

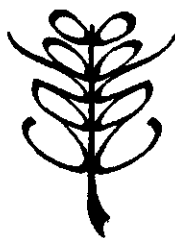
**Selectie van hoog-producerende cellijnen van *Tagetes* en andere
plantesoorten met behulp van doorstroomcytometrie**

Eindrapport PcLB-project 1988-1990

P. Adamse

CABO-verslag nr. 133

1990



Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek

Postbus 14, 6700 AA Wageningen

1349 2/2 202

Korte beschrijving doelstelling project:

Doel van het project was het verhogen van de productie van secundaire metabolieten door selectie van hoogproducerende cellijnen uit natuurlijke populaties en via mutagenese van natuurlijke populaties. Het project richt zich voornamelijk op de productie van thiofenen (natuurlijke biociden) in *Tagetes* species. Met behulp van een doorstroomcytometer worden cellen of protoplasten van *Tagetes* species geselecteerd op hun gehalte aan thiofenen door gebruik te maken van de fluorescentie van deze verbindingen.

Inhoud:

	blz.
Samenvatting	2
Inleiding	4
Methodes en resultaten	
Individuele cellen	5
Thiofenen	6
FCM	12
Regeneratie	16
Conclusies	19
Referenties	21

Samenvatting

Begin jaren '80 werd binnen DLO (voormalige Stichting Itai) in samenwerking met de LU vakgroep Levensmiddelentechnologie (sectie proceskunde) een onderzoek gestart naar de productie van natuurlijke gewasbeschermingsmiddelen met behulp van celcultures. Gaande het onderzoek werden ook de LU vakgroepen Organische Chemie (sectie fytochemie), Nematologie en Plantenfysiologie bij dit project betrokken, alsmede het laboratorium voor moleculaire plantenfysiologie van de KU te Nijmegen. In hoofdzaak richtte het onderzoek zich op de thiofeenverbindingen in composieten, met name *Tagetes* soorten (afrikaantjes). Thiofenen kunnen o.a. gebruikt worden bij het onderdrukken van de aaltjesaantasting bij sommige gewassen. Onderzoek naar de toepasbaarheid van celkweken om waardevolle verbindingen te produceren heeft tot nu toe nog slechts enkele commerciële toepassingen opgeleverd. In het algemeen - thiofenen uit *Tagetes*cellen niet uitgezonderd - zijn de bereikte productieniveaus nog te laag.

Productieverhoging kan nagestreefd worden langs verschillende wegen, zoals optimalisatie van de kweekcondities, selectieve beïnvloeding van de genexpressie en het verkrijgen van cellijnen met een verhoogde productiecapaciteit. In het onderhavige project werd de laatste strategie nagestreefd. In het bijzonder werd nagegaan of een doorstroomcytometer (ook wel 'cell sorter' genoemd) een bruikbaar hulpmiddel kan zijn om uit een gekweekte celpopulatie cellen te selecteren met een aanzienlijk hogere productiecapaciteit dan het gemiddelde van de populatie. Deze cellen zouden dan de basis kunnen zijn van cultures met een verhoogde productie en zodoende de toepasbaarheid van de industriële plantebiotecnologie dichterbij kunnen brengen.

Het technische selectieproces is gebaseerd op de aanwezigheid van fluorescerende verbindingen (in dit geval thiofenen), die per cel of protoplast (cel zonder celwand) gedetecteerd kunnen worden indien de cellen stuk voor stuk door een meetsysteem worden geleid. De mate van fluorescentie kan gebruikt worden om cellen in te delen in klassen met verschillende gehalten aan thiofenen.

De flowcytometrische selectieprocedure bestaat uit de volgende elementen:

- prepareren van individuele cellen of protoplasten uit een celculture
- het analyseren van de fluorescentie van deze cellen
- het sorteren van cellen op basis van hun fluorescentie
- het regenereren van deze protoplasten of cellen tot nieuwe celcultures met verhoogde productiecapaciteit
- het beoordelen van de stabiliteit (groei en productie) van de middels selectie verkregen cultures.

Dit eindrapport van het door de PcLB (Programmacommissie Landbouwbiotechnologie) ondersteunde project gaat uitgebreid in op de elementen die nodig zijn voor het met succes toepassen van de beoogde techniek. In het kort zijn de problemen bij het toepassen van de techniek in het *Tagetes*-thiofenen-systeem de betrekkelijk lage protoplastenopbrengst, de zeer tijdrovende en nog weinig reproduceerbare regeneratieprocedure vanuit protoplasten en het vóórkomen in cellen van verschillende thiofenen met verschillende fluorescentierementen. Bovendien is het thiofeengehalte van protoplasten slechts 10% van dat van intacte cellen. Met name de moeilijke regeneratie van *Tagetes*protoplasten heeft een evaluatie van de selectiemethode als geheel onmogelijk gemaakt binnen de 2½ jaar die het project heeft geduurd. Ondanks deze problemen is vast komen te staan dat selectie van protoplasten op basis van hun thiofeengehalte mogelijk is en

dat er grote verschillen in thiofeengehalte per cel bestaan waarop in principe geselecteerd kan worden. Voor de regeneratie van *Tagetes*protoplasten is een (suboptimale) methode beschikbaar.

Een praktische conclusie na afloop van dit onderzoek is dat verdere evaluatie en toepassing van de methode beter kan plaatsvinden met cultures van soorten waarvoor een snelle en reproduceerbare regeneratieprocedure beschikbaar is. Deze soorten moeten, hetzij als (vrijwel) ronde losse cellen of als protoplasten, een t.o.v. de gekweekte cellen hoge fluorescentie vertonen afkomstig van één specifieke verbinding.

De resultaten van dit project zijn herhaaldelijk bekend gemaakt aan de geïnteresseerde collega's in binnen- en buitenland en het onderzoek naar thiofenen uit celcultures wordt in Wageningen en Nijmegen de komende jaren voortgezet.

Inleiding

Planten zijn een belangrijke bron van waardevolle verbindingen zoals geneesmiddelen, smaak- en geurstoffen, pigmenten en biociden. Vaak zijn dit secundaire metabolieten, d.w.z. stoffen die niet direkt in de ontwikkeling van de plant noodzakelijk zijn. Deze stoffen worden meestal uit de planten geëxtraheerd. Het gebruik van hele planten heeft echter nadelen. Er zijn grote hoeveelheden grondoppervlak nodig om de benodigde planten te kweken en vaak is ook de beschikbaarheid van de planten erg onzeker, zowel door klimaat als door politieke omstandigheden. Ook worden sommige planten uit het wild verzameld en worden ze daar zolangzamerhand met uitsterven bedreigd. Door de vooruitgang in de biologische kennis (celbiologie, moleculaire genetica, weefselkweek) lijkt productie van plantaardige fijnchemicaliën via celkweken een alternatief te kunnen worden voor de extractie van deze verbindingen uit wilde of gekweekte planten.

Van veel plantesoorten zijn tegenwoordig cel- en orgaancultures beschikbaar. Een aantal van deze cultures produceert waardevolle verbindingen uit het zgn. secundair metabolisme van de plant en enkele systemen worden al op commerciële schaal toegepast. Vaak is echter de productie in deze systemen veel lager dan in hele planten. Selectie van cellijnen met een hoge productie is daarom een belangrijke strategie in de ontwikkeling van industriële productie van secundaire metabolieten m.b.v. plantecultures. Tussen en binnen cellijnen zijn aanmerkelijke verschillen in productieniveau van secundaire metabolieten waargenomen. Deze verschillen kunnen worden toegeschreven aan zowel fenotypische als somaclonale variatie. Fenotypische variatie - d.w.z. variatie als gevolg van cellulaire differentiatie, langdurige blootstelling aan verscheidene plantehormonen of verschillen in de groeiomstandigheden - is reversibel en zal niet tot stabiele veel-producerende cellijnen leiden. Het is meer waarschijnlijk dat somaclonale variatie een bron van stabiele veel-producerende varianten of mutanten zal zijn, vooral als er bovendien mutagene behandelingen worden toegepast.

De methodes die op het ogenblik beschikbaar zijn voor de selectie van veel-producerende cellijnen zijn vnl. gebaseerd op de analyse van clonen (callus of celsuspensies) m.b.v. diverse chemische analysetechnieken. Bij sommige metabolieten wordt ook wel visuele selectie toegepast (b.v. anthocyanine: Dougall et al, 1980). Deze methodes zijn echter zeer arbeidsintensief en tijdrovend. Een succesvolle methode moet aan een bepaald aantal voorwaarden voldoen:

- de methode moet snel grote hoeveelheden cellen kunnen verwerken
- er moeten individuele cellen kunnen worden geanalyseerd
- de analyse moet zijn gebaseerd op het voorkomen van de gewenste eigenschap
- het uiteindelijke productiesysteem dat uit de gesorteerde individuen voortkomt moet de gewenste eigenschap nog steeds bezitten

Doorstroomcytometrie (ook wel flow cytometry of FCM) maakt het mogelijk in een korte tijd een grote hoeveelheid cellen te analyseren. Analyse van de concentratie van bepaalde stoffen in individuele cellen m.b.v. een FCM is door verschillende onderzoekers beschreven waarbij gebruik werd gemaakt van de autofluorescentie van chlorofyl (Harkins en Galbraith, 1984), de fluorescentie van metabolieten zoals serpentine (Brown et al., 1984, Deus-Neumann en Zenk, 1984) en berberine (Hara et al., 1989) of de fluorescentie van speciale kleurstoffen (o.a. Brown, 1984; Galbraith et al., 1984).

Voor de selectie van veel-producerende cellijnen m.b.v. de FCM is het noodzakelijk dat de gebruikte plantesoort een fluorescerende metaboliet produceert. Afrikaantjes (*Tagetes patula*) produceren thiofenen, verbindingen die sterk fluoresceren als ze aan UV worden blootgesteld. Deze verbindingen behoren tot de groep der polyacetylenen en daarvan afgeleide natuurstoffen. Zij zijn

o.a. het nematocide principe van afrikaantjes (Wijnberg, 1988) en verder actief in vele biologische processen (Lam et al., 1988). Ook celsuspensies van *T. patula* produceren thiofenen, daarom zijn deze celsuspensies geschikt als modelsysteem voor het testen van de bruikbaarheid van FCM voor de selectie van cellijnen met een hoge productie van secundaire metabolieten.

Om individuele cellen te kunnen sorteren op grond van hun thiofeengehalte zijn er diverse voorbereidende proeven noodzakelijk. *Tagetes* celsuspensies zijn sterk geaggregeerd, daarom is het verkrijgen van losse cellen niet eenvoudig. Individuele cellen in de vorm van protoplasten lijkt een oplossing. Er is weinig bekend over protoplasten uit *Tagetes* celsuspensies, daarom was één van de eerste vereisten het ontwikkelen van een geschikte methode voor protoplastisolatie.

Om cellen te kunnen sorteren op grond van thiofeengehalte was het nodig zoveel mogelijk karakteristieken van thiofenen en de thiofeenproductie in aggregaatsuspensies van *Tagetes* te kennen. Verschillende metingen werden gedaan aan 'pure' oplossingen van thiofenen, maar ook werd het thiofeengehalte van protoplasten en cultures onderzocht. Bovendien werd gezocht naar een methode om het thiofeengehalte te manipuleren.

Voordat protoplasten konden worden gesorteerd met de FCM werden eerst verschillende analyses uitgevoerd met het apparaat. Gekeken werd of de verdeling van diameters van een populatie protoplasten overeenkwam met het scatterpatroon (scatter is het licht dat op de protoplast valt en vervolgens door de protoplast wordt verstrooid en geeft informatie over de relatieve grootte). Bovendien werden diameters en scatter vergeleken na enkele sorteeroperaties. De thiofeenfluorescentie karakteristieken van protoplasten uit enkele weinig-producerende cultures werden vergeleken met die van enkele veel-producerende cultures. Vervolgens werden enkele fracties protoplasten gesorteerd op grond van thiofeenfluorescentie. De karakteristieken van deze fracties werden vergeleken met die van de oorspronkelijke populatie. Ook werd gekeken naar het percentage protoplasten dat het sorteren overleefde.

Uiteindelijk zullen de gesorteerde protoplasten weer moeten uitgroeien tot aggregaatsuspensies. Hiervoor moest een geschikte methode worden ontwikkeld.

In dit rapport staat beschreven hoe de verschillende problemen zijn aangepakt en wat de resultaten waren. Aan de hand van deze resultaten zal worden getracht een uitspraak te doen over de bruikbaarheid van doorstroomcytometrie voor het selecteren van cellijnen met een hoge (thiofeen) productie.

Methodes en resultaten

Individuele cellen

Er zijn verschillende cultures opgezet van *Tagetes patula*: calluscultures, aggregaatsuspensies en wortelcultures. Deze cultures zijn gebruikt als uitgangsmateriaal voor het isoleren van protoplasten door het uitgangsmateriaal te incuberen in een buffer met daarin verschillende enzymen. Over het algemeen werd gebruik gemaakt van cellulase 'Onozuka' R-10 (1%) en pectolyase Y-23 (0,1%). Het was mogelijk protoplasten te isoleren uit callus en uit aggregaatsuspensies. Uit wortels konden slechts heel weinig protoplasten worden geïsoleerd. Ook het gebruik van andere enzymen (macerozym, meicelase en rhozyme) bracht hierin geen verandering. Het bleek noodzakelijk het celmateriaal met de enzymen overnacht te incuberen om een redelijke hoeveelheid protoplasten te verkrijgen (ca. 10^6 pps/g celmateriaal, d.w.z. dat ca. 4% van de cellen geprotoplasteerd wordt). Enkele uren incubatie, zoals voor sommige andere plantesoorten wordt

beschreven, bleek bij *T. patula* niet voldoende. Preplasmolyse van de cellen vóór protoplastisolatie, zoals door Smith et al (1989) werd toegepast, gaf geen verhoging van de opbrengst (Fig. 1). De

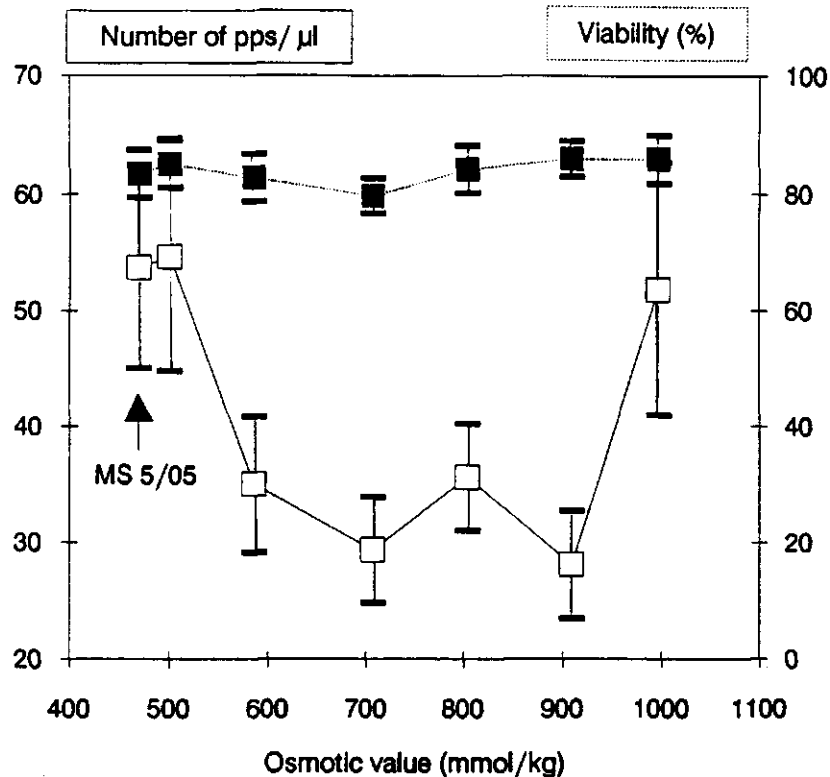


Fig. 1. Opbrengst (open symbolen) en 'levensvatbaarheid' (=viability: dichte symbolen) van protoplasten geïsoleerd uit geaggregeerde celsuspensies van *Tagetes patula* na preplasmolyse (incubatie in een oplossing met een bep. osmotische waarde). MS 5/05 is het medium waarin de suspensie groeide

protoplasten werden gezuiverd door ze te filtreren over nylon gaasfilters (250 en 85 μm) en ze daarna met een geconcentreerde suikeroplossing door centrifugatie in een toplaag te verzamelen. Na enig experimenteren bleek een oplossing van 0,4 M saccharose de grootste hoeveelheid protoplasten op te leveren. Na kleuring met FDA bleek ca. 90% van de protoplasten nog 'in leven' (viable) te zijn.

Om een indruk te krijgen van de variatie in protoplastgroottes zijn er dia's gemaakt van protoplasten op een Bürker-Türk telkamer. Deze dia's werden met een 'dia-viewer' bekeken en de diameters van de protoplasten werden m.b.v. doorzichtig milimeterpapier gemeten. Er bleek een grote variatie in diameters te zijn, van ca. 10 tot 50 μm . De gemiddelde diameter was ongeveer 24 μm . Deze variatie in diameters komt overeen met een variatie in volumes van $5 \cdot 10^2$ tot $5 \cdot 10^4 \mu\text{m}^3$.

Thiofenen

Er waren oplossingen beschikbaar met (min of meer) pure thiofenen (Fig. 2). Van deze oplossingen werd de fluorescentie bepaald. In eerste instantie kon alleen worden bekeken wat de excitatie en emissie maxima van de afzonderlijke thiofenen waren, omdat de exacte concentratie van de thiofenen niet bekend was. Later waren er oplossingen beschikbaar van precies afgewogen hoeveelheden thiofenen, zodat ook het molaire fluorescentie rendement kon worden berekend. Deze gegevens staan in Tabel 1.

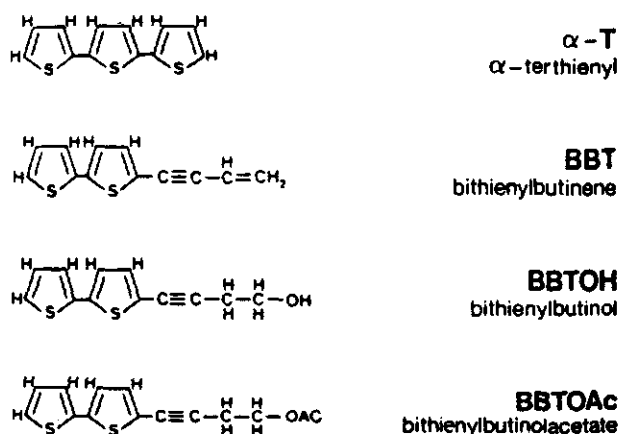


Fig. 2. De voornaamste thiofenen uit *T. patula*.

Tabel 1. Emissiemaxima en molair fluorescentie rendement van verschillende thiofenen. De excitatiegolflengte was 360 nm en het fluorescentie rendement werd bepaald voor de emissie tussen 435 en 500 nm (het golflengtegebied waarin ook met de FCM wordt gemeten).

	emissie maximum (nm)	molair fluor. rendement (rel.)
BBTOH	387	8
BBTOAc	387	9
BBT	406	100
α -T	424	113

Het lijkt niet waarschijnlijk dat in mengsels de afzonderlijke thiofenen nog te onderscheiden zijn met een meetsysteem als de FCM, daarvoor overlappen de spectra te veel. Het molaire fluorescentie rendement is niet voor alle thiofenen gelijk. Eén mol BBT of α -T fluoresceert 10 keer zoveel als één mol BBTOH of BBTOAc. Dit maakt de interpretatie van de resultaten met de FCM moeilijker. Als b.v. de gegevens uit Fig. 5c (zie verderop in dit rapport) worden bekeken, verhouden de totale thiofeenconcentraties van de cultures uit het licht en uit het donker zich als 1 : 2, maar als wordt uitgerekend hoe de totale thiofeenfluorescentie van deze cultures zich zouden verhouden blijkt dit 1 : 3 te zijn. Verschuiving van thiofeensamenstelling kan tot verandering van de hoeveelheid fluorescentie leiden. Dit kan het verschil tussen veel- en weinig producerende cultures zowel vergroten als verkleinen. Na regeneratie van aggregaatsuspensies uit gesorteerde protoplasten zal dan ook moeten worden gecontroleerd of er niet is gesorteerd op een verschillende verhouding van de diverse thiofenen i.p.v. een grotere totale hoeveelheid thiofenen.

Voordat er met de FCM echt protoplasten gesorteerd kunnen worden, moet er eerst worden onderzocht of verschillen in thiofeenconcentratie ook inderdaad met de FCM te meten zijn. Hiervoor is het nodig protoplasten te isoleren uit cultures met een duidelijk verschil in thiofeengehalte. In eerste instantie werd er gedacht aan protoplasten uit wortelcultures als 'hoogproducerende'

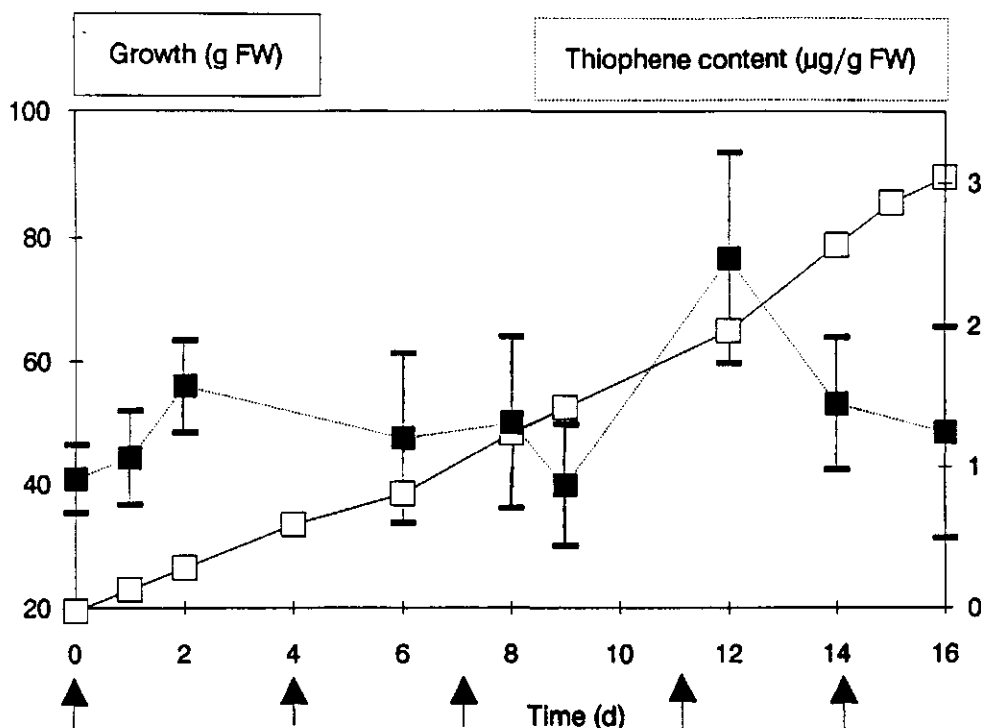


Fig. 3. Groei (cumulatief: open symbolen) en thiofeengehalte (dichte symbolen) van aggregaatsuspensies van *Tagetes patula* in continu wit licht (5 W.m^{-2}) bij 25°C . De pijlen geven het tijdstip aan waarop het medium werd verversd.

protoplasten en uit aggregaatsuspensies als 'laagproducerende' protoplasten. Het bleek echter niet mogelijk uit de wortelcultures voldoende protoplasten te isoleren voor FCM-analyse. Daarom werd er gekeken naar verschil in thiofeenproductie van de aggregaatsuspensies.

Alle nieuwe aggregaatsuspensies produceerden thiofenen, maar het thiofeengehalte schommelde nogal per culture. Eerst werd gekeken of deze schommelingen samenvielen met het verversen van het medium. Er bleek geen duidelijk verband te zijn (Fig. 3). Wel lijkt er een verband te bestaan tussen de leeftijd van een culture en het thiofeengehalte. Cultures van meer dan een jaar oud produceerden niets meer, terwijl jongere cultures van vergelijkbare oorsprong wel thiofenen produceerden. Vervolgens is er gezocht naar een andere methode om het thiofeengehalte te 'manipuleren'. Tijdens een standaardanalyse van de beschikbare cultures bleek dat de thiofeenconcentratie van cultures die continu in het licht stonden lager was dan van cultures in het donker (Fig. 4). Dit gegeven werd verder onderzocht, omdat licht/donker behandeling misschien mogelijkheden bood om het thiofeengehalte van cultures te manipuleren. Zo zouden veel- en weinig-producerende cultures 'gemaakt' kunnen worden om de FCM-analyse uit te testen.

Cultures werden gesplitst en in continu wit licht c.q. continu donker (ingepakt in aluminiumfolie) gezet. Gedurende enkele weken werd de thiofeenconcentratie van aggregaten en medium bepaald. Al na enkele dagen bleek het gemiddelde thiofeengehalte van de cultures in het donker hoger te zijn dan dat van cultures in het licht (Fig. 5a). Ook het thiofeengehalte van het medium was hoger in het donker (Fig. 5b). Deze verschillen waren ook in de concentraties van de afzonderlijke thiofenen terug te vinden (Fig. 5c en 5d). Dit verschil werd niet veroorzaakt door verschil in aggregaatgrootte of pH van de cultures.

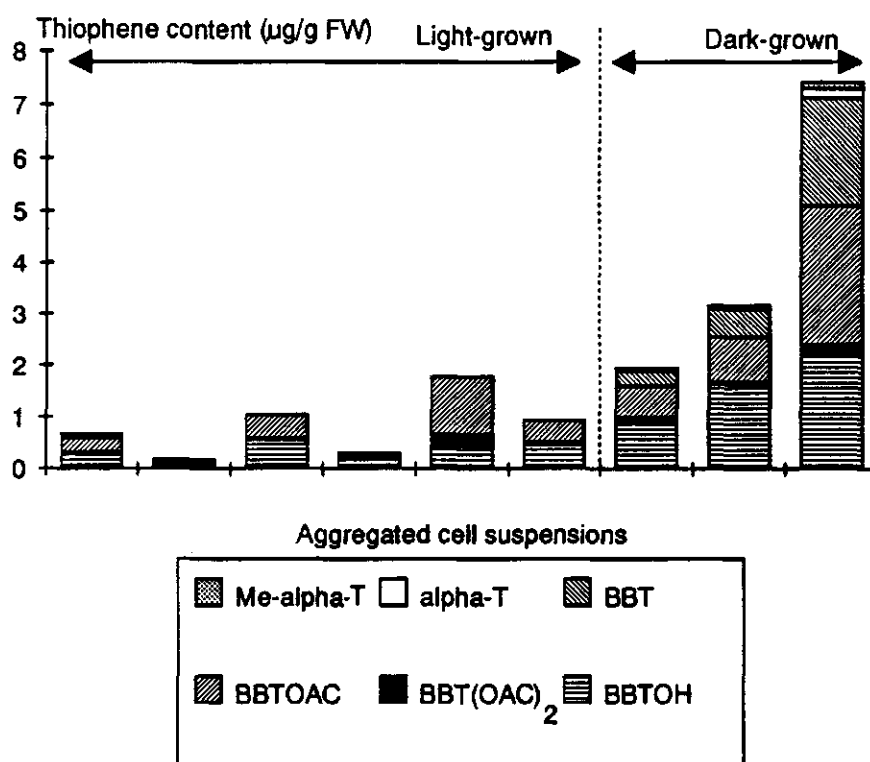


Fig. 4. Thiofeengehalte van enkele aggregaatsuspensies van *Tagetes patula*, gekweekt bij 25 °C in continu wit licht (5 W.m^{-2}) of in het donker.

Bij een herhaling van dit experiment, met cultures vermeerderd uit één van de bij de eerste proef gebruikte cultures uit het licht, kwam weer het verschil tussen cultures in licht en donker naar voren. Het totale thiofeengehalte was echter beduidend lager. Dit was vnl. het gevolg van een ten opzichte van het vorige experiment sterk verminderd BBTOAc- concentratie.

Tabel 2. Afbraak van thiofenen na 5 dagen in celvrij medium in continu wit licht (L: 5 W.m^{-2}) of in het donker (D) bij 25 °C. De beginconcentratie wordt aangegeven als tijdstip 0.

tijd (d)	concentratie (ng/ml)	%
0	$8,40 \pm 0,81$	100 ± 10
L	$6,51 \pm 0,31$	77 ± 4
D	$7,22 \pm 1,68$	86 ± 20

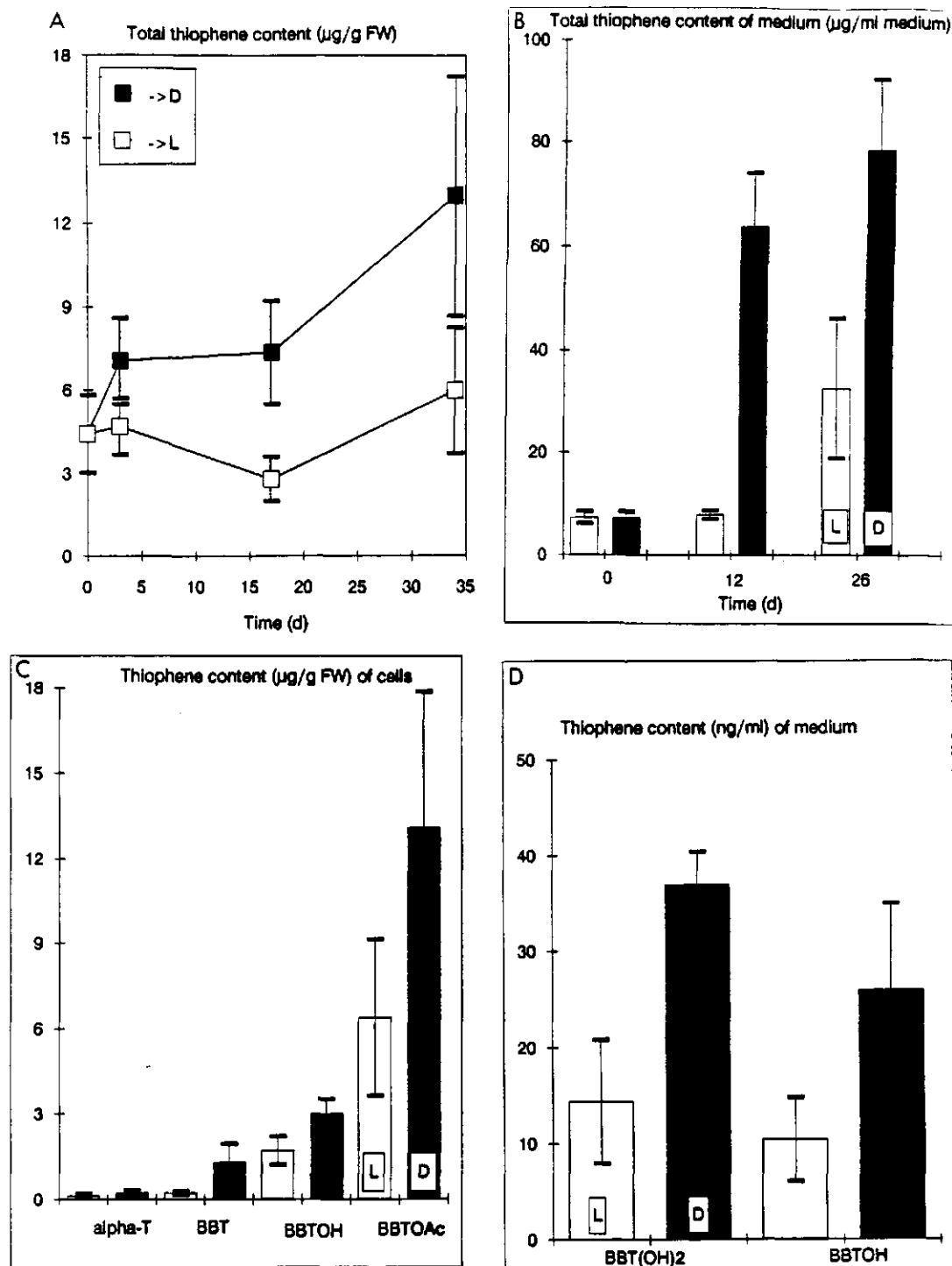


Fig. 5. Thiofeengehalte van aggregaatsuspensies van *Tagetes Patula* gekweekt bij 25 °C in continu wit licht (L: 5 W.m⁻²) of in het donker (D).

A) Totaal thiofeengehalte van de aggregaten; B) Idem, van het medium; C) Concentratie van de afzonderlijke thiofenen in de aggregaten na 34 d; D) Idem, in het medium.

Een controle-experiment werd opgezet door aan kolven met medium een mengsel met een bekende hoeveelheid thiofenen toe te voegen. Deze kolven werden gedurende enkele weken op een schudder gezet in continu licht of in het donker. Uit deze cultures werden monsters genomen om te onderzoeken of er sprake was van thiofeenaafbraak in celvrij medium (Tabel 2).

Voornameijk BBTOH en BBT(OH)₂ werden in het medium teruggevonden. Dit is echter waarschijnlijk geen gevolg van afbraak van de andere thiofenen maar een gevolg van de slechte oplosbaarheid in water van de andere thiofenen. Uit de gevonden thiofeenconcentraties bleek dat in de kolven uit het licht meer thiofenen waren afgebroken dan in die in het donker. Na 5 dagen was bijna 25% van de hoeveelheid aan het medium toegevoegde BBTOH verdwenen. In het donker was er nog bijna 90% over. Door Sütfeld en Breteler (1989) werd beschreven dat de thiofenen (in plantenmonsters) verschillen in gevoeligheid voor licht. BBTOAc en BBT worden sterker afgebroken dan α -T en BBTOH. Dit verschil is echter niet duidelijk terug te vinden in de in dit rapport gepresenteerde gegevens. Waarschijnlijk zijn er naast fysische afbraak door licht ook biologische processen verantwoordelijk voor het verschil in thiofeengehalte van cultures in het donker en in continu wit licht.

Tijdens observatie van geïsoleerde protoplasten met een fluorescentiemicroscopie bleek dat er na UV-excitatie een duidelijke blauwe fluorescentie zichtbaar werd (Fig. 6). Dit gaf een eerste aanwijzing dat de thiofeenconcentratie van protoplasten hoog genoeg zou zijn om met de FCM te meten. Er waren ook protoplasten waar te nemen zonder blauwe fluorescentie. Dit gaf aan dat er behalve thiofenen waarschijnlijk geen andere blauw fluorescerende verbindingen in de protoplasten aanwezig zijn.

Uit analyse van pas geïsoleerde protoplasten en van de verschillende fracties die tijdens de isolatieprocedure ontstaan bleek dat er vrij veel thiofenen in de celwandfractie achterblijven (Tabel 3). Dit zou er op kunnen wijzen, dat veel thiofenen aan de celwand 'gebonden' zijn. In de protoplasten zat ongeveer 1/10 van de hoeveelheid thiofenen die in hele cellen werd gevonden.

Tabel 3. Thiofeengehalte van een aggregaatsuspensie van *Tagetes patula*, protoplasten geïsoleerd hieruit, en verschillende fracties ontstaan tijdens de isolatieprocedure.

Thiofenen	% van totaal	$\mu\text{g/g}$ vers of $\mu\text{g/ml}^*$
aggregaten	100	$6,7 \pm 1,0$
overgebleven cellen	75	$7,5 \pm 0,7$
enzym suspensie	13	$0,2 \pm 0,3^*$
celwand resten	7	$8,9 \pm 0,0$
wasvloeistoffen	2,6	$0,1 \pm 0,1^*$
protoplasten	0,1	$0,8 \pm 0,3$

* = $\mu\text{g/ml}$

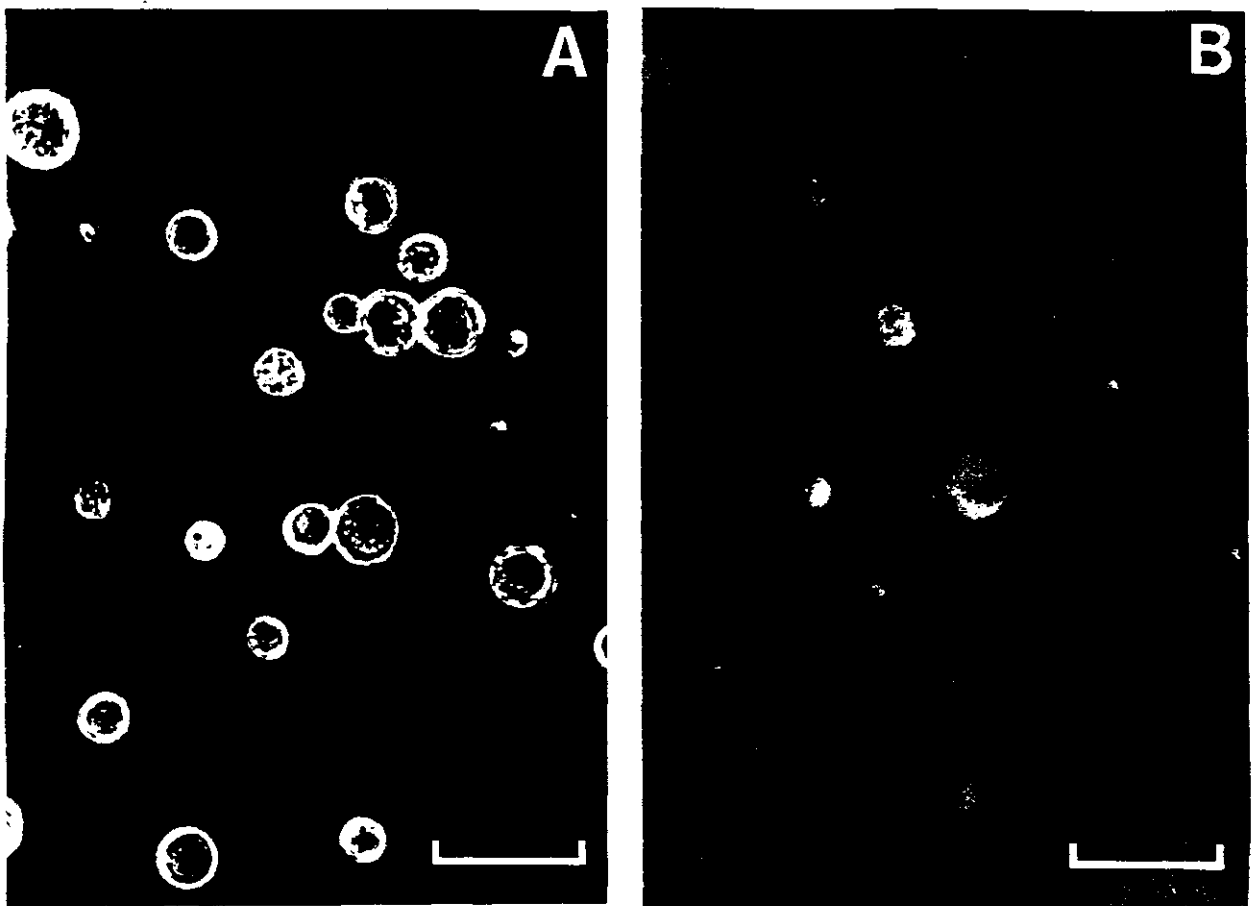


Fig. 6. Protoplasten geïsoleerd uit geaggregeerde celsuspensies van *Tagetes patula*: gewone belichting (A) en epi-fluorescentie belichting (B). Het balkje geeft 100 μm aan.

FCM

Voor dit onderzoek zijn twee doorstroomcytometers gebruikt. Allereerst de FACS, die gebruik maakt van geladen druppeltjes om te sorteren en ook verstrooid licht (scatter) kan meten (Fig. 7). Later werd de PARTEC gebruikt, waarin de protoplasten in een continue vloeistofstroom blijven en door een apart kanaaltje worden 'geduwd' als ze aan de sorteercriteria voldoen (Fig. 8). Met de PARTEC kan geen scatter worden gemeten.

Met de FACS werd allereerst gekeken naar scatter. Scatter wordt vaak gebruikt om een indicatie te krijgen van de variatie in groottes van individuen (protoplasten in dit geval). Dit is echter slechts een benadering, want ook verschil in oppervlaktestructuur en inhoud van een cel kan verschil in scatter veroorzaken. Van de gesorteerde fracties werden dia's gemaakt, zodat hiermee de werkelijke diameters gemeten konden worden zoals hiervoor is beschreven. Er bleek inderdaad enige verschuiving te zijn van het maximum in de richting van het sorteervenster, vooral als kleine protoplasten werden gesorteerd (Fig. 9). Door gesorteerde fracties nogmaals te analyseren kon worden bepaald hoeveel het percentage overleving was na het sorteren. Er bleken veel protoplasten stuk te gaan tijdens het meten. De overlevingspercentages lagen tussen de 3 en 40%. Om op een andere manier een indruk te krijgen van de grootte van protoplasten werden ze gekleurd met FDA. Het bleek echter dat de opname van deze kleurstof geen kwantitatieve gegevens opleverde over

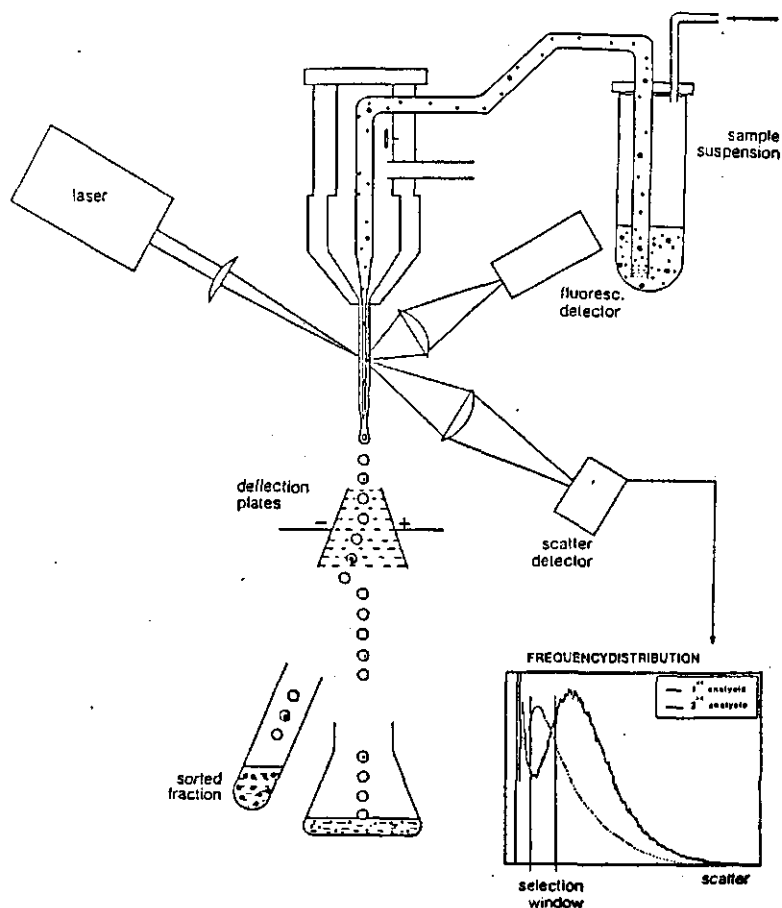


Fig. 7. Doorstroomcytometer: FACS-IV Cell Sorter (Becton Dickinson, Sunnyvale, USA)

Cellen of protoplasten worden één voor één belicht door een laserstraal. De vloeistofstroom wordt gebroken tot druppels door een trillend piezo-eletrisch cristaal. In elk druppeltje zit hooguit één cel. Lichtverstrooiing en fluorescentie worden geregistreerd door lichtsensoren en deze gegevens worden m.b.v. een computer in een frequentiediagram weergegeven. In dit figuur kunnen criteria worden gedefinieerd voor de gewenste fractie(s): het 'sorteervenster'. De gemeten waarden van een cel worden snel vergeleken met deze criteria zodat de cel electrostatisch kan worden geladen en afgebogen naar het juiste opvangreservoir.

afmetingen van de protoplasten. De opname was waarschijnlijk meer afhankelijk van de 'viability' van de cel dan van de afmetingen.

Voor het meten van de thiofeenfluorescentie werd gebruik gemaakt van filters om de gewenste golflengtes voor excitatie en emissie te verkrijgen (Tabel 1). Er is gebruik gemaakt van excitatielicht tussen 360 en 418 nm en de emissie werd gemeten tussen 435 en 500 nm.

Er is gesuggereerd dat de verhoging van de productie slechts een kwestie is van het toenemen van het aantal producerende cellen in een populatie (Hara et al, 1989). De resultaten van het in dit rapport beschreven onderzoeken geven echter iets anders aan. Protoplasten geïsoleerd uit een culture met een laag gemiddeld thiofeengehalte werden vergeleken met protoplasten uit een culture met een hoog gemiddeld thiofeengehalte. Uit een veel-producerende culture bleken inderdaad protoplasten met een hogere thiofeenfluorescentie te zijn geïsoleerd (Fig. 10). Bovendien was de mediaan van de protoplasten uit die culture, d.w.z. de relatieve intensiteit waarbij 50% van de protoplasten een hogere en 50% een lagere fluorescentie-intensiteit heeft, verschoven naar een

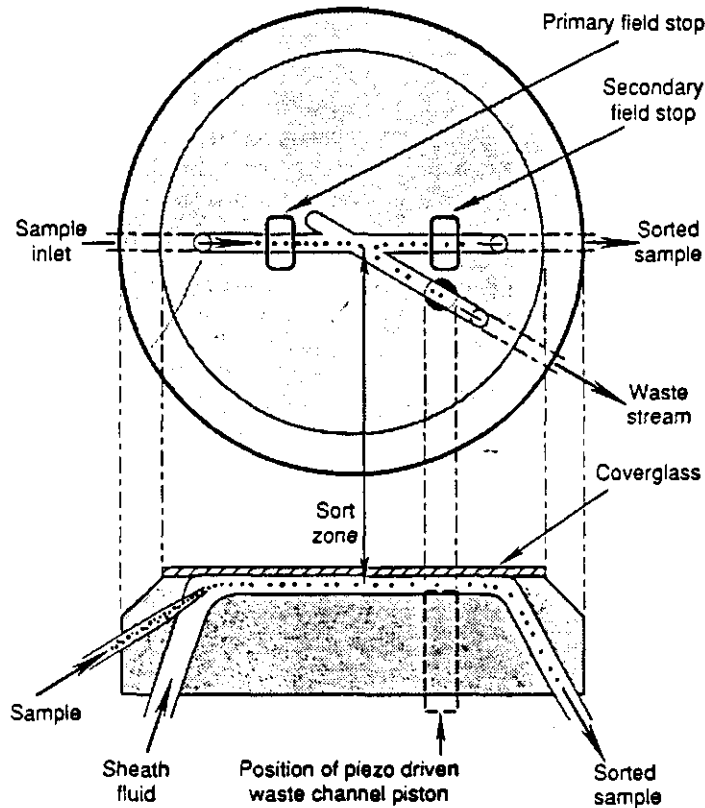


Fig. 8. Doorstroomcytometer: PARTEC PAS II

Bovenaanzicht en dwarsdoorsnede van een 'fluidic switching sorter'. De deeltjes stromen horizontaal door het zichtveld van een microscopopstelling met een Köhler verlichting. Een piezoelectrisch aangedreven zuigertje in het afvalkanaal (= 'waste stream'), waar normaal ca. 70% van de flow doorheen gaat, kan worden geactiveerd zodat een deeltje door het sorteerkanaal wordt geleid. (uit: Lister, 1990)

hogere intensiteit. Dit was het geval zowel als de mediaan werd berekend inclusief de 'ruis' aan het begin (veroorzaakt door kleine stukjes protoplast) als zonder deze ruis. ook leek de 'range' van intensiteiten toe te nemen. Dit geeft aan dat het verschil in totaal thiofeengehalte van een populatie wordt veroorzaakt door variatie in het thiofeengehalte van individuele cellen en niet door variatie in het aantal productieve cellen. Het zou dus mogelijk moeten zijn tijdens FCM-analyse protoplasten in te delen in klassen met verschillende fluorescentieintensiteit en zo een fractie met een extra hoge thiofeenfluorescentie aan te geven.

Met de PARTEC werden verschillende sorteerproeven uitgevoerd. Geanalyseerde protoplasten werden op grond van hun fluorescentieintensiteit in klassen verdeeld. Alle protoplasten met een hoge thiofeenconcentratie, worden bij de normale analyse verzameld in de hoogste klasse. Door de fluorescentieintensiteit tijdens de analyse in logaritmische klassen te verdelen is het mogelijk protoplasten te onderscheiden met een extreem verhoogde thiofeenconcentratie en die protoplasten vervolgens te selecteren. De karakteristieken van de oorspronkelijke populatie en de gesorteerde fracties werden vergeleken (Fig. 11).

Van de gesorteerde protoplasten werd ca. 25% teruggevonden bij de analyse van die fractie.

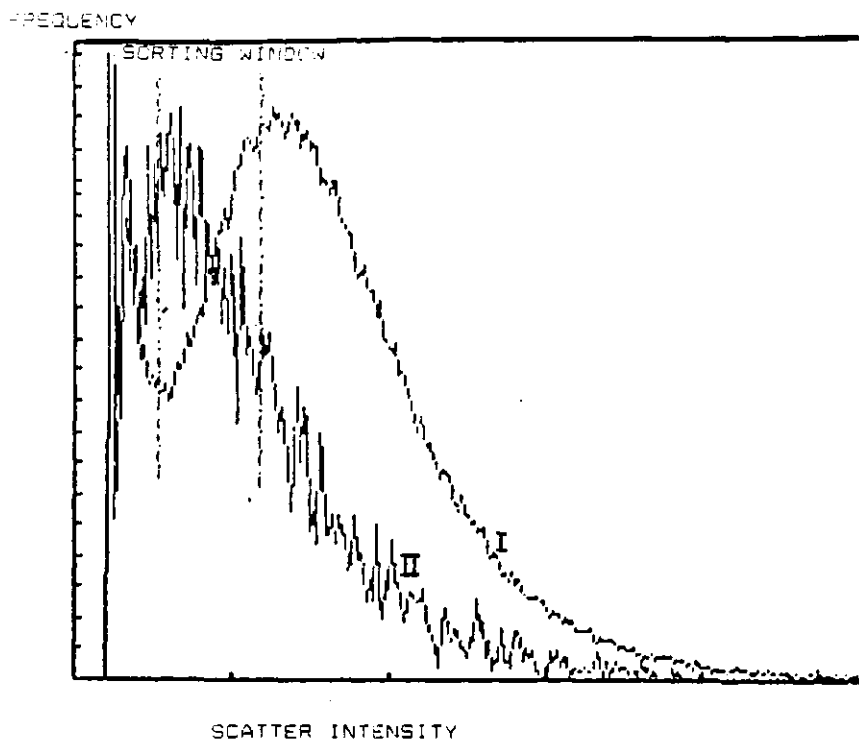


Fig. 9. Frequentieverdeling van verstrooid licht van protoplasten geïsoleerd uit aggregaatsuspensies van *Tagetes patula* voor (I) en na sorteren (II). Geanalyseerd op een FACS-IV Cell Sorter (Becton Dickinson, Sunnyvale, USA) uitgerust met een HBO 100 hogedruk kwiklamp (360 nm), met een LP-418 filter in de emissielichtbundel.

De pijlen geven de mediaan (= 'mode') aan, d.w.z. de relatieve intensiteit waarbij 50% van de protoplasten een hogere en 50% een lagere fluorescentieintensiteit hebben (berekend inclusief 'ruis').

Er was geen duidelijke piek terug te vinden in het sorteergebied. Waarschijnlijk zijn de eigenschappen van de protoplasten toch enigszins veranderd door de hele sorteerooperatie. Een aanzienlijk deel was na het sorteren stuk gegaan. Dit bleek ook uit de sterk toegenomen hoeveelheid (kleine) deeltjes met een lage fluorescentieintensiteit. Bij het sorteren van protoplasten met een extra hoge fluorescentie was in de gesorteerde fractie een verrijking in het hoge-intensiteit-gebied en een verschuiving van de mediaan (naar een hogere intensiteit) waar te nemen. Regeneratie van een dergelijke fractie zal echter moeten uitwijzen of het ook werkelijk om een blijvende verhoging gaat. De hoeveelheid materiaal die door sorteren kan worden verkregen is te gering om het gemiddelde thiofeengehalte van de fractie met HPLC te bepalen.

Kort geleden is het op het Ital gelukt om hele plantecellen (van een andere soort en op grond van andere karakteristieken dan voor dit project gebruikt worden) te sorteren m.b.v. de FCM. Als het mogelijk zou zijn hele cellen van een *T. patula* celsuspensie te sorteren op grond van thiofeengehalte, zou een groter deel van de cellen kunnen worden geanalyseerd (slechts 4% van de cellen werd protoplast). Bovendien wordt bij het gebruik van hele cellen het totale thiofeengehalte van de cel gemeten en niet slechts 10% hiervan zoals in protoplasten. Tevens zou zo het regeneratieprobleem omzeild kunnen worden.

Er zijn verschillende pogingen gedaan om hele cellen met de FCM te analyseren. Dit is tot nu toe echter niet gelukt. De cellen waren nogal gevarieerd van vorm: variërend van rond tot heel

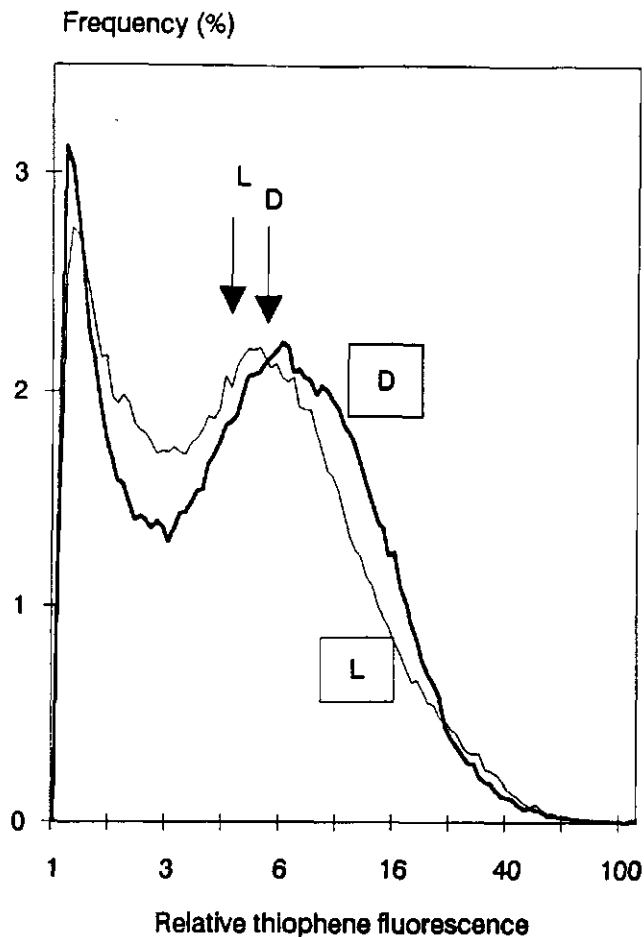


Fig. 10. Frequentieverdeling van blauwe fluorescentie van protoplasten geïsoleerd uit aggregaatsuspensies van *Tagetes patula* met een lage (L; dunne lijn) of een hoge (D; dikke lijn) thiofeen-productie. Geanalyseerd op een FACS-IV Cell Sorter (Becton Dickinson, Sunnyvale, USA) uitgerust met een HBO 100 hogedruk kwiklamp (360 nm), met een LP-418 filter in de emissielichtbundel. Mediaan incl. ruis: D = 349 ± 25 , L = 287 ± 26 ; excl. ruis: D = 429 ± 17 , L = 398 ± 5

langgerekt. De lange cellen gaven problemen omdat ze de kanaaltjes in de FCM verstopten.

Regeneratie

Gesorteerde protoplasten moeten uiteindelijk weer worden geregenereerd tot aggregaatsuspensies om het effect van de selectie te onderzoeken en om de stabiliteit van de productie te kunnen volgen. Deze regeneratie geeft bij *T. patula* echter nog problemen. In de literatuur was er slechts één melding van geregenereerde protoplasten van *T. patula* (Binding et al, 1981). Deze auteur gaf echter geen experimentele gegevens zodat er een nieuwe methode moest worden ontwikkeld. Allereerst werden de protoplasten in vloeibaar medium geïncubeerd in kleine petrischaaltjes. Ook werd dit medium soms met agarose iets vaster gemaakt. Dit gaf echter geen goede resultaten. Vervolgens werd er een methode gebruikt, die door andere onderzoekers op het Itaal was ontwikkeld (De Laat en Blaas, 1987). Hierbij werden protoplasten gefixeerd in een agarose laagje op een objectglasje. Dit glasje kwam in een petrischaaltje met enkele ml vloeibaar medium (Fig. 12). Met deze methode zijn er maar kleine hoeveelheden protoplasten nodig en is het mogelijk de protoplasten individueel te volgen met een omkeermicroscop. Het medium kan op een

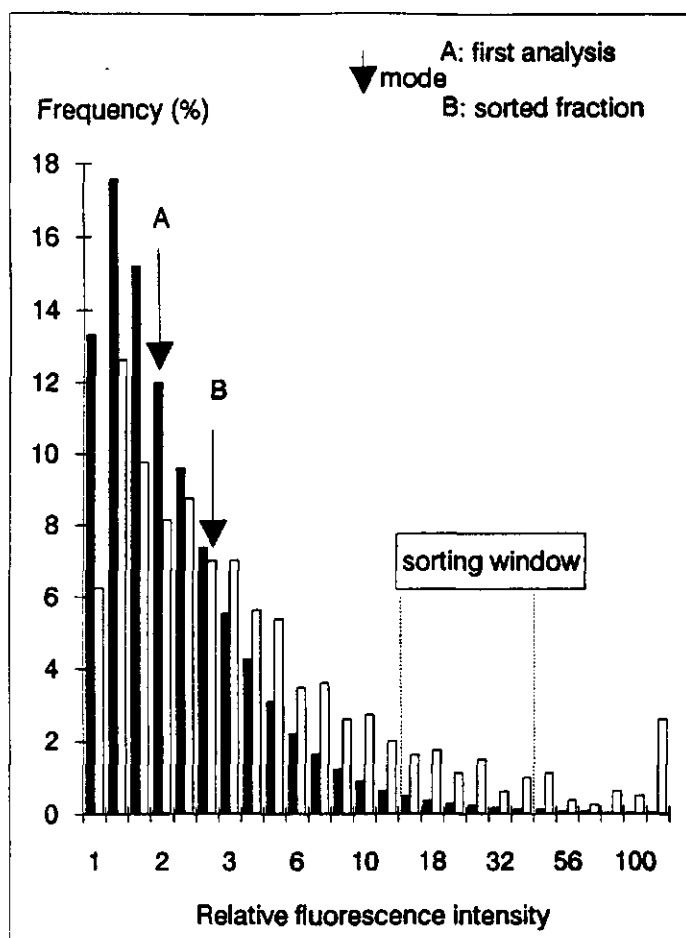


Fig. 11. Frequentieverdeling van blauwe fluorescentie van protoplasten geïsoleerd uit aggregaatsuspensies van *Tagetes patula* voor (A; dichte balk) en na sorteren (B; open balk). Geanalyseerd op een Partec PAS II, uitgerust met een HBO 100 hogedruk kwiklamp (360 nm), met een LP-418 filter in de emissielichtbundel.

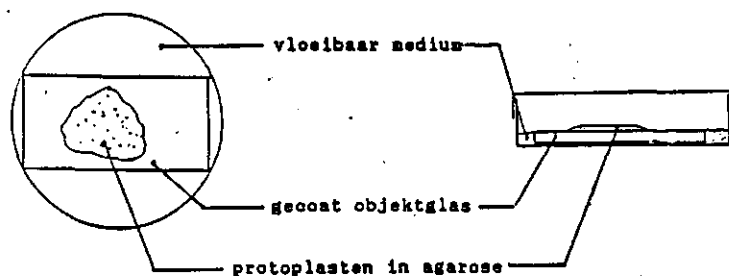


Fig. 12. Uitplaatmethode voor protoplastregeneratie.

eenvoudige manier worden ververst door de glasplaatjes in een nieuw schaalte met vers medium te leggen.

De invloed van leeftijd van de culture, uitplaatdichtheid en variaties in het medium werd onderzocht. Eén van die media was een speciaal nitraat-loos medium (met glutamine als N-bron) dat ook voor andere composieten werd gebruikt (Lenee en Chupeau, 1986, 1989). Volgens deze auteurs kunnen veel composieten niet op nitraat-houdend medium groeien, omdat het enzym nitraatreductase niet actief is. Aangezien *Tagetes* ook tot de composieten behoort, leek dit een geschikte aanpassing van het medium. De protoplasten werden in verschillende dichtheden uitgeplaat om een optimum te vinden. Bovendien werd er getracht met een langzame verlaging van de osmotische waarde van het medium de delingsactiviteit te bevorderen. Slechts in enkele gevallen werden er delende protoplasten gevonden. Deze protoplasten konden worden geregenereerd tot callusklompjes (Fig. 13) en vervolgens tot goed groeiende aggregaatsuspensies. De regeneratiemethode was echter zeer slecht reproduceerbaar en bovendien zeer langzaam. Van

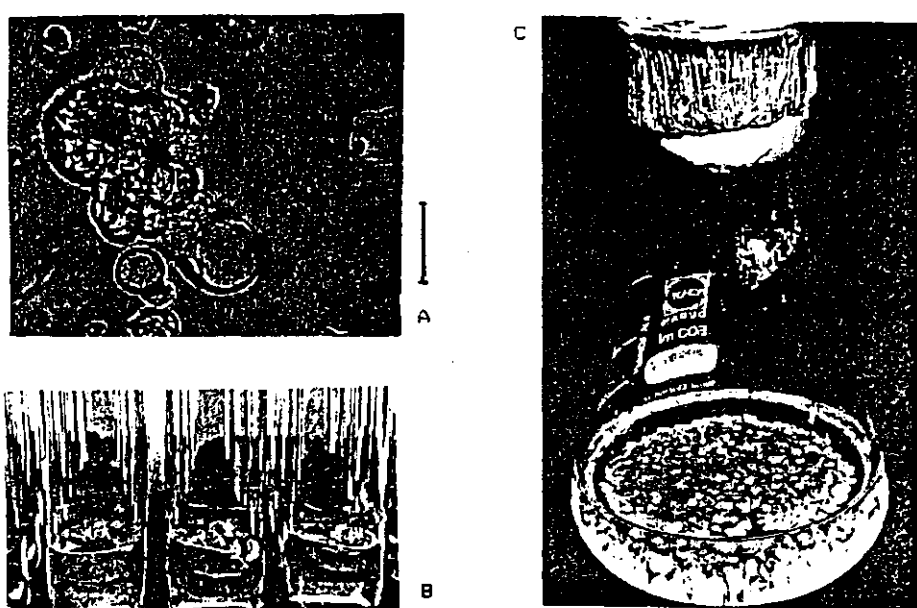


Fig. 13. Geregenereerde protoplasten van *Tagetes patula*: (A) 18 d na isolatie; (B) hieruit ontstaan callus en (C) geaggregeerde celsuspensie. Het balkje geeft 50 μ m aan.

protoplast tot aggregaatsuspensie duurde meer dan een half jaar. Het testen van media voor regeneratie van protoplasten is een nogal arbeidsintensieve en tijdrovende bezigheid. Daarom werd er met behulp van de FCM een poging gedaan sneller een idee te krijgen van de bruikbaarheid van een bepaald medium. De protoplasten werden enkele dagen in verschillende media geïncubeerd en vervolgens werden de kernen hieruit geïsoleerd. In deze kernen werd het DNA gekleurd met DAPI, een fluorescerende kleurstof (Verhoeven, 1989), en kon met de FCM de delingsactiviteit van de protoplasten worden bestudeerd (Fig. 14). Hieruit bleek dat in enkele media de protoplasten geen enkele delingsactiviteit vertoonden (geen G2-fase), terwijl bij enkele andere media wel activiteit was waar te nemen. Met deze methode zou het mogelijk moeten zijn een groot aantal media te testen zonder uitgebreide microscopische groeianalyses. Alleen media waarin de protoplasten nog delingsactiviteit vertonen worden bij verdere regeneratie experimenten gebruikt.

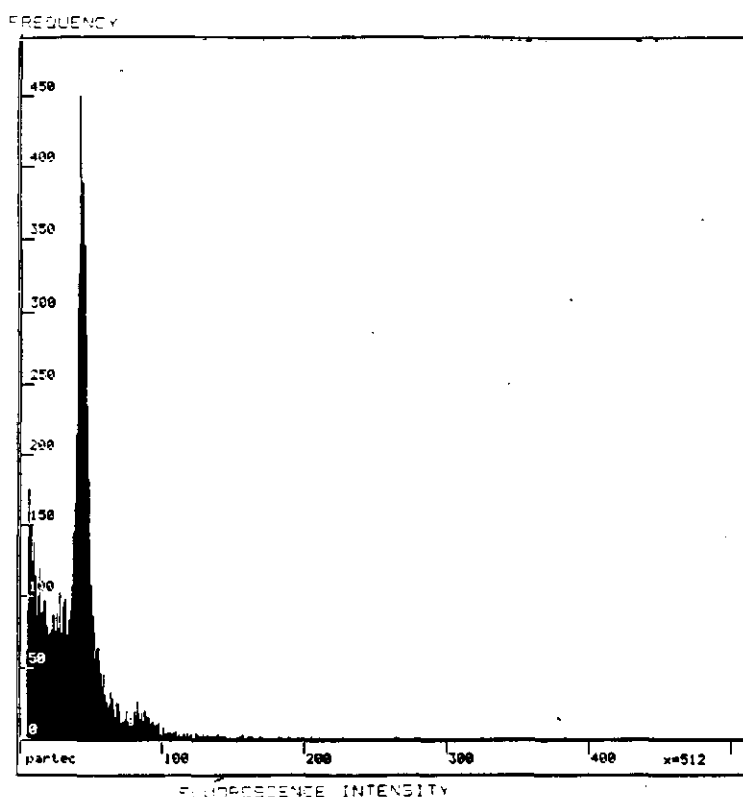


Fig. 14. Frequentieverdeling van DNA-fluorescentie van kernen uit protoplasten gekleurd met DAPI en geïsoleerd uit aggregaatsuspensies van *Tagetes patula*. Geanalyseerd op een Partec PAS II. Eerste piek veroorzaakt door kernen in de G1 fase. Tweede piekje de G2 fase.

Conclusies

Uit de resultaten van dit project is gebleken, dat het mogelijk is protoplasten van *T. patula* met een hoge of lage thiofeenconcentratie te onderscheiden. Er waren duidelijke verschillen in fluorescentie-karakteristieken van cultures met een laag en een hoog gemiddeld thiofeengehalte. Bovendien bleek het ook mogelijk te zijn protoplasten te sorteren op grond van die fluorescentie-karakteristieken. Het is te verwachten dat een analyse met zowel fluorescentiemeting als volumebepaling de selectieprocedure nog zal verbeteren, omdat concentratie per protoplast kan worden bepaald i.p.v. de hoeveelheid thiofenen per protoplast.

Uit analyse van aggregaatsuspensies geregenereerd uit gesorteerde protoplasten zal moeten blijken of de selectie uiteindelijk heeft geleid tot een stabiele verhoogde productie. In de selectiemethode zaten nog enkele onzekerheden. Slechts een deel van de cellen bleek geprotoplasteerd te zijn en in de protoplasten werd slechts 10% van de hoeveelheid thiofenen teruggevonden die in de oorspronkelijke cellen werd gemeten. In hoeverre het thiofeengehalte en -patroon van de protoplasten overeenkomt met dat van een celsuspensie zal moeten worden uitgezocht.

Selectie van hele cellen biedt mogelijk voor sommige plantesoorten goede perspectieven. Zowel het afwijkende metabolietgehalte van protoplasten als moeilijkheden bij regeneratie van protoplasten kunnen zo worden vermeden. Bovendien hoeft er dan geen rekening te worden gehouden met mogelijke restanten van de celwand aan de te analyseren protoplasten. Deze celwandresten kunnen de waargenomen fluorescentieintensiteit beïnvloeden. Een vereiste is echter

wel dat de cellen vrij rond en regelmatig van vorm zijn, anders is FCM-analyse technisch niet mogelijk. *T. patula* lijkt hier niet aan te voldoen.

De selectie van veel-producerende cellijnen m.b.v. een FCM lijkt aan de criteria te voldoen voor een succesvolle methode (zie ook Inleiding):

- de analyse verloopt zeer snel en massaal
- er kunnen individuen worden geselecteerd: protoplasten in het geval van *T. patula*, maar cellen is waarschijnlijk ook mogelijk
- er kan worden gesorteerd op grond van een fluorescerende metaboliet
- de gesorteerde protoplasten met hogere fluorescentie dan de oorspronkelijke culture vertonen dezelfde karakteristieken als protoplasten uit een culture met een hoog thiofeengehalte. Regeneratie van gesorteerde protoplasten tot celsuspensies zal echter uiteindelijk moeten aantonen of de geselecteerde eigenschap ook in het uiteindelijke productiesysteem aanwezig is (en blijft)

Het is duidelijk geworden uit de resultaten van dit project dat een plantesoort moet voldoen aan verschillende vereisten voordat de plant geschikt is voor het selecteren van hoog-producerende cellijnen m.b.v. doorstroomcytometrie. Deze vereisten zijn:

- de plantesoort moet als celsuspensie gekweekt kunnen worden
- het gewenste product moet een goed van andere celproducten te onderscheiden fluorescentiespectrum hebben
- er moeten protoplasten geïsoleerd kunnen worden uit de celsuspensie
- deze protoplasten moeten een representatieve hoeveelheid van het gewenste product bevatten
- de protoplasten moeten weer tot celsuspensies geregenereerd kunnen worden

Deze vereisten vormen meteen de belangrijkste 'bottlenecks' voor deze selectiemethode. Het is belangrijk eerst een systeem te zoeken dat aan deze vereisten voldoet, voordat met de FCM-selectie wordt begonnen. Wordt aan één van deze vereisten niet voldaan, dan heeft een poging tot selectie van bepaalde celtypes geen zin.

T. patula bleek aan de eerste vier vereisten min of meer te voldoen. Uit blad kon, via een callusfase, een thiofenen-producerende (geaggregeerde) celsuspensie worden gekweekt. De thiofenen fluoresceren blauw na excitatie met UV. Een complicatie is wel het voorkomen van verschillende soorten thiofenen, die moeilijk op grond van fluorescentie zijn te onderscheiden. Protoplasten, geïsoleerd uit aggregaatsuspensies van *T. patula*, bevatten nog voldoende thiofenen om met een FCM te meten. Regeneratie van de protoplasten bleek echter een probleem te zijn. Dit probleem lijkt echter niet onoplosbaar. Op het IAPTC congres van 1990 bleek dat veel oorspronkelijk recalcitrante plantesoorten uiteindelijk toch geregenereerd konden worden. Het kost alleen meestal veel tijd om dit uit te zoeken.

Herselectie zal waarschijnlijk nodig zijn om de stabiliteit van de geregenereerde cultures te behouden. Ook zal herselectie moeten voorkomen dat slechts fysiologische varianten worden geselecteerd en zal het de kans vergroten dat een genetische stabiele verhoogde productie wordt verkregen.

Referenties

- Binding, H., R. Nehls, R. Kock, J. Finger & G. Mordhorst (1981). Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the *Dicotyledoneae* class. *Z. Pflanzenphysiol.* 101: 119-130.
- Brown, S. (1984). Analysis and sorting of plant material by flow cytometry. *Physiol. Vég.* 22: 341-349.
- Brown, S., J.-P. Renaudin, C. Prévot & J. Guern (1984). Flow cytometry and sorting of plant protoplasts: technical problems and physiological results from a study of pH and alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Physiol. Vég.* 22: 541-554.
- Deus-Neumann, B. & M.H. Zenk (1984). Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Med.* 50: 427-431.
- Dougall, D.K., J.M. Johnson and G.H. Whitten (1980). A clonal analysis of anthocyanin accumulation by cell cultures of wild carrot. *Planta* 149: 292-297.
- Galbraith, D.W., C.L. Afonso & K.R. Harkins (1984). Flow sorting and culture of protoplasts: conditions for high-frequency recovery, growth and morphogenesis from sorted protoplasts of suspension cultures of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Reports* 3: 151-155.
- Hara, Y., H. Yamagata, T. Morimoto, J. Hiratsuka, T. Yoshioka, Y. Fujita and Y. Yamada (1989). Flow cytometric analysis of cellular berberine contents in high- and low-producing cell lines of *Coptis japonica* obtained by repeated selection. *Planta medica* 55: 151-154.
- Harkins, K.R., & D.W. Galbraith (1984). Flow sorting and culture of plant protoplasts. *Physiol. Plant.* 60: 43-52.
- Ketel, D.H. (1988). Accumulation of thiophenes by cell cultures of *Tagetes patula* and the release of 5-(4-hydroxy-1-butynyl)-2,2'-bithiophene in the medium. *Planta Med.* 5: 400-405.
- Lam, J., H. Breteler, T. Arnason & L. Hansen (eds.) (1988). *Chemistry and biology of naturally-occurring acetylenes and related compounds*. Elsevier, Amsterdam.
- Laat, A.M.M. de, & J. Blaas (1987). An improved method for protoplast micro-injection suitable for transfer of entire plant chromosomes. *Plant Science* 50: 161-169.
- Lenee, P., & Y. Chupeau (1986). Isolation and culture of sunflower protoplast (*Helianthus annuus* L.): factors influencing the viability of cell colonies derived from protoplasts. *Plant Science* 43: 69-75.
- Lenee, P., & Y. Chupeau (1989). Development of nitrogen assimilating enzymes during growth of cells derived from protoplasts of sunflower and tobacco. *Plant Science* 59: 109-117.
- Lister, A. (1990). Flow cytometry for selection of plant cells in vitro. In: *Plant Cell Line Selection* (ed. P.J. Dix), VCH, Weinheim, 39-85.
- Smith, M.A.L., J.P. Palta, B.H. McCown & K.L. Steffen (1989). Plasmolytic behaviour of the donor cell may affect protoplast response. *Physiol. Plant.* 76:201-204.
- Sütfeld, R., & H. Breteler (1988). Effects of plant material and extract treatment on the yield of natural products from *Tagetes*. In: *Chemistry and biology of naturally-occurring acetylenes and related compounds*. (eds. J. Lam, H. Breteler, T. Arnason & L. Hansen). Elsevier, Amsterdam, 101-105.
- Verhoeven, H.A. (1989). Induction and characterization of micronuclei in plant cells. Perspectives for micronucleus-mediated chromosome transfer. Proefschrift, L.U. Wageningen.
- Wijnberg, H. (1988). The chemistry of α -terthienyl. In: *Chemistry and biology of naturally-occurring acetylenes and related compounds*. (eds. J. Lam, H. Breteler, T. Arnason & L. Hansen). Elsevier, Amsterdam, 21-28.