Zeitschrift: Botanica Helvetica

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 99 (1989)

Heft: 2

Artikel: Auswirkungen niedriger Temperaturen auf die Fettsäurezusammensetzung der Kalluskulturen von Cichorium endivia L. und Lactuca sativa L.

Autor: Henzi, Thomas / Voland, Jacques / Brändle, Roland

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-69137

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 14.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Botanica Helvetica 99/2, 1989

0253-1453/89/020189-07 $ 1.50 + 0.20/0
© 1989 Birkhäuser Verlag, Basel

Auswirkungen niedriger Temperaturen auf die Fettsäurezusammensetzung der Kalluskulturen von *Cichorium endivia* L. und *Lactuca sativa* L.

Thomas Henzi, Jacques Voland und Roland Brändle

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern, Altenbergrain 21, CH-3013 Bern, Schweiz

Manuskript angenommen am 29. August 1989

Abstract

Henzi T., Voland J., and Brändle R. (1989). Effects of low temperature on the fatty acid composition of callus cultures of *Cichorium endivia* L. and *Lactuca sativa* L. Bot. Helv. 99: 189–195.

The fatty acid composition of callus cultures of salad vegetables differing in chilling-sensitivity was analysed. A growth temperature of 12 °C (8 h)/4 °C (16 h) increases the content of unsaturated linolenic acid and therefore the degree of lipid desaturation in *Cichorium endivia* L. var. "Prima Rossa". This increased desaturation can be demonstrated in the total lipid extract, in triglycerides, in phospholipids and in mitochondrial lipids. The low temperature induced changes are reversible. Callus tissue returned to 25 °C after a period of low temperature treatment shows a fatty acid composition similar to the original. The chilling-resistent *Lactuca sativa* L. var. "Arctic King" has a high content of polyunsaturated fatty acids even at 25 °C which is unchanged at low growth temperature.

Key words: Callus culture, *Cichorium endivia* L., chilling, fatty acids, lipids, *Lactuca sativa* L.

Einleitung

Pflanzen aus kälteren Regionen weisen einen vergleichsweise höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren auf als Arten der Subtropen und Tropen (Lyons 1973). Hohe Gehalte an ungesättigten Fettsäuren in den Membranlipiden scheinen notwendig, um den flüssig-kristallinen Zustand und damit die Fluidität und letztlich die Funktionstüchtigkeit einer Membran oder eines Membranareals bei tiefen Umgebungstemperaturen aufrecht zu erhalten (Christiansen 1984, Kuiper 1985). Eine wichtige Rolle kommt dabei der dreifach ungesättigten Linolensäure zu. St. John und Christiansen (1976) zeigten, daß bei Baumwollsetzlingen, die niedrigen Temperaturen ausgesetzt wurden, der Gehalt an Linolensäure in den polaren Lipiden stark zunahm. Gleichzeitig nahm auch die Erkältungs- oder „Chilling"-Resistenz zu. Ein spezifischer Hemmer der Linolensäuresynthese (Sandoz 9785) verhinderte nicht bloß die kälteinduzierte Linolensäurezu-

nahme, sondern auch die „Chilling"-Resistenz. Genetisch bedingte Unterschiede im Linolensäuregehalt stellten Horvath et al. (1983) bei verschiedenen Gurkengenotypen fest. Die „chilling"-resistenten Sorten wiesen höhere Linolensäuregehalte in den Phospholipiden auf als die sensitiven Genotypen. Williams et al. (1988) wiesen nach, daß die verstärkte Desaturierung nicht auf bestimmte Lipide beschränkt ist. Alle wichtigen Blattlipide von *Brassica napus* waren nach Inkubation bei niedriger Temperatur stärker desaturiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fettsäuremuster zweier unterschiedlich „chilling"-resistenter Salatpflanzen untersucht. Bei der resistenten Art handelte es sich um *Lactuca sativa* L. var. „Arctic King", welche in Schottland angepflanzt wird. Daneben wurde das Fettsäuremuster von *Cichorium endivia* L. var. „Prima Rossa" analysiert. Diese Pflanze wächst im Treibhaus unterhalb von 10 °C nur wenig. Von beiden Pflanzen wurden Kalluskulturen herangezogen. Es ist bekannt, daß Kallusgewebe höhere Mutationsraten aufweisen als ausdifferenzierte pflanzliche Gewebe. Es bestand daher die Hoffnung, mutierte Kalli mit höherem Desaturierungsgrad zu finden. Regenerate, welche leicht zu induzieren sind, könnten „chilling"-resistenter sein.

Kalluskulturen der beiden Arten, welche bei Temperaturen zwischen 4 °C und 12 °C wuchsen, wurden bezüglich der Fettsäurezusammensetzung des gesamten Lipidextraktes, der Triglyceridfraktion, einiger Phospholipide sowie der Mitochondrienlipide verglichen. Die Resultate werden im Hinblick auf die unterschiedliche „Chilling"-Resistenz diskutiert.

Material und Methoden

Oberflächensterilisierte Samen von *Cichorium endivia* L. var. „Prima Rossa" und *Lactuca sativa* L. var. „Arctic King" wurden auf agarhaltigem (10 g/l) Nährmedium zum Keimen gebracht. Das Keimungsmedium enthielt neben den Mikro- und Makroelementen (Murashige und Skoog 1962) zusätzlich Saccharose (30 g/l), Glycin (2 mg/l), Thiamin (0,1 mg/l), Pyridoxal (0,5 mg/l), Niacin (0,5 mg/l) und Meso-Inosit (100 mg/l). Nach 5 Wochen wurden Blätter und Stengel der Pflänzchen in einer Sterilbank mit einem Skalpell in kleine Stücke zerlegt. Diese wurden zur Induktion des Kalluswachstums auf neue Petrischalen überführt. Das Kallusmedium enthielt neben den Substanzen des Keimungsmediums die synthetischen Hormone 2-Naphthylessigsäure (1 mg/l) und 2-4-Dichlor-phenoxyessigsäure (0,5 mg/l).

Die Kulturen wurden im Dauerdunkel bei 25 °C und 75% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Zur Kältebehandlung brachte man die Kalli in einen Kulturschrank (Küleg, Bern). Die Temperatur betrug 12 °C während 8 h und 4 °C während 16 h, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75%. Die Kulturen wurden ebenfalls vor Licht geschützt. Nach einer Kultivierungsdauer von 30–120 Tagen, während der sich die Fettsäurezusammensetzung der Kontrollkalli nicht merkbar änderte, und mehrfacher Übertragung auf frisches Medium wurden die herangewachsenen Kalli von den Schalen genommen und auf ihre Fettsäurezusammensetzung hin untersucht.

Die Lipidextraktion erfolgte nach Bligh und Dyer (1959). Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels (Chloroform-Methanol) wurden die extrahierten Lipide in 0,5 ml Chloroform aufgenommen und zur Methanolyse in verschraubbare Reaktionsgefäße überführt oder vorher mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60, Merck) aufgetrennt. Die Phospholipide wurden dabei mit Chloroform-Methanol-H_2O (65:25:4) abgetrennt, die Triglyceride mit Petroläther-Diäthyläther-Essigsäure (90:60:1).

Zur Abspaltung und Methylierung der Fettsäuren wurde Bortrifluorid verwendet (Morrison und Smith 1964). Die Fettsäuremethylester wurden anschließend mit Pentan extrahiert und dünnschichtchromatographisch (Kieselgel 60, Merck) vorgereinigt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Petroläther-Diäthyläther (9:1). Die Methylester wurden von den Platten abgekratzt und mit Petroläther-Diäthyläther (1:1) eluiert.

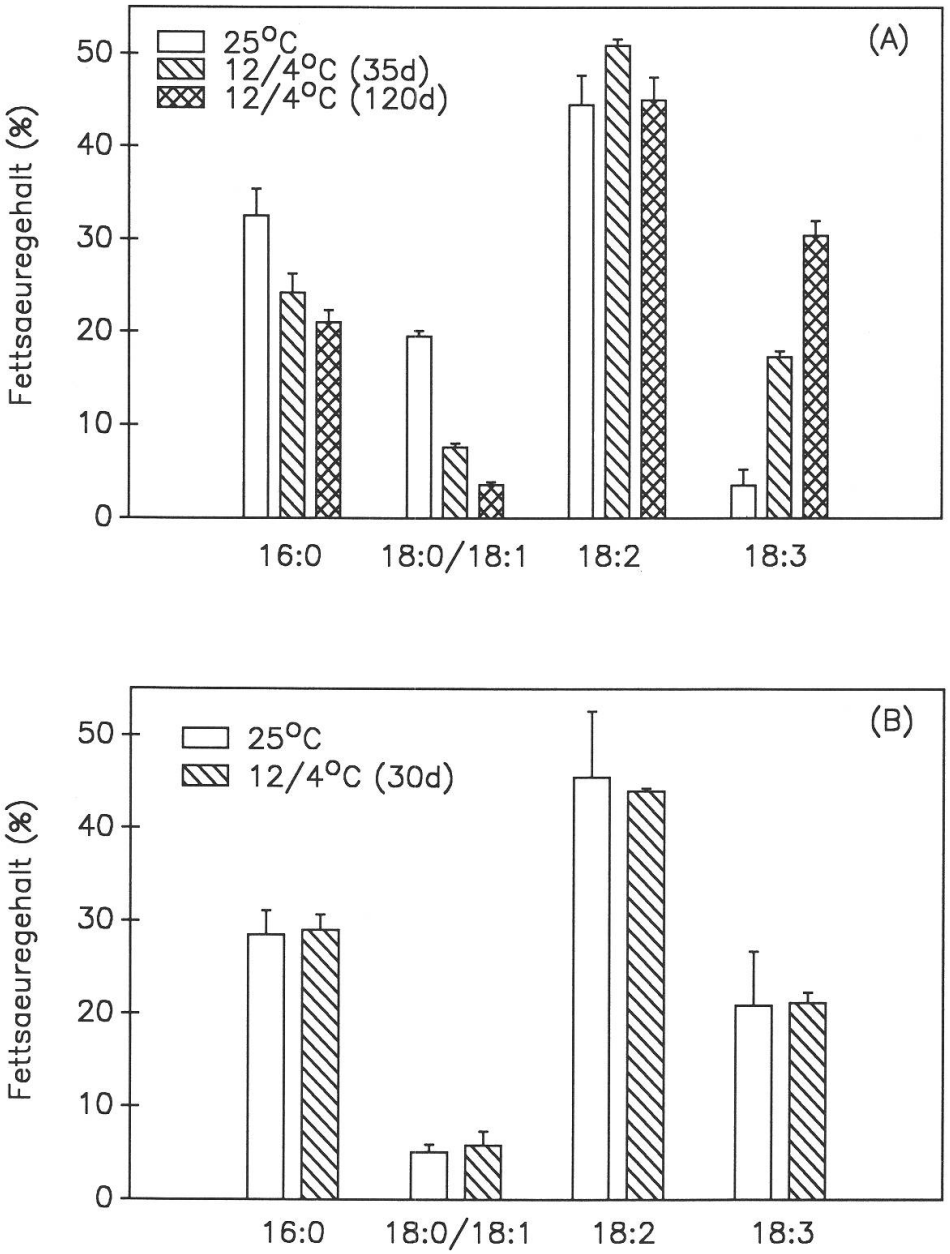
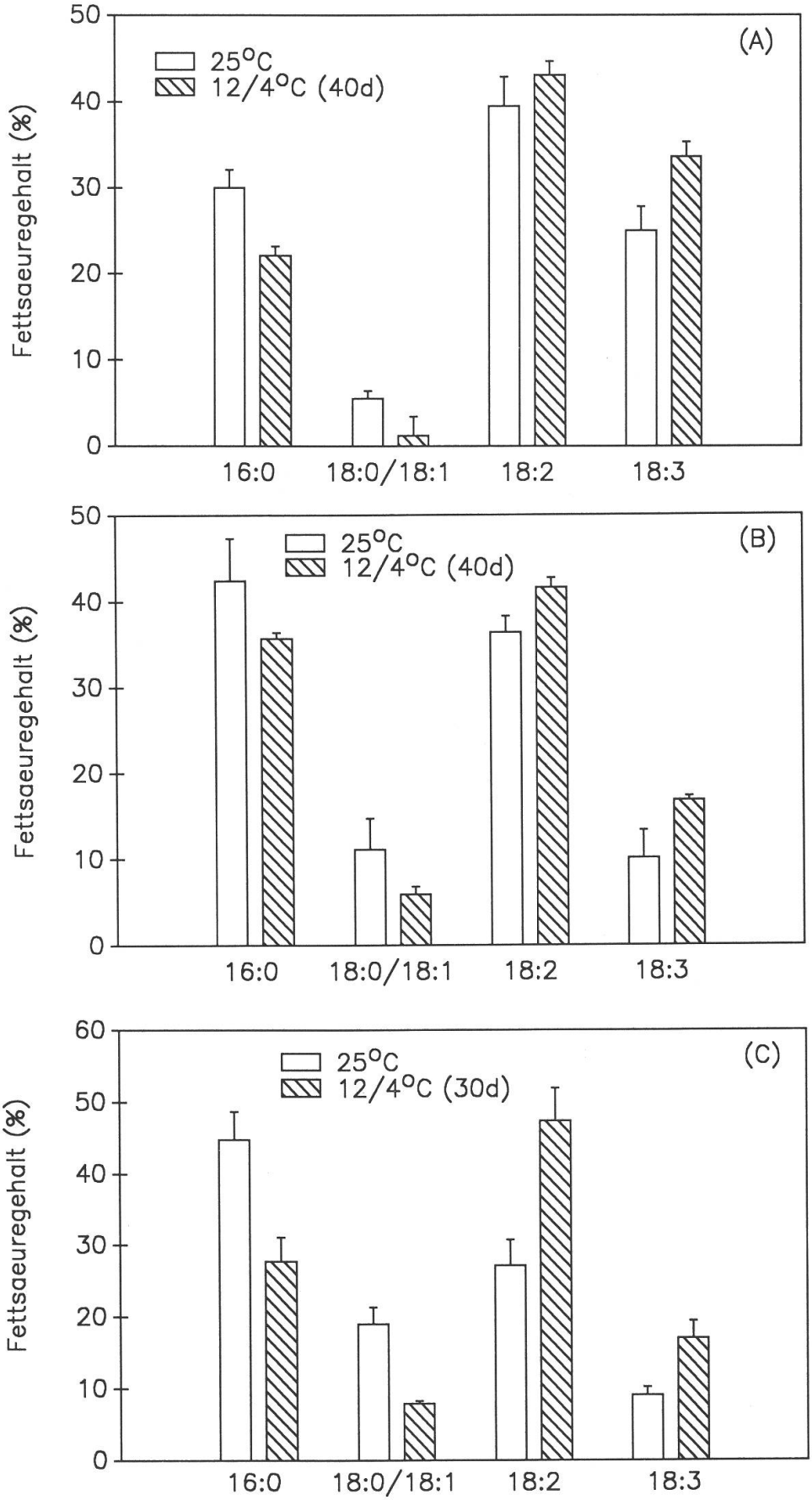


Abb. 1. Fettsäurezusammensetzung von Kalluskulturen von *C. endivia* var. „Prima Rossa" (A, nach 35 d resp. 120 d Kältebehandlung) und *L. sativa* var. „Arctic King" (B, nach 30 d Kältebehandlung), n = 6 Experimente ± S.D. Es bedeuten: 16:0 = Palmitinsäure, 18:0 = Stearinsäure, 18:1 = Ölsäure, 18:2 = Linolsäure, 18:3 = Linolensäure.

Die Mitochondrien wurden nach der Methode von Day und Hanson (1977) isoliert. Die Extraktion der Mitochondrienlipide und deren Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

Die Fettsäurezusammensetzung wurde gaschromatographisch (Sigma 300 Dual FID, Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, USA) analysiert. Genau 0,5 µl Probelösung wurden dazu auf eine mit 10% DEGS gepackte Stahlsäule aufgetragen. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Flußrate von 30 ml/min. Die Säulentemperatur betrug 200 °C, der Injector und der Detector waren auf 220 °C aufgeheizt. Der Gaschromatograph war mit einem Integrator (LCI-100, Perkin-Elmer) ausgerüstet, welcher die Flächenprozente der Fettsäuremethylester-Peaks berechnete.


(A)
25°C
12/4°C (40d)
Fettsaeuregehalt (%)
0
10
20
30
40
50
16:0
18:0/18:1
18:2
18:3
(B)
25°C
12/4°C (40d)
Fettsaeuregehalt (%)
0
10
20
30
40
50
16:0
18:0/18:1
18:2
18:3
(C)
25°C
12/4°C (30d)
Fettsaeuregehalt (%)
0
10
20
30
40
50
60
16:0
18:0/18:1
18:2
18:3

Resultate

Die Inkubation bei niedriger Temperatur verlangsamte das Wachstum der Kalluskulturen von *C. endivia* deutlich. Eine Übertragung auf neues Medium war erst nach etwa 8 Wochen nötig, während die Kontrollkulturen bereits nach etwa 4 Wochen überimpft wurden. Bei Kulturen von *L. sativa* ergab sich kaum ein Unterschied im Wachstum. Abb. 1 A zeigt die Fettsäurezusammensetzung von Kallusgewebe von *C. endivia* nach mehrwöchiger Kältebehandlung. Die Linolsäure macht bei allen Behandlungen den Hauptanteil der Fettsäuren aus. Die 35tägige Kältebehandlung führt zu einer signifikanten Zunahme des Linolensäuregehaltes. Anderseits läßt sich eine deutliche Abnahme an gesättigten resp. einfach ungesättigten Fettsäuren feststellen. Bei längerdauernder Kältebehandlung (120 Tage) wird der Linolensäuregehalt weiter erhöht, wieder auf Kosten der gesättigten resp. einfach ungesättigten Fettsäuren.

Auch bei der „chilling"-resistenten Art, *L. sativa* var. „Arctic King", dominiert die Linolsäure (Abb. 1 B). Ihr Anteil beträgt etwa 45%. Im Unterschied zu *C. endivia* ist aber auch bei 25 °C der Gehalt an Linolensäure mit über 20% beträchtlich. Eine 30tägige Kältebehandlung bewirkt keinerlei Veränderungen im Fettsäuremuster. Die prozentualen Gehalte an allen untersuchten Fettsäuren bleiben konstant.

Abb. 2 A und 2 B zeigen das Fettsäuremuster von *C. endivia* nach Auftrennung der Kalluslipide in verschiedene Lipidfraktionen. Abb. 2 A gibt die Verhältnisse in der Triglyceridfraktion wieder, während in Abb. 2 B das Fettsäuremuster dreier nicht näher identifizierter Phospholipide dargestellt ist. Beide Fraktionen zeigen dieselben Veränderungen, die bereits im Gesamtlipidextrakt von *C. endivia* feststellbar waren. Die Anteile der gesättigten Fettsäuren gehen zurück, während diejenigen der ungesättigten zunehmen.

Abb. 2 C enthält die Fettsäurezusammensetzung von Mitochondrienlipiden aus Kalluskulturen von *C. endivia* nach 30 Tagen Kältebehandlung. Auch hier wird, durch Zunahme der Gehalte an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, eine markante Erhöhung des Desaturierungsgrades erreicht.

In einem weiteren Versuch wurden kältebehandelte Kalluskulturen von *C. endivia* (40 Tage) wieder auf 25 °C Wachstumstemperatur (40 Tage) überführt. Wie in Abb. 3 dargestellt, scheint sich allmählich wieder das für 25 °C typische Fettsäuremuster einzustellen. Die Palmitinsäure hat den Ausgangswert wieder erreicht. Der während der Kältebehandlung stark erhöhte Gehalt an Linolensäure ist deutlich abgesunken. Die Gehalte an Linol- und Stearinsäure hingegen unterscheiden sich noch geringfügig vom Kontrollwert. Der Linolsäuregehalt bleibt trotz der Überführung auf 25 °C leicht unter dem Kontrollwert, während der Stearinsäuregehalt noch etwas erhöht ist.

Diskussion

Die Kalluskulturen der beiden untersuchten Salatpflanzen zeigen bei 25 °C Wachstumstemperatur deutliche Unterschiede im Fettsäuremuster. Der Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren beträgt bei *L. sativa* var. „Arctic King" etwa 64% bei *C. endivia* var. „Prima Rossa" lediglich 48%. Der Grad der Desaturierung der Lipide scheint also

Abb. 2. Fettsäurezusammensetzung der Triglyceride (A, nach 40 d Kältebehandlung), der Phospholipide (B, nach 40 d Kältebehandlung) und der Mitochondrienlipide (C, nach 30 d Kältebehandlung) von Kalluskulturen von *C. endivia* var. „Prima Rossa", n = 5 Experimente ± S.D.

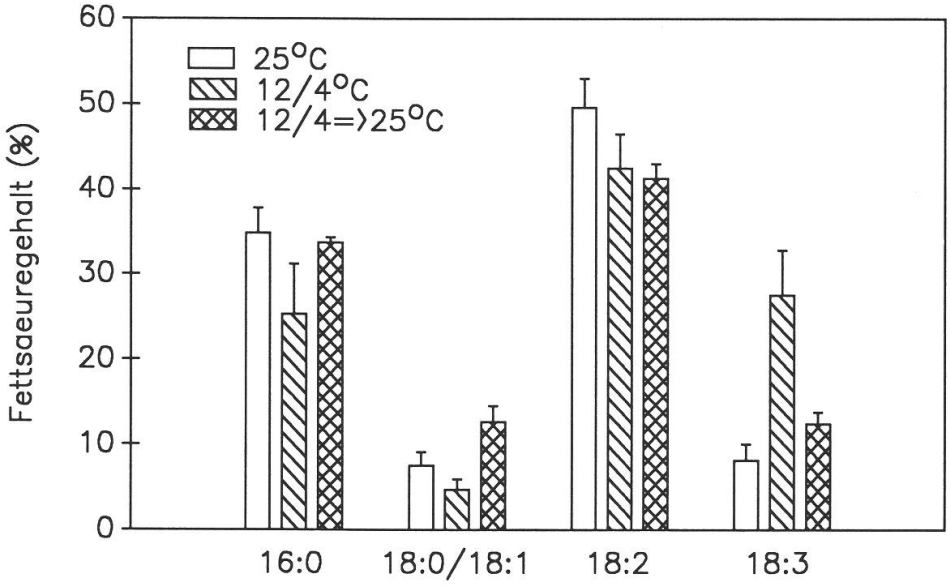


Abb. 3. Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung von Kalluskulturen von *C. endivia* var. „Prima Rossa" nach Kältebehandlung (40 d) und anschließender Inkubation bei 25 °C (40 d), n = 5 Experimente ± S.D.

mit der „Chilling"-Resistenz korreliert zu sein. Graham und Patterson (1982) weisen aber darauf hin, daß diese Korrelation nicht immer gilt. Die Desaturierung könnte nur eine Vorbedingung für die Ausbildung einer „Chilling"-Resistenz sein (Christiansen 1984).

Die „Chilling"-Temperaturen bewirken unterschiedliche Reaktionen bei den beiden Arten. *L. sativa,* mit der ohnehin hohen Desaturierung, beläßt die Fettsäurezusammensetzung unverändert. Dies gilt nicht nur für den Gesamtlipidextrakt (vgl. Abb. 1 B), sondern auch für die Phospholipid- und die Triglyceridfraktion sowie für die Mitochondrienlipide (Resultate nicht dargestellt). *C. endivia* hingegen erhöht den Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren als Reaktion auf den Temperaturstress. Die „Chilling"-Temperatur fördert offensichtlich die Desaturierung der Lipide. Damit kann die Membran bei tiefen Temperaturen funktionstüchtig bleiben (Mazliak 1981). Es gilt aber zu beachten, daß der Großteil der Membranlipide kaum einen Phasenübergang vollzieht, da die meisten pflanzlichen Fettsäuren ohnehin stark desaturiert sind. Es kommen allenfalls einzelne, stark gesättigte Lipidareale in Frage (Bishop 1986). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Rolle des Phosphatidylglycerols (Murata 1983, Norman et al. 1984), ein Lipid mit hohen Gehalten an gesättigten Fettsäuren. Man glaubt, daß sich „chilling"-sensitive Pflanzen durch hohe Gehalte an gesättigten Phosphatidylglycerolspezies auszeichnen.

Wie die Erhöhung des Desaturierungsgrades der Fettsäuren zeigt, ist *C. endivia* bloß zu einer Akklimatisation an niedrige Temperaturen fähig. Das Ziel, eine Mutante mit höherer Lipiddesaturierung und damit besserer „Chilling"-Resistenz zu selektionieren, wurde nicht erreicht. Keine der untersuchten Kalluskulturen von *C. endivia* enthielt im Anschluß an die Kältebehandlung einen permanent höheren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, was als genetische Anpassung gedeutet werden könnte. Als nitratarme Wintersalate, die ohne Gewächshausbeheizung auskommen, verfügen wir vorderhand nur über bittere Sorten, wie *L. sativa* var. „Arctic King".

Literatur

Bishop D. G. 1986. Chilling sensitivity in higher plants: the role of phosphatidylglycerol. Plant, Cell and Environment 9: 613–616.

Bligh E. G. and Dyer W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911–917.

Christiansen M. N. 1984. Temperature stress and membrane lipid modification. In: Recent Advances in Phytochemistry: Phytochemical adaptions to stress. Timmermann B. N., Steelink C. and Loewus F. A. eds. Plenum Press, New York and London. Vol. 18: 177–195.

Day D. A. and Hanson J. B. 1977. On methods for the isolation of mitochondria from etiolated corn shoots. Plant Science Letters 11: 99–104

Graham D. and Patterson D. B. 1982. Responses of plants to low, non-freezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation. Ann. Rev. Plant Physiol. 33: 347–372.

Horvath I., Vigh L., van Hasselt Ph. R., Woltjes J. and Kuiper P. J. C. 1983. Lipid composition in leaves of cucumber genotypes as affected by different temperature regimes and grafting. Physiol. Plant. 57: 532–536.

Kuiper P. J. C. 1985. Environmental changes and lipid metabolism of higher plants. Physiol. Plant. 64: 118–122.

Lyons J. M. 1973. Chilling injury in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 445–466.

Mazliak P. 1981. Régulation à court terme et à long terme de l'activité des enzymes membranaires par la température. Physiol. Vég. 19: 534–563.

Morrison W. R. and Smith L. M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron trifluoride methanol. J. Lipid Res. 5: 600–608.

Murashige T. and Skoog F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473–497.

Murata N. 1983. Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. Plant & Cell Physiol. 24: 81–86.

Norman H. A., McMillan C. and Thompson G. A. 1984. Phosphatidylglycerol molecular species in chilling-sensitive and chilling-resistant populations of *Avicennia germinans* L. Plant & Cell Physiol. 25: 1437–1444.

St. John J. and Christiansen M. N. 1976. Inhibition of linolenic acid synthesis and modification of chilling resistance in cotton seedlings. Plant. Physiol. 57: 257–259.

Williams J. P., Khan M. U., Mitchell K. and Johnson G. 1988. The effect of temperature on the level and biosynthesis of unsaturated fatty acids in diacylglycerols of *Brassica napus* leaves. Plant Physiol. 87: 904–910.