

Manometrische Atmungsmessungen an Protoplasten von *Petunia*

F. HOFFMANN*, U. KULL** und I. POTRYKUS*

*Lehrstuhl für Botanische Entwicklungsphysiologie der Universität Hohenheim
und **Biologisches Institut der Universität Stuttgart**Manometric Estimation of Respiration of Isolated Protoplasts of *Petunia***

Abstract. Respiration of protoplasts isolated from the leaf mesophyll of *Petunia hybrida* was estimated by the Warburg method. The time course of respiration rate shows an initial decrease followed by a prominent increase which is caused by shaking of the protoplast suspension. The absolute respiration rates are low and show an unusual spread, but the temporal form of the curve is always similar to that one shown in Fig. 1.

The RQ-values shift from below 1 during the initial phase to far above 1 during the increase of the respiration. For isolated protoplasts from petals the same is true. Feeding the protoplasts with DNA does not influence the respiration rate significantly. The physiological quality of protoplasts seems to suffer in a high degree from the isolation process.

Additional index words: Respiration; protoplasts; DNA-feeding.

Isolierte Protoplasten höherer Pflanzen scheinen so manchen experimentellen Vorteil für die Beantwortung unterschiedlichster Fragestellungen der Botanik zu bieten. Im Bereich des genetic engineering z.B. liegen erste, wohl nur durch den Fortfall der Zellwand erzielbare Ergebnisse vor (HESS 1972; CARLSON 1973; POTRYKUS und HOFFMANN 1973). Auch dem Pflanzenphysiologen sollte dieses System einige Vorteile bieten. Während sich die überragende Mehrzahl der vorliegenden als auch ein immer noch hoher Prozentsatz der neu erscheinenden Protoplasten-Publikationen mit Problemen der Isolierung und Feinstruktur beschäftigt, liegen über das Verhalten der Protoplasten an sich nur wenige Arbeiten vor. Durch Untersuchung der CO₂-Fixierung wurde gezeigt, daß Protoplasten aus Blattgewebe photosynthetisch aktiv sind (KANAI und EDWARDS 1973a, b; WEGMANN und MÜHLBACH 1973). Über die Atmung von Protoplasten fanden wir keine Angaben, obwohl schon KLEINZELLER (1965) darauf hinweist, daß sich hier interessante Perspektiven eröffnen. Zur Charakterisierung der Protoplasten von *Petunia* haben wir daher die Atmungsraten untersucht.

Eingegangen am 29. November 1973

*Adressen: D 7000 Stuttgart 72, BRD; neue Adresse: MPI für Pflanzengenetik D 6802 Ladenburg, Rosenhof

**D 7000 Stuttgart 60, Ulmer Str. 227, BRD.

Material und Methode

Die semisterile Isolierung der Protoplasten aus Mesophyll von Blättern von *Petunia hybrida* erfolgte wie bei POTRYKUS und DURAND (1972) und HOFFMANN (1973) beschrieben. Die fertigen Protoplasten befanden sich stets in einem leicht hypertonen Versuchsmedium (pH 5,8), soweit nichts anderes angegeben von 0,35 M Mannit.

Die Messung der Atmungsraten erfolgte in der Warburg-Apparatur bei kleiner Schüttelfrequenz und 25 °C Wasserbad-Temperatur nach dem üblichen Verfahren mittels der direkten Warburg-Methode (KLEINZELLER 1965). Der Hauptraum der Gefäße wurde mit der Protoplastensuspension, eine Ansatzbirne mit Lauge beschießt. Zur Berechnung der Respirationsquotienten (RQ) blieb ein Teil der Gefäße jeweils ohne Lauge.

Ergebnisse

Die Atmungsmessungen begannen etwa 1 h nach Fertigstellung der Protoplasten. Die Atmungsrate liegt anfangs bei 1,5–10 $\mu\text{l O}_2 \text{ h}^{-1}$ bezogen auf 10^6 Protoplasten und sinkt im Verlauf von 2–3 h auf einen Minimalwert ab. 4–6 h nach Beginn der Messungen setzt ein Atmungsanstieg ein, der über mehrere Stunden hinweg anhält und in dessen Verlauf das 3,5–10fache der anfänglichen Atmungsrate erreicht wird. Die relativ hohe Streuung der Versuchswerte zeigte während der Durchführung von Anfang März bis Anfang

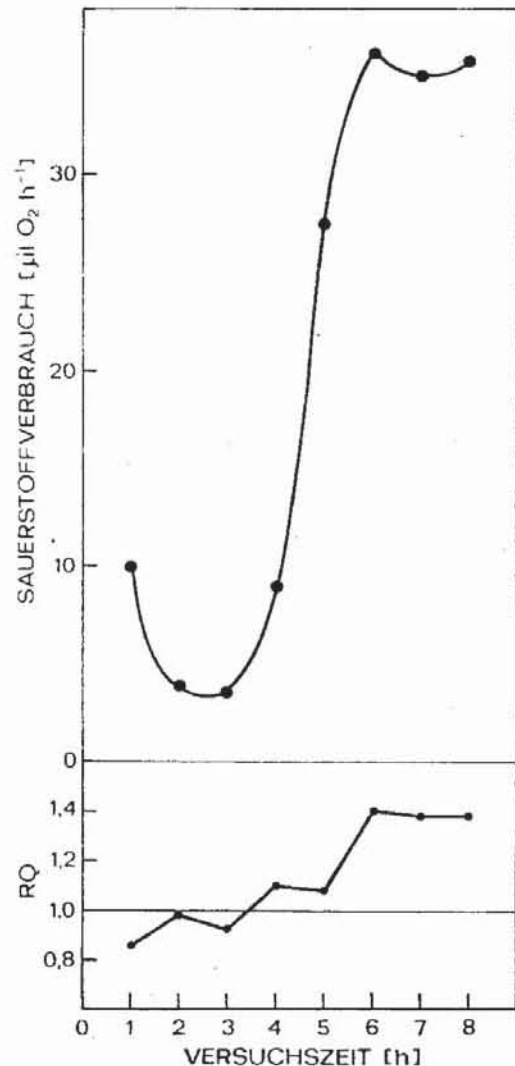


Abb. 1. Verlauf der Atmungsrate und des RQ-Wertes einer Suspension von 10^6 Protoplasten bei manometrischer Bestimmung nach Warburg.

Juli keine erkennbare Regelmäßigkeit in Bezug auf die Jahreszeit bzw. das Pflanzenalter. Den zeitlichen Ablauf in einem typischen Versuch zeigt Abb. 1. Der starke Atmungsanstieg ist von der vorhergehenden Schüttelzeit abhängig. Läßt man frisch hergestellte Protoplasten zunächst stehen und bringt sie mit einer vierstündigen Verzögerung zur Messung in die Warburg-Apparatur, so tritt der Atmungsanstieg um 4–5 h verzögert ein. Er ist außerdem um 5–10 % geringer als bei den sofort zur Messung gebrachten Kontrollen.

Durch Untersuchung des Gaswechsels in Gefäßen ohne Laugenzusatz sind erste Aussagen über das Verhalten des RQ-Wertes möglich. Man beobachtet anfangs einen RQ-Wert unter 1, im Extremfall bis 0,77, zumeist zwischen 0,82 und 0,90 (Abb. 1). Nach Einsetzen des starken Atmungsanstiegs nimmt der RQ-Wert in der Regel auf über 1, bei einigen Versuchen bis 1,4 zu. Werden frisch gewonnene Protoplasten durch kräftiges Schütteln mit kleinen Glaskugeln mechanisch zerstört, so liegt die Atmungsrate dieser Suspension bei etwa einem Zehntel derjenigen unbeschädigter Protoplasten. Ein Atmungsanstieg ist nicht zu beobachten.

Die Atmung von Protoplasten, die im Mannit-Medium zusätzlich Saccharose (10 Vol % 0,32 M Saccharose) angeboten erhalten, zeigt anfänglich keine Unterschiede zu derjenigen der Protoplasten in reinem Mannit. Auch der Atmungsanstieg läuft genau so ab, allerdings bleiben die Atmungsraten dann um etwa 15 % geringer. Der Anstieg des RQ ist dagegen überraschenderweise stärker ausgeprägt, so daß Werte bis über 1,5 ziemlich schnell (7 h nach Versuchsbeginn) erreicht werden.

Setzt man Protoplasten erst 12 h nach der Gewinnung für Atmungsversuche ein, so ist die anfängliche Atmungsrate etwas geringer, der zeitliche Ablauf ihrer Veränderung aber gleichartig. Während der Phase der Atmungssteigerung bleiben die verbrauchten Sauerstoffmengen um rund 20 % hinter denjenigen der Kontrollen zurück; der Anstieg des RQ bleibt ebenfalls kleiner (bis etwa 1,25). Protoplasten aus Petalen zeigen über 5 h hinweg einen gleichartigen Verlauf der Atmungskurve. Der RQ liegt hier zu Versuchsbeginn bei 0,85.

Durch Zugabe von Petunien-DNS ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) ins Medium wird die Atmungsrate im Verlauf von 7 h nicht signifikant beeinflusst. Dieser Versuch wurde im Rahmen unserer Untersuchungen zur DNS-Aufnahme durch isolierte Protoplasten (HOFFMANN 1973) durchgeführt, speziell zur Frage der Schädigung der Protoplastenmembran durch exogene DNS.

Diskussion

Die anfängliche Atmungsintensität der Protoplasten ist geringer als die einer gleichen Zellmenge in intaktem Blattgewebe; die Werte im letzteren Fall liegen etwa 3–10 mal so hoch. Durch Gesamtchlorophyllbestimmungen wurde ferner ermittelt, daß in unserem System 10^6 Protoplasten bei 10 mg Trockengewicht einem Blatt-Frischgewicht von 133 mg entsprechen. Ein Vergleich mit Einzelzellen aus Mesophyll-Gewebe verschiedener Arten zeigt auch für dieses Material eine erheblich höhere Atmungsintensität (GNANAM und KULANDAIVELU 1969). Der starke Atmungsanstieg nach einigen Stunden ist zweifellos eine Folge des Schüttelns, er kommt wahrscheinlich durch eine mechanische Alterung der Zellen zustande. Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, daß es bei Alterungsvorgängen zu einer starken und oft plötzli-

chen Erhöhung der Atmungsrate kommt (Blattalterung, Fruchtreifung).

Aus der Lage der RQ-Werte zu Versuchsbeginn ist zu entnehmen, daß sich die Protoplasten offenbar in einem Zustand der Substratverarmung befinden, das heißt, daß nicht nur Kohlenhydrate veratmet werden, sondern auch Lipide oder Proteine. Da die Blätter zur Gewinnung der Protoplasten jeweils morgens geerntet wurden, war ihr Stärkegehalt gering, so daß dieses Substrat zur Versuchszeit nicht in genügender Menge zur Verfügung stand. Auf die Richtigkeit dieser Annahme weisen die Befunde einiger Versuche hin, die mit vorher im Phytotron belichteten Blättern ausgeführt wurden. Bei Protoplasten dieser Ansätze lag der RQ-Wert nie unter 0,9. Soweit noch freie Zucker während der Versuchszeit vorhanden sind, werden diese vielleicht zum Teil aus Gründen der Osmoregulation (KAUSS 1967) nicht als Substrate verwendet. Jedoch ist dieser Problemkreis bei höheren Pflanzen bisher völlig ungeklärt. Protoplasten bieten sich hier als vielleicht ideales Versuchssystem an. Den im Verlauf der Phase der Atmungssteigerung beobachteten Anstieg des RQ sehen wir ebenfalls im Zusammenhang mit der Alterung und einer mechanischen Schädigung der Protoplasten. Es wäre denkbar daß bei einer Schädigung des Atmungssystems Gärungsvorgänge ablaufen.

Die Befunde mit den 12 h alten Protoplasten können unter der Annahme erklärt werden, daß diese bereits mit der Bildung einer neuen Zellwand begonnen haben und somit mechanisch stabiler sind. Vielleicht ist der beobachtete geringere Atmungsanstieg bei den 4 h nach der Isolierung eingesetzten Protoplasten auch bereits auf diesen Effekt zurückzuführen.

Die Versuche weisen unsere Protoplasten als ein empfindlich reagierendes System aus, das bei sorgfältiger Wahl der Kontrollexperimente für physiologische Untersuchungen geeignet erscheint. Sie zeigen, daß mikroskopisch nicht unterscheidbare, physiologisch aber unterschiedliche Qualitäten bei jeweils genau gleicher Isolierung entstehen.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des Bundesministers für Bildung und Wissenschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Fräulein A. Krauss und Fräulein B. Kühn danken wir für sorgfältige technische Assistenz.

Literatur

- CARLSON, P. S.: The use of protoplasts for genetic research. — Proc. nat. Acad. Sci. USA **70** : 598 to 602, 1973.
- GNANAM, A., KULANDAIVELU, G.: Photosynthetic studies with leaf cell suspensions from higher plants. — Plant Physiol. **44** : 1451—1456, 1969.
- HESS, D.: Transformationen an höheren Organismen. — Naturwissenschaften **59** : 348—355, 1972.
- HOFFMANN, F.: Die Aufnahme doppelt-markierter DNS in isolierte Protoplasten von *Petunia hybrida*. — Z. Pflanzenphysiol. **69** : 249—261, 1973.
- KANAI, R., EDWARDS, G. E.: Enzymatic separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from C₄ plants. — Naturwissenschaften **60** : 157—158, 1973.
- KAUSS, H.: Isofloridosid und Osmoregulation bei *Ochromonas malhamensis*. — Z. Pflanzenphysiol. **56** : 453—465, 1967.
- KLEINZELLER, G.: Manometrische Methoden. — VEB G. Fischer, Jena, 1965.
- POTRYKUS, I., DURAND, J.: Callus formation from single protoplasts of *Petunia*. — Nature new Biol. **237** : 286—287, 1972.
- POTRYKUS, I., HOFFMANN, F.: Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. — Z. Pflanzenphysiol. **69** : 287—289, 1973.
- WEGMANN, K., MÜHLBACH, H. P.: Photosynthetic CO₂ incorporation by isolated leaf cell protoplasts. — Biochim. biophys. Acta **314** : 79—82, 1973.

F. HOFFMANN, U. KULL, I. POTRYKUS (Hohenheim a Stuttgart): **Manometrické stanovení dýchání u izolovaných protoplastů petunie.** — Biol. Plant. 17 : 38—42, 1975.

Warburgovou metodou bylo měřeno dýchání protoplastů izolovaných z mesofylu *Petunia hybrida*. Časový průběh změn rychlosti dýchání a hodnot RQ vykazuje charakteristický tvar: po počátečním snížení rychlosti dýchání následuje značný vzestup, způsobený protřepáváním suspense chloroplastů. Absolutní hodnoty rychlosti dýchání jsou nízké a mají mimořádně vysoký rozptyl. Hodnoty RQ stoupají během počáteční fáze z hodnot nižších než 1 až na hodnoty daleko nad 1 v průběhu zvýšení rychlosti dýchání. Totéž platí pro chloroplasty izolované z okvět-
ních lístků. Nasycení protoplastů DNA neovlivní významně rychlost dýchání. Zdá se, že fy-
siologický stav protoplastů je silně ovlivněn způsobem izolace.