

ZUNAHME VON CYTOKININ UND AUXIN IN VERWUNDETEM SPEICHERGEWEBE VON *SOLANUM TUBEROSUM*

KLAUS CONRAD und BRIGITTE KÖHN

Sektion Biologie der Universität Greifswald, DDR

(Eingegangen 23 Juli 1974)

Key Word Index—*Solanum tuberosum*; Solanaceae; potato; cytokinins; *Amaranthus* bioassay; tRNA; auxins; wound hormones; cell division.

Abstract—“Butanol-soluble” cytokinins increase in grated and in lighted cut potato tissue. In slices, an increase of “water soluble” cytokinins (darkness) and of tRNA-cytokinins can be found. Together with auxin, the cytokinin factor stimulates cell division in wound tissue.

EINLEITUNG

Angeregt durch Arbeiten von Rosenstock und Lange [1], in denen Hydraturveränderungen eine dominierende Rolle bei der Auslösung von Wundheilungsprozessen beigemessen wird, befaßten wir uns mit der Frage, ob auch Phytohormone am Vernarbungsgeschehen ursächlich beteiligt sind. Während wir als Hauptstudienobjekt die Kohlrabiknolle benutzten [2–5], soll hier über Untersuchungen an Kartoffeln berichtet werden. Kartoffelparenchym war ebenso wie Kohlrabigewebe Gegenstand der klassischen Arbeiten Haberlands über zellteilungsauslösende Hormone [6,7], zudem steht es im Zentrum der Untersuchungen von Rosenstock und Mitarb. Wir beschränkten uns bei unseren Bemühungen fast ganz auf die Phytohormongruppe Cytokinine, die bereits von ihren Entdeckern in einem gewissen Zusammenhang zur Haberlandschen Zellteilungshormonkonzeption gesehen wurde [8]. Dabei interessierte uns, ob und auf welche Weise beim Verwunden von Kartoffelknollen Cytokinine entstehen und ob die Wundperidermbildung durch Cytokiningaben gefördert wird. Außerdem führten wir einige Versuche zur Beteiligung des Auxinfaktors durch.

ERGEBNISSE

Zunahme an “butanollöslichem” Cytokinin nach Zerreiben des Gewebes

Nach Haberlandt [7] sollen in Zellen, die beim Zerschneiden der Knolle zerstört worden sind, Wundhormone entstehen, die in die benachbarten intakt gebliebenen Zellen gelangen und dort Cytokinesen auslösen. Dieser Vorstellung entsprechend, verglichen wir zunächst den Cytokiningehalt von Gewebeprei mit dem von “intakten” geschälten Knollenhälften. Der Brei wurde mit einer Plastereibe hergestellt und 24 hr im Dunkeln inkubiert. Wir extrahierten die Cytokinine mit 70%igem Äthanol, überführten sie in rein wäßrige Lösung und schüttelten mit *n*-BuOH aus. Die in der Butanolphase angereicherte (bl.) Cytokininfraktion wurde papierchromatographisch gereinigt, danach erfolgte eine quantitative Auswertung mit Hilfe des *Amaranthus*-Tests.

In den intakten Knollen fanden wir in den ersten Monaten nach der Ernte so gut wie kein Cytokinin, von Januar bis Juni hingegen deutlich nachweisbare Mengen (vgl. [9]). Besonders hoch ist der Gehalt junger, wachsender Knollen (Übereinstimmung mit Okazawa [10]). Es handelt sich hauptsächlich um zwei Cytokinine, die bei Verwendung des Laufmittels EtOAc-PrOH-H₂O die R_f-Positionen 0,5 und 0,9 einnehmen und bei Verwendung von *sec*-BuOH-H₂O im oberen Drittel des Chromatogramms lokalisiert sind.

Abkürzungen: Z = Zeatin, Z-rib = Zeatinribosid, DMA = 6-(γ,γ -Dimethylallylamino)-purin, DMA-rib = DMA-ribosid, IAA = Indol-3-essigsäure, bl. = “butanollöslich”, wl. = “wasserlöslich”, Äqu = Äquivalent, FG = Frischgewicht, int. = intaktes Gewebe, Sch = Scheiben.

Wahrscheinlich sind sie mit Z-rib und mit DMA-rib identisch. Außerdem scheinen Z und DMA vorzukommen.

Nach dem Zerreiben stieg die Cytokininaktivität auf das Mehrfache an (z.B. int.: 4 μg -Kin-Äqu/kg FG, zerrieben: 12, Jan. 1970). Diese Zunahme war auch dann festzustellen, wenn dem Gewebepulver Antibiotica zugesetzt wurden oder wenn wir die Cytokinine durch zweifache PC besser von Hemmstoffen abtrennten.

Anstieg des Cytokiningehaltes nach dem Zerschneiden

Die folgende Versuchsgruppe bezieht sich auf ca 2 cm² große Stücke von 1 bis 2 mm dicken Scheiben, die mit einem Skalpell aus geschälten Kartoffeln hergestellt wurden (kurz: Scheiben). Sie lagerten 48 hr bei natürlicher Beleuchtung (Nordfenster) in feuchten Kammern und entsprachen somit etwa den nicht abgespülten Scheibensektoren Haberlands [7]. Meistens setzten wir die Proben unter sterilen Bedingungen an und sterilisierten die Knollenoberfläche vorher mit Bromwasser. Die Äthanolextrakte wurden mit Hilfe des Kationenaustauschers Wofatit KPS gereinigt, worauf die mit NH₄OH eluierte Cytokininfraktion mittels PC aufgetrennt wurde. Bei Verwendung des Laufmittels EtOAc-PrOH-H₂O erhielten wir sowohl bei den Scheiben als auch beim intakten Material einen größeren (R_f 0,5) und einen kleineren (R_f 0,9) Aktivitätsgipfel. In jedem Falle waren die Peaks bei den Scheiben höher als beim intakten Gewebe (z.B. R_f 0,3–0,6, int.: 1 μg -Z-rib-Äqu/kg FG, Sch: 6/kg Ausgangs-FG, Apr. 73). Wurde *sec*-BuOH-H₂O benutzt, so konzentrierte sich die Cytokininaktivität im oberen Drittel des Chromatogramms, und wieder war die Cytokininausbeute bei den Scheiben größer als bei den Kontrollen. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir, wenn wir unter Verzicht auf den Ionenaustauscher die bl. Cytokininfraktion chromatographierten.

Scheiben, die 12 oder 24 hr im Dunkeln aufbewahrt worden waren und im Gegensatz zu den eben besprochenen noch keine Zellteilungen erkennen ließen, enthielten nicht eindeutig mehr bl. Cytokinin als das Ausgangsgewebe, aber ihr Gehalt an "wasserlöslichen" Cytokinen war nach 12 hr etwas und nach 24 hr beträchtlich angestiegen. Die Hydrolyse der wl. Fraktion mit Kückendarm-

Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) führte zur Freisetzung eines Z-rib-ähnlichen und eines DMA-rib-ähnlichen Cytokinins. Im Febr. 74 maßen wir im Hydrolysat einer Intaktkontrolle 0,2 μg -Z-rib-Äqu + 0,3 μg -DMA-rib-Äqu/kg FG und bei 24 hr gelagerten Scheiben 1,0 + 2,6/kg Ausgangs-FG.

Cytokininvorkommen in der tRNA-Fraktion

Sowohl aus intaktem Material als auch aus Gewebescheibenstücken stellten wir uns mehr oder weniger gereinigte Präparate her, in denen tRNA angereichert war. Sie wurden mit HCl hydrolysiert und danach auf ihren Cytokiningehalt untersucht. Die Histogramme (EtOAc-PrOH-H₂O) zeigten meistens 2 Aktivitätsgipfel, die auf das Vorliegen von Z (auch *cis*-Z?) und DMA hindeuten. Aus 24 hr dunkel aufbewahrten "sterilen" Scheiben (Nov. 1973) gewannen wir z.B. eine Fraktion, die 30 mg RNA pro kg Ausgangs-FG enthielt (int.: 26 mg/kg FG) und aus der 0,05 μg -Z-Äqu + 0,14 μg -DMA-Äqu/kg Ausgangs-FG freigesetzt wurden (int.: etwa ebensoviel). Scheiben, die 48 hr bei natürlicher Beleuchtung aufbewahrt worden waren, besaßen ca 30% mehr RNA-Cytokinin als die Kontrollen (Apr. 1973 und nach der Ernte im Aug. 1973). Bei 3 nicht steril angesetzten Proben (Jan./Febr. 1973) lag dieser Prozentsatz zwischen 80 und 200—auch bei dem Z-ähnlichen Cytokinin. Die Ausbeuten bei den Intaktkontrollen blieben das ganze Jahr über etwa gleich groß.

Einfluß von Zeatin auf die Zellteilung

Ähnlich wie Haberlandt [7] spülten wir etwa 8 mm dicke Kartoffelscheiben 15 min mit einem kräftigen Leitungswasserstrahl ab. Dann zerlegten wir die Scheiben in 4 Quadranten und bestrichen die oberen Flächen zweier Sektoren mit Z-haltiger Lanolinpaste und die der anderen beiden mit Kontrollpaste. Beide Pasten enthielten in den meisten Fällen Zusätze von IAA. Nach 2- bis 7tägigem Aufenthalt in feuchter Kammer im Dunkeln wurden die Zellteilungen ausgezählt. U.a. fanden wir im Dez. 1973 nach 4tägiger Einwirkung einer Z-Konzentration von 10 μg /kg Paste 26% mehr Zellteilungen als bei den Kontrollen (10 μg IAA/kg P., 23 Sektoren-Paare, Kontr.: 4,5 "Zt. pro Lot", $p < 1\%$). Auch 100 und 1000 μg Z/kg P. führten zu signifikanten Förderungen.

Zunahme des Auxingehaltes nach dem Zerreiben

Daß in Kartoffelgewebe nach dem Zerschneiden im Verlaufe weniger hr Auxine gebildet werden, geht schon aus Arbeiten Hembergs hervor [12,13]. Wir ergänzten diese Untersuchungen, indem wir den Auxingehalt von zerriebenem Gewebe bestimmten, das 24 hr in Gegenwart von Antibiotica im Dunkeln aufbewahrt worden war. Mit Hilfe des *Agrostemma*-Tests [14] wiesen wir im Brei z.B. 5 und in der intakten Probe 0,3 μg -IAA-Äqu/kg FG nach (März 70). Die Hauptaktivität ließ sich auf IAA zurückführen, während der von Hemberg beschriebene Indol-3-acetaldehyd im *Agrostemma*-Test weniger in Erscheinung trat.

DISKUSSION

Frühere Hinweise und Nachweise für das Vorkommen von Cytokininen in der Kartoffelknolle finden wir bei mehreren Autoren [9,10,11,15]. Die Zunahme an bl. Cytokinin in zerriebenem Gewebe dürfte nach unseren Erfahrungen mit Kohlrabi [4,5] in erster Linie auf einer Umwandlung von "wasserlöslichem" Cytokinin beruhen. In der wl. Fraktion intakter Kartoffeln liegen zwei Verbindungen (wahrscheinlich 5'-Nucleotide) vor, die durch saure Hydrolyse oder mittels Phosphatase in bl. Cytokinine überführt werden können. Sie kommen nach dem Zerreiben mit in Kartoffeln reichlich vorhandener 5'-Nucleotidase [16] in Berührung und werden zu Nucleosiden umgesetzt. Ein Bruchteil des Zuwachses könnte auch aus dem enzymatischen Abbau von tRNA resultieren. An den Wundflächen der Scheiben spielen sich die gleichen Vorgänge ab wie im Gewebebrei. Vielleicht findet bei Belichtung auch in den unverletzten Gewebeteilen eine Dephosphorylierung von wl. Cytokininen statt, während in den dunkel gehaltenen Scheiben Cytokininnucleotide akkumuliert werden. Bezüglich des Gesamtcytokinidgehaltes kommt es im Dunkeln sicher und im Licht sehr wahrscheinlich zu einer Erhöhung, d.h. zu einer echten Cytokininbiosynthese. Auch bei vielfach übertragenen Kartoffel-Calluskulturen ist eine Cytokininproduktion beobachtet worden, allerdings in Gegenwart von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure [17]. Welche Rolle cytokininhaltige tRNA bei der Cytokininentstehung in Scheiben spielen, bleibt unklar. Der Gehalt an tRNA-

Cytokininen steigt parallel zum tRNA-Gehalt langsam an.

Offenbar haben die Veränderungen im Cytokininhaushalt eine Auswirkung auf die entwicklungsphysiologischen Vorgänge in den Scheiben. Die von uns ermittelte Förderung der Zellteilung durch Z steht in Einklang mit einem großen Teil der Befunde von Autoren, die den Einfluß synthetischer Cytokininpräparate auf die Proliferation von Kartoffelgewebe *in vitro* untersucht haben [15,11]. Es gibt sogar Angaben darüber, daß Extrakte und eine gereinigte Cytokininfraktion aus Kartoffeln die Zellteilung in Kartoffelparenchym stimulieren [15,11]. Wir halten es daher für sicher, daß die aus den zerstörten Zellen stammenden bl. Cytokinine die Teilung der benachbarten intakt gebliebenen Zellen fördern. Die Bedeutung der Dephosphorylierung scheint darin zu liegen, daß Cytokininnucleoside besser aufgenommen werden bzw. die Zellteilung stärker anregen als Nucleotide [18]. Auch das in den unverletzten Zellen neu synthetisierte Cytokinin mag die Teilungsprozesse stimulieren. Mit seiner Existenz lassen sich die Haberlandtschen Wundhormonvorstellungen weniger in Einklang bringen als mit dem Cytokininzugang aus den zerstörten Zellen. Vielleicht ist diese Cytokininautotrophie neben anderen Faktoren ein Grund dafür, daß es Haberlandt bei den meisten Kartoffelsorten nicht gelang, "die Quelle der hypothetischen Wundhormonedurch Abspülen hinreichend zu entfernen" [7].

Ähnlich wie beim Cytokinin mögen die Verhältnisse beim Auxin liegen. Gesichert ist, daß in zerstörten Zellen in relativ kurzer Zeit ziemlich große Auxinmengen gebildet werden. Die fördernde Wirkung von IAA und anderen Auxinen auf die Zellteilung in Kartoffelparenchym wird durch eine Reihe von Literaturangaben [15] und durch eigene Versuchsergebnisse belegt. Außerdem fanden wir, daß das Antiauxin *p*-Chlorphenoxyisobuttersäure (10^{-5} bis 10^{-3} M) die Wundzellteilung drosselt. Zwischen Auxin und Cytokinin besteht ein synergistisches Verhältnis [15].

Zusammenfassend möchten wir den Schluß ziehen, daß Haberlandts Wundhormontheorie für das Objekt Kartoffel keineswegs ganz unzutreffend ist, sondern neben anderen Prinzipien mit zur kausalen Erklärung des Vernarbungsablaufes herangezogen werden kann.

EXPERIMENTELLES

Kartoffelknollen. Im wesentlichen benutzten wir Kartoffeln der Sorten Ora (1970/74), Wis (1972) und Früka (1973/74). Sie wurden im Keller bei 5 bis 15° gelagert. Oft erhöhten wir die Temperatur 1 Woche vor der Verwendung auf 22°.

Inkubationsbedingungen. Sowohl die zerriebenen Proben als auch die zur Analyse oder zur Zellteilungsermittlung bestimmten Scheiben wurden bei 22° aufbewahrt. Die Scheiben lagen auf Objektträgern in Petrischalen von 15 cm ϕ , die unten und oben mit feuchtem Filterpapier ausgekleidet waren.

Antibiotica. 350 μ g Na-Benzylpenicillin, 200 μ g Streptomycinsulfat und 200 μ g Oxytetracyclinhydrochlorid pro g Gewebestück.

Extraktion und Reinigung der Cytokinine. 50-bis-70-g-Proben wurden nach einer früher angegebenen Vorschrift [5] so aufgearbeitet, daß eine wl. und eine bl. Fraktion resultierten.

Hydrolyse der Nucleotidfraktion. Wie für andere Objekte beschrieben [5], wurde die wl. Fraktion mit Phosphatase oder mit N HCl behandelt. Die entstandenen Cytokininnucleoside oder-basen extrahierten wir mit *n*-BuOH.

Reinigung an Wofatit KPS. Ausführung nach den Angaben bei Engelbrecht [19]. Die in der Kartoffel vorkommenden Cytokininnucleotide werden dabei nur unvollständig erfaßt.

PC. Aufsteigend. EtOAc-*PrOH*- H_2O (4:1:2, oben), EtOAc- $HCOOH$, 85% H_2O (100:10:58, oben), wassergesättigtes *sec*-BuOH. Danach 2tägiges Trocknen an der Luft. Für Auxine: *iso-PrOH*- NH_3 , 35% H_2O (10:1:1).

Anreicherung von tRNA [20–22]. Wir gingen aus von 150–400 g FG. Pro 100 g FG: Homogenisieren mit 150 ml 0,2 oder 0,01 M Tris-HCl pH 8,5 oder 7,5 unter Zusatz von 380 mg 8-Oxycholin, 15 mg Bentonit und 380 mg Isoascorbinsäure oder 120 mg $Na_2S_2O_5$ und oft auch von 380 mg Na-Dodecylsulfat. Rühren mit 150 ml PhOH, puffergesättigt. Ein- oder zweimaliges Wiederholen der Phenolisierung. Fällung von NaRNA mit 3 Vol. EtOH. Gewinnen des in 3 M NaOAc oder NaCl löslichen Anteils. Fällung mit EtOH. Z.T. Reinigung über DEAE-Cellulose mit anschließender EtOH-Fällung. Z.T. Reinigung mit Cetyltrimethylammoniumbromid und 2-Methoxyäthanol. Spektralphotometrische Gehaltsbestimmung.

Hydrolyse der tRNA. Es wurde 1 hr bei 100° am Rückflußkühler mit 0,2 [23] oder 1,0 N HCl hydrolysiert. Danach Ausschütteln der Cytokinine mit EtOAc oder *n*-BuOH.

Amaranthus-Test. Die zerkleinerten Chromatogrammenteile kochten wir 30 min in Testagar. Der 1965 zusammen mit Köhler entwickelte Test [24] wurde 1969 [25] und 1970 (ohne KNO_3 [26]) in variiert Form ohne Belichtung angewendet. 1973/1974 arbeiteten wir mit den sensibilisierten Varianten AT 74a und AT 74b [27].

Ermittlung von Zellteilungen. Der pH-Wert der Phytohormonlösungen, aus denen die Pasten hergestellt wurden (5 ml: 5 g *Cera Lanac*), war auf 6,3 eingestellt. Nach der Inkubation fertigten wir senkrecht zur behandelten Oberfläche aus jedem Sektor 3 Handschnitte an, die nur bis zu einer Tiefe von ca 4 mm reichten. Bei jedem Schnitt zählten wir entlang dreier von der Wundlinie aus gedachter Lotlinien die neu gebildeten \pm waagerechten Zellwände. Das Mittel der 9 Zahlen wurde mit dem Ausdruck Zellteilungen pro Lot pro Sektor bezeichnet und als Einzelwert für statistische Berechnungen verwendet. Der Unterschied zwischen den Gruppen "Z" und "Kontrolle" wurde mit dem *t*-Test für gepaarte Werte geprüft.

Extraktion und Reinigung der Auxine. Wir extrahierten 60-g-Proben mit 350 ml EtOH, 90%. Nach dem Abdampfen des

Lösungsmittels im Vakuum und nach Wiederaufnahme mit H_2O schüttelten wir die Auxine bei pH 3,0 mit 3 Portionen Et_2O aus und trennten sie mit Hilfe der PC.

Agrostemma-Test. Das Verfahren wurde nach der Originalvorschrift von Borris¹⁴ ausgeführt. Die Eluate der Chromatogrammschnitte wurden so verdünnt, daß auf 1 Testschälchen 0,3–1,2 g-FG-Äqu entfielen.

Anerkennungen.—Frau G. Adam, Frl. G. Kretschmer und Frl. C. Stelter danken wir für die sorgfältige Durchführung eines großen Teils der Versuche.

LITERATUR

1. Lange, H. and Rosenstock, G. (1963) *Beitr. Biol. Pflanzen* **39**, 383.
2. Conrad, K. (1968) *Biologische Rundschau*, Fischer-Verlag Jena **6**, 272.
3. Conrad, K. und Westphal, N. (1970) *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. N.m-p., Z.* **23**, *Biol.* **XIII**, 19.
4. Conrad, K. (1971) *Biol. Rdsch.* **9**, 337.
5. Conrad, K. (1972) *Fiziol. Rast.* **19**, 517.
6. Haberlandt, G. (1913) *Sitzungsber. Preuß. Akad. Wiss., Phys.-Math. Kl.* **1**, 318.
7. Haberlandt, G. (1921) *Beitr. Allg. Bot.* **2**, 1.
8. Strong, F. M. (1958) *Topics in Microbial Chemistry*, p. 98. Wiley, New York.
9. Engelbrecht, L. und Bielińska-Czarnecka, M. (1972) *Biochem. Physiol. Pflanzen* **163**, 499.
10. Okazawa, Y. (1970) *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* **39**, 171.
11. Okazawa, Y. (1969) *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* **38**, 25.
12. Hemberg, T. (1943) *Arkiv Bot.* **30**, B, Nr. 7.
13. Hemberg, T. (1944) *Svenska Bot. Tidskr.* **38**, 428.
14. Borris, H. (1956) in *Praktikum der Biochemie der Pflanzen* (Beloserski, N. N. und Proskurjakow, N. I. eds.), p. 404. VEB Deutsch. Verl. Wiss., Berlin.
15. Tizio, R. (1966) *C.R. Acad. Sci., Paris* **262D**, 868.
16. Heppel, L. A. und Hilmo, W. R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **188**, 665.
17. Antis, P. J. P. und Northcote, D. H. (1973) *J. Exp. Botany* **24**, 425.
18. van Staden, J. (1973) *Physiol. Plant.* **29**, 137.
19. Engelbrecht, L. (1971) *Biochem. Physiol. Pflanzen* **162**, 9.
20. Burrows, W. J., Armstrong, D. J., Kaminck, M., Skoog, F., Bock, R. M., Hecht, S. M., Dammann, L. G., Leonard, N. J. und Occolowitz, J. (1970) *Biochemistry* **9**, 1867.
21. Korableva, N. P., Baišev, K. S., Karavaeva, K. A. und Metlickij, L. V. (1970) *Prikladn. Biochim. Mikrobiol.* **6**, 532.
22. Jeannin, G., Melet, D. und Kovoov, A. (1972) *J. Exp. Botany* **23**, 863.
23. Klämbt, D. und Kovoov, A. (1969) *Physiol. Plant.* **22**, 453.
24. Köhler, K.-H. und Conrad, K. (1966) *Biologische Rundschau*, Fischer-Verlag Jena **4**, 36.
25. Köhler, K.-H. und Conrad, K. (1968) *Flora* **159A**, 293.
26. Conrad, K. und Köhler, K.-H. (1967) *Wissenschaftliche Zeitschrift der Universität Rostock, Math.-Nat. Reihe* **16**, 657.
27. Conrad, K. (1974) *Biochem. Physiol. Pflanzen*, Fischer-Verlag Jena **165**, 531.