgeschriebenen DNA exprimierter Protein-codierender Gene, und nachfolgende Synthese entsprechender komplementärer DNA, so genannter cDNA (die stabi-

ler und somit leichter zu handhaben ist als RNA), erhält man eine cDNA-library, die die kodierende Sequenz derjenigen Gene enthält, die in dem jeweiligen Gewebe „angeschaltet“ sind. Wird die cDNA darüber hinaus von den Enden her ansequenziert und die Sequenzen entsprechend bioinformatisch verarbeitet, erhält man eine EST („expressed sequence tag“-)Datenbank. Um zu ermitteln, welche Gene an der Entwicklung von Alpenveilchen-Embryonen beteiligt sind, wird die mRNA somatischer wie zygotischer Embryonen in unterschiedlichen Reifestadien isoliert. Dann kann man in der daraus erstellten EST-Datenbank gezielt nach Genen suchen, die in anderen Pflanzen im Zusammenhang mit somatischer oder zygotischer Embryogenese etc. identifiziert wurden. Durch Fusion mit Reportergenen und anschließender Transformation kann das Expres-



Untersuchung der Samenstruktur von Alpenveilchen unter dem Stereomikroskop.

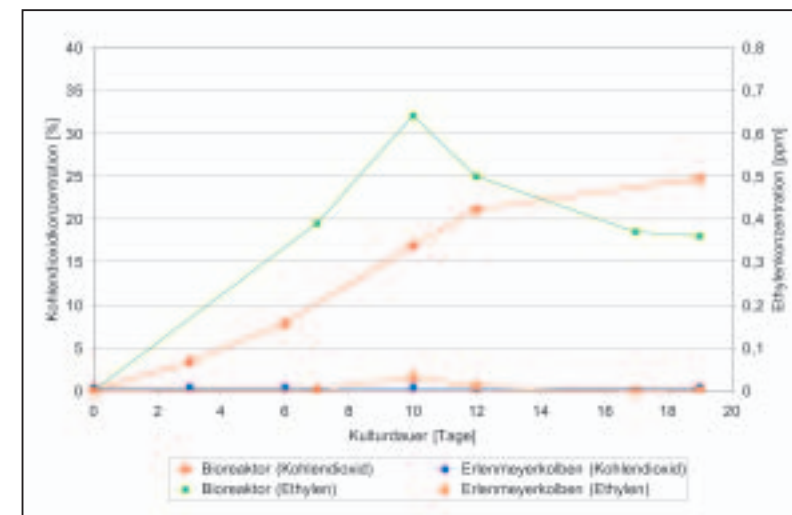
sionsmuster dieser Gene bei der Bildung zygotischer oder somatischer Embryonen untersucht werden. Hierdurch erhoffen wir uns Aufschlüsse über die molekularen Ursachen der Unterschiede zwischen embryogenen und nicht-embryogenen Zellkulturen sowie der (teilweise) unterschiedlichen Entwicklung von zygotischen und somatischen Embryonen.

Wir denken, dass diese grundlagenorientierten Untersuchungen dazu führen, den Prozess der somatischen Embryogenese bei Alpenveilchen besser zu verstehen, um zuverlässige Verfahren entwickeln zu können, die eine vegetative Vermehrung in Zukunft ermöglichen. ■



Dr. Annette Hohe, Martina Seyring, Dr. Klaus-Thomas Hänsch, Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Abt. Pflanzenvermehrung, Kühnhäuser Straße 101, 99189 Erfurt-Kühnhäuser.

E-Mail: hohe@erfurt.igzev.de
Dr. Eric Sarnighausen, Dr. Stefan Rensing, Prof. Dr. Ralf Reski, Universität Freiburg, Pflanzenbiotechnologie, Schänzlestr. 1, 79104 Freiburg



Anreicherung von Kohlendioxid und Ethylen in einem Bioreaktor mit blasenfreiem Begasungssystem während der dreiwöchigen Differenzierung somatischer Embryonen.