©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

PHYTON

ANNALES REI BOTANICAE

VOL. 19. FASC. 1—2 PAG. 1—140 2. 11. 1978

Phyton (Austria)	Vol. 19	Fasc. 1—2	1—11	2. 11. 1978

Gewebewachstum und isoelektrische Peroxidasemuster bei Tabakgewebekulturen unter dem Einfluß von Cytokinin, verschiedenen Phenylcarbonsäuren und aromatischen Aminosäuren

Von

Waltraud RÜCKER und Julius MARKOTAI*)

Mit 3 Abbildungen

Eingegangen am 15. Juli 1977

Growth and Isoelectric Patterns of Peroxidase in Tissue Cultures of Tobacco under the Influence of Cytokinin, Phenylcarboxylic Acids and Aromatic Amino Acids

Conclusion

The influence of benzylaminopurine and a number of other substances (phenylacetic acid, l-mandelic acid, t-cinnamic acid, l-phenylalanin, l-tyrosine, l-dopa) was examined on various stock cultures of tobacco tissues differing in their sensibility to growth regulators. Growth and isoelectric peroxidase patterns were compared.

Whereas the action of cytokinin in tobacco tissue cultures which are sensitive to growth regulators is manifested by growth inhibition and in tissue cultures less sensitive to growth substances by stimulated growth and

*) Dr. Waltraud RÜCKER und Julius MARKOTAI, Pharmakognostisches Institut der Universität Wien, Währingerstraße 24, A-1090 Wien.

O.Ö. LANDESMUSEUM
BIBLIOTHEK
Inv. Nr. 21P/1978

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

bud formation, the use of the other tested substances shows a very uniform response, e. g. gradual or sudden growth inhibition. From the morphology of the growth inhibited tissue one can assume that only a small auxin effect is involved in the growth and differentiation processes. In the peroxidase isoelectric patterns changes in the bands of the enzyme groups A and B can be observed. They develop independently and indicate different functions of both enzyme groups.

Comparing the growth values with the peroxidase patterns a close correlation between the decrease of the activity of the bands of group A and the inhibition of growth can be established. The increase of the intensity in the bands of group B is independent of tissue growth and tissue differentiation and correlates with the increase of the benzylaminopurine concentration.

The influence of l-mandelic acid and t-cinnamic acid causes changes in the peroxidase patterns similar to those induced by cytokinin. Therefore the cytokinin effect is maybe not only regulated by activating the auxin catabolism but possibly also by the reduction of the auxin effect.

Zusammenfassung

Während Cytokinin bei den wuchsstoffsensitiven Tabakstämmen das Wachstum hemmt, bei einem wuchsstoffresistenten hingegen fördert und zu Knospenbildungen führt, wird der Einfluß der anderen geprüften Substanzen — aromatische Aminosäuren und Phenylcarbonsäuren — von den Geweben einheitlich in Form allmählich oder plötzlich einsetzender Wachstumshemmungen beantwortet. Die beobachtete Morphologie der wachstumsgehemmten Gewebe deutet auf eine geringe Auxinbeteiligung beim Ablauf der Wachstums- und Differenzierungsprozesse hin.

In den isoelektrischen Peroxidasemustern können Aktivitätsveränderungen bei den Zonen der Enzymgruppen im sauren Bereich (Gruppe A und B) eintreten, die unabhängig voneinander verlaufen und somit die unterschiedliche Funktion der beiden Enzymgruppen unterstreichen.

Ein Vergleich der Wachstumswerte mit den Peroxidasemustern zeigt eine Aktivitätsabnahme bei den Zonen der A-Gruppe in enger Korrelation mit dem Wachstumsrückgang. Eine Intensitätszunahme bei den Zonen der Enzymgruppe B geht unabhängig von Gewebeproduktion und Differenzierung mit der Steigerung der applizierten Cytokininkonzentration konform.

Da l-Mandelsäure und t-Zimtsäure, die als Antiauxine gelten, ähnliche Veränderungen im Peroxidasemuster wie Benzylaminopurin auslösen, wird geschlossen, daß der Cytokinineffekt auf die Auxinaktivität über Förderung der Auxinabbausysteme und zusätzlich durch Verringerung der Auxinwirksamkeit reguliert werden könnte.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Einleitung

Die von SKOOG & MILLER 1957 erstmals erkannte hohe Reaktionsfähigkeit der Tabakgewebe auf Wuchsstoffeinflüsse, die sich in der in vitro Kultur in verschiedenen Differenzierungsleistungen äußert, kommt auch in den Peroxidasemustern durch Aktivitätsänderungen der verschiedenen Zonen zum Ausdruck (LEE 1972, RÜCKER & MARKOTAI 1977).

Die morphogenetischen Wuchsstoffeffekte sind durch die Einwirkung anderer Substanzen, die nicht zu den Wuchsstoffen zählen, beeinflußbar (LEE & SKOOG 1965). Durch den Einsatz solcher Stoffkombinationen an geeigneten Gewebekulturen können Zusammenhänge zwischen morphologischen Erscheinungen und Änderungen im Peroxidasemuster erkannt werden, die eventuell zu weiteren Informationen über die Regulation der Wuchsstoffwirkungen führen.

In dieser Arbeit sind Versuche beschrieben, die den Einfluß stoffwechselwirksamer aromatischer Phenylcarbonsäuren und Aminosäuren auf Wachstum, Differenzierung und isoelektrische Peroxidasemuster im Vergleich zu Cytokinineffekten behandeln.

Material und Methode

Für diese Versuche wurden drei Gewebekulturstämme von *Nicotiana tabacum* var. Wisconsin ausgewählt, die alle auf dieselbe Tabakpflanze zurückgehen und beim Versuchsbeginn bereits 2 Jahre in Kultur gewesen waren. Sie wurden in der von MURASHIGE & SKOOG 1962 angegebenen Nährlösung, jedoch bei Zusatz verschiedener Wuchsstoffe, im Dunkeln kultiviert. Je nachdem ob sie in Medien mit Indolessigsäure + Benzylaminopurin (IAA + BAP, Stamm b) oder mit 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D, Stamm a und c) gezüchtet wurden, unterscheiden sich die Kulturen morphologisch sowie in ihrem Wachstumsverhalten und in den isoelektrischen Peroxidasemustern (siehe Abb. 1); Gewebe von Stamm b sind kompakt und wachsen langsamer als Gewebe von den Stämmen a und c, die aus einem lockeren Zellverband bestehen. In den isoelektrischen Peroxidasemustern weisen die vergleichbaren Zonen bei den verschiedenen Stämmen unterschiedliche Aktivitäten auf.

Während der Versuche waren die Kulturen einem 12stündigen Tag-Nacht-Beleuchtungsrhythmus ausgesetzt. Nach wie vor wurde bei einer Temperatur von 22—24° C und in Nährlösungen nach MURASHIGE & SKOOG aber durchwegs mit Wuchsstoffzusätzen von IAA+BAP kultiviert. Die Kulturdauer betrug je nach Wachstumsgeschwindigkeit 3 bis 5 Wochen. Für jeden Versuch wurden 12 bis 24 Kulturen angesetzt.

Die Charakterisierung des Wachstums erfolgte jeweils nach Beendigung eines Versuchs durch Bestimmung der Frisch- und der Trockengewichte der einzelnen Kulturen.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Für die Enzymbestimmung wurden 200 mg des lyophilisierten und gepulverten Gewebes je nach vorhandener Aktivität in 1,5 oder 3,0 ml H_2O aufgenommen, durch Miracloth gepreßt und zentrifugiert. 10 bis 40 μl dieser Säfte verwendeten wir für die Enzymauftrennungen.

Die Enzyme wurden nach der Methode der Dünnschicht-Isoelektrischen Fokusierung (DIEF) in einem pH-Gradienten von pH 3,5 bis pH 10 getrennt und zwar auf Glasplatten (200×200 mm), bedeckt mit einer Gelschicht aus Sephadex G-75 Superfine. Der Peroxidasenachweis erfolgte nach der Abklatschtechnik mit gepuffertem (0,2 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,9) und mit Farbstoffsubstrat (1% o-Dianisidin und Harnstoffperoxid in Methanol) imprägnierten Papier (Whatman Nr. 1) (Radola 1969, Rücker & Radola 1971, Delincee & Radola 1972).

Für die vergleichenden Untersuchungen wurden folgende Substanzen verwendet:

1. Wuchsstoffe:
   BAP 5.10^{-8} g/ml, $5{,}10^{-7}$ g/ml und $5{,}10^{-6}$ g/ml; jeweils kombiniert mit IAA 5.10^{-8} g/ml
2. Phenylcarbonsäuren:
   Phenylessigsäure, l-Mandelsäure, t-Zimtsäure, jeweils in den Konzentrationen 10^{-6} g/ml, 10^{-5} g/ml, 10^{-4} g/ml, 10^{-3}g/ml und bei gleichzeitiger Anwesenheit von IAA+BAP je 5.10^{-8} g/ml.
3. aromatische Aminosäuren:
   l-Phenylalanin, l-Tyrosin (4-Hydroxyphenylalanin), l-Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin), jeweils in den Konzentrationen 10^{-6} g/ml, 10^{-5} g/ml, 10^{-4} g/ml, 10^{-3} g/ml und bei gleichzeitiger Anwesenheit von IAA+BAP je 5.10^{-8} g/ml.

Die unter Punkt 2 und 3 genannten Stoffe wurden im Hinblick auf die Anzahl der OH-Gruppen am Phenylring und den aliphatischen Anteil zwischen Phenylring und COOH-Gruppe ausgewählt.

Ergebnisse

1. Wachstum

Die morphologischen Unterschiede zwischen den Gewebekulturstämmen, bedingt durch die Wuchsstoffverhältnisse im Nährmedium (Abb. 1), sind in den Versuchen weitgehend ausgeglichen. Die Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit werden jedoch von den Geweben auch im Verlauf der Versuche beibehalten; die 2,4 D Stämme (a und c) weisen eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit auf.

In den Tabellen 1—3 sind die von den untersuchten Gewebekulturstämmen in den drei verschiedenen Versuchsreihen (Wuchsstoffe, Phenylcarbonsäuren, Aminosäuren) erreichten Trockengewichte wiedergegeben. Daneben findet man auch die perzentuellen Anteile der Trockengewichte

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

(bezogen auf das Frischgewicht der Kulturen) angeführt, da sie Hinweise auf die Morphologie der Gewebe liefern.

Tabelle 1

Gewebewachstum verschiedener Tabakgewebekulturen der Stämme c, b und a unter dem Einfluß von IAA 5.10^{-8} g/ml und steigenden BAP Konzentrationen. Kultivierungsdauer bei Stamm a und c 3 Wochen, bei Stamm b 5 Wochen

Gewebekultur-stamm	Konzentrationen BAP					
	5.10^{-8} g/ml		5.10^{-7} g/ml		5.10^{-6} g/ml	
	a mg	b %	a mg	b %	a mg	b %
c	121±20	4,2%	92±18	4,2%	35±12	5,9%
b	120±34	4,2%	133±29	4,3%	105±25	5,2%
a	114±33	3,2%	**		**	

a = mg Trockengewicht pro Kultur
b = % Trockensubstanzanteil pro Kultur
** = konnte aus Materialmangel nicht untersucht werden

Gegenüber Cytokinin sind die Stämme c und b verschieden empfindlich (Tabelle 1); bei Erhöhung der BAP-Konzentration von 5.10^{-8} g/ml auf 5.10^{-7} g/ml und auf 5.10^{-6} g/ml wird bei den Kulturen von Stamm c das Wachstum zunehmend gehemmt, während bei gleicher Behandlung der Gewebe aus Stamm b nur die höchst verwendete BAP-Konzentration über ein allerdings nicht gesichertes Optimum zu geringfügiger Wachstumshemmung führt. Zusätzlich lassen sich hier in den höheren Konzentrationen Knospendifferenzierungen beobachten.

Im Gegensatz dazu steht das ziemlich einheitliche Wachstumsverhalten aller drei Stämme nach Applikation der Phenylcarbonsäuren und der Aminosäuren (Tabelle 2 und 3); Unterschiede zwischen den Stämmen sind ausschließlich in der Verträglichkeit der höchsten verwendeten Konzentration (10^{-3} g/ml) festzustellen, die im Extremfall von allen untersuchten Stoffen für die Gewebe von Stamm b unverträglich war, den Geweben der Stämme c und a hingegen größtenteils noch ein Wachstum ermöglichte. Wachstumsstimulation konnte unter dem Einfluß keiner der geprüften Konzentrationen beobachtet werden, sondern es kommt allmählich oder plötzlich — von einer Konzentration auf die nächste einsetzend — zu Wachstumshemmungen und Zunahme der Trockensubstanzanteile.

Der Vergleich der beobachteten Gewichtszunahmen in den Ansätzen mit den drei verschiedenen Phenylcarbonsäuren zeigt keinen wesentlichen

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 2

Gewebewachstum verschiedener Tabakgewebekulturen der Stämme c, a und b unter dem Einfluß von IAA+BAP je 5.10^{-8} g/ml und verschiedener aromatischer Phenylcarbonsäuren. Kultivierungsdauer bei Stamm a und c 3 Wochen, bei Stamm b 5 Wochen

Gewebe-kultur-stamm	Substanz	Konzentrationen 10^{-6} g/ml a mg	b %	10^{-5} g/ml a mg	b %	10^{-4} g/ml a mg	b %	10^{-3} g/ml a mg	b %
c	Phenylessigsäure	118±20	4,0%	121±26	4,2%	74±15	5,0%	29±15	5,1%
	Mandelsäure	121±28	4,6%	118±21	4,3%	95±19	4,9%	38±13	6,2%
	Zimtsäure	113±19	4,4%	91±25	4,2%	67±27	5,6%	*	
a	Phenylessigsäure	**		117±31	3,8%	91±19	4,5%	*	
	Mandelsäure	**		111±19	3,6%	107±17	4,3%	33±15	6,2%
	Zimtsäure	**		106±20	4,2%	71±13	4,4%	*	
b	Phenylessigsäure	**		124±19	4,2%	115±18	3,7%	*	
	Mandelsäure	**		103±20	4,7%	95±10	5,2%	*	
	Zimtsäure	**		121±12	4,4%	96±21	4,9%	*	

a, b u. ** vgl. Tabelle 1; * = kein Wachstum

Wachstumsunterschied zwischen den Versuchen (Tabelle 2). Innerhalb dieser Stoffklasse ist daher eine Reihung der Substanzen nach Wirkungsintensität nicht möglich, wohingegen es unter dem Einfluß der drei Aminosäuren mit Erhöhung der Konzentration von 10^{-5} g/ml an zu zunehmender Wachstumshemmung und Verstärkung der Wirkungsintensität kommt, und zwar in der Reihenfolge: Phenylalanin < Tyrosin < Dopa. Letzteres wirkt in der stärksten Konzentration sehr toxisch und erwies sich als unverträglich für alle Gewebe. Diese Reihung entspricht der Anzahl der Hydroxylgruppen am Phenylring. Obwohl die Wachstumsunterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen nicht groß und zum Teil im Einzelfall statistisch nicht ausreichend gesichert sind, erscheinen sie durch den Umstand, daß

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

sich die gleiche Reihenfolge der Substanzen bei jeder der untersuchten Konzentrationen wiederholt, real (Tabelle 3).

Tabelle 3

Gewebewachstum verschiedener Tabakgewebekulturen der Stämme c, a und b unter dem Einfluß von IAA+BAP 5.10^{-8} g/ml und verschiedener aromatischer Aminosäuren. Kultivierungsdauer bei Stamm a und c 3 Wochen, bei Stamm b 5 Wochen

Gewebe-kultur-stamm	Substanz	Konzentrationen 10^{-6} g/ml a mg	b %	10^{-5} g/ml a mg	b %	10^{-4} g/ml a mg	b %	10^{-3} g/ml a mg	b %
c	Phenyl-alanin	110±20	4,6%	105±19	4,9%	95±20	4,9%	39±13	5,7%
	Tyrosin	98±26	4,2%	94±33	4,6%	85±35	5,3%	26±16	6,2%
	Dopa	91±20	5,0%	67±19	5,3%	51±20	5,9%	*	
a	Phenyl-alanin	**		114±32	3,5%	93±34	3,3%	66±19	5,3%
	Tyrosin	**		106±21	4,2%	87±37	3,8%	48±18	5,0%
	Dopa	**		86±30	3,9%	63±20	4,6%	*	
b	Phenyl-alanin	**		118±31	4,2%	111±18	4,6%	*	
	Tyrosin	**		120±14	4,5%	90±20	5,9%	*	
	Dopa	**		113±12	4,7%	71±16	5,8%	*	

a, b u. ** vgl. Tabelle 1; * = kein Wachstum.

2. Peroxidasen

Im isoelektrischen Peroxidasemuster der Tabakgewebekulturen lassen sich eine Reihe von Zonen nachweisen (Abb. 1, b), die durch ihr gemeinsames Verhalten nach Einwirkung verschiedener Wuchsstoffe eine Einteilung in drei Gruppen, von uns als Gruppe A, B und C bezeichnet, rechtfertigen. Diese Gruppeneinteilung steht in Übereinstimmung mit jener Einteilung der Isoenzyme, die von anderen Autoren bei Tabakgeweben auf Grund von Wuchsstoffeffekten oder biochemischer Untersuchen festgehalten wurden (Lee 1972, Nessel & Mäder 1977). Wie Abb. 1 (b, a und c) weiterhin zeigt, ergeben die Enzymauftrennungen der drei untersuchten Gewebekulturstämme, bedingt durch die verschiedenen Wuchsstoffeinflüsse, unterschiedliche Peroxidasemuster. Die Enzymgruppen A und B, die im sauren Bereich eng benachbart liegen, weisen bei den unter Einfluß von IAA+BAP gezüchteten Geweben mehrere intensiv ausgeprägte Banden auf (Abb. 1, b). Bei den 2,4 D-Stämmen hingegen sind gut sichtbare

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Banden nur vereinzelt zu beobachten, besonders die Zonen der B-Gruppe des Enzymmusters treten hier sehr schwach oft nur angedeutet in Erscheinung (Abb. 1, a und c).

Die Zonen im basischen Bereich des isoelektrischen Musters (Gruppe C) erweisen sich durchwegs als sehr instabil, sodaß Änderungen nicht mit Sicherheit feststellbar sind. Wir haben uns aus diesem Grunde auf die Beobachtung der Zonen im sauren Bereich beschränkt.

Trotz der großen Unterschiede in den Enzymmustern des Ausgangsmaterials sind die vergleichbaren Peroxidasemuster der verschiedenen Gewebestämme nach Behandlung mit den diversen Substanzen ziemlich einheitlich und durch die Anwesenheit von IAA+BAP im Medium meist jenen des b-Gewebestammes sehr ähnlich (zum Vergleich siehe Abb. 1, b und Abb. 2, Stamm c und b).

Der Einfluß zunehmender Cytokininkonzentrationen bewirkt im Peroxidasemuster Aktivitätsänderungen, die sowohl die Zonen der Enzymgruppe A als auch jene der Gruppe B betreffen (Abb. 2); die Zonen der A-Gruppe verlieren an Aktivität und die Zonen der B-Gruppe nehmen an Aktivität zu. Ein Vergleich der Peroxidasemuster (Abb. 2, Stamm b und c, Konz. 1—3) mit den Wachstumsbefunden (Tabelle 1, Stamm c und b, 5.10^{-8}—5.10^{-6} g/ml BAP) zeigt, daß die Intensitätsabnahme der Zonen der A-Gruppe in Korrelation mit dem Ausmaß des beobachteten Wachstumsrückgang verläuft; nach Einwirkung gleicher BAP-Konzentrationen sind bei den Gewebestämmen c und b, die sich durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Cytokinineinfluß voneinander unterscheiden, auch die einander entsprechenden Zonen verschieden stark ausgeprägt. Eine auffallende Aktivitätsabnahme, bei welcher nicht nur die beiden ersten Zonen im sauren Bereich, sondern auch die dritte Zone dieser Enzymgruppe erfaßt wird, ist nach Einfluß der höchsten verwendeten BAP-Konzentration nur bei den Geweben des cytokininsensitiven c-Stammes, die stark wachstumsgehemmt sind, zu beobachten. Die Intensitätszunahme der Zonen der B-Gruppe hingegen geht mit der Steigerung der eingesetzten BAP-Konzentrationen konform und ist, trotz der unterschiedlichen Wachstumsergebnisse bei beiden Stämmen ziemlich einheitlich und bereits ab 5.10^{-7} g/ml BAP deutlich feststellbar.

Die Behandlung mit 10^{-5} g/ml und 10^{-4} g/ml der untersuchten Phenylcarbonsäuren und Aminosäuren führt bei den Geweben des b-Stammes zu keinen nennenswerten Aktivitätsverschiebungen im Peroxidasemuster im Vergleich zu den Kontrollen, denen nur IAA+BAP im Medium geboten wurden. 10^{-3} g/ml aller untersuchten Substanzen waren für die Gewebe dieses Stammes unverträglich (Tabelle 2 und 3, Stamm b).

Die nach Aminosäurebehandlung bei Stamm a und c auf Grund der Wachstumsbefunde erkannte abgestufte Wirkungsintensität in der Reihenfolge: Phenylalanin $<$ Tyrosin $<$ Dopa läßt sich in den Peroxidasemustern

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

nicht verfolgen. Änderungen im Enzymmuster treten nach Einfluß der höchsten verwendeten Konzentrationen d. h. nur bei den stark im Wachstum gehemmten Geweben auf (Phenylalanin und Tyrosin 10^{-3} g/ml, Dopa 10^{-4} g/ml). Es kommt dabei zu einer Aktivitätsabnahme der Zonen der A-Gruppe, ähnlich den Beobachtungen nach Wachstumshemmung bei den mit BAP behandelten Geweben; die Zonen der B-Gruppe hingegen bleiben bei allen Versuchen nach wie vor nur schwach vertreten.

Die Einwirkung der geprüften Phenylcarbonsäuren führt bei den stark wachstumsgehemmten Geweben von Stamm c und a zu Aktivitätsänderungen im isoelektrischen Peroxidasemuster, die in einigen Fällen große Ähnlichkeit mit den nach Cytokinineinfluß beobachteten Aktivitätsverschiebungen hat. Wie Abb. 3 (Stamm c und a, Konz. 3 oder 4) zeigt, ist nach Behandlung mit Phenylessigsäure, Mandelsäure und Zimtsäure in hohen Konzentrationen, die Aktivität bei den Zonen der A-Gruppe stark reduziert, sodaß die ersten Banden im sauren Bereich schwach ausgeprägt oder gar nicht sichtbar sind und die Intensität der dritten Bande ebenfalls stark verringert sein kann. Die Enzymmuster sind hinsichtlich der B-Gruppe nicht mehr so einheitlich, denn nur unter dem Einfluß von l-Mandelsäure und t-Zimtsäure in hohen Konzentrationen tritt eine der Zonen dieser Gruppe eindeutig stärker hervor. Dieser Effekt, der, wie oben bereits erwähnt, dem Cytokinineinfluß auf die Peroxidasemuster sehr ähnlich ist, wird durch Phenylessigsäure nicht so deutlich ausgelöst.

Besprechung

Die Ergebnisse aus früheren Arbeiten mit Tabakgewebekulturen (Rücker & Markotai 1977), die aufzeigten, daß mit zunehmender BAP-Konzentration in Korrelation mit Änderungen des Wachstums und der Differenzierung bestimmte Aktivitätsverschiebungen im isoelektrischen Peroxidasemuster — im sauren Bereich von den Zonen Enzymgruppe A auf jene der Gruppe B — vor sich gehen, konnten in diesen Versuchen mit verschiedenen Gewebekulturstämmen, die unterschiedliche Wuchsstoffempfindlichkeit aufweisen, bestätigt werden. Wie unsere Befunde weiterhin zeigen, verlaufen die Aktivitätsänderungen bei den Enzymgruppen A und B unabhängig voneinander. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß den beiden Enzymgruppen funktionell verschiedene Bedeutungen für Wachstum und Differenzierung zukommen. Die Enzymauftrennungen der Tabakgewebe nach Behandlung mit den übrigen geprüften Substanzen bestätigen ebenfalls ihre getrennten Funktionen. Auch von anderen Autoren werden diesen beiden Enzymgruppen der Tabakgewebekulturen unterschiedliche Eigenschaften zugeschrieben (Mäder *et al.* 1977).

Durch das Einbeziehen mehrerer Tabakgewebestämme mit unterschiedlicher Wuchsstoffempfindlichkeit in diese vergleichenden Wachs-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

tums- und Peroxidaseuntersuchungen, konnte aus den beobachteten Änderungen des Wachstums und der Enzymmuster eindeutig erkannt werden, daß für die Cytokininwirkung besonders die B-Gruppe im Peroxidase-Isoenzymmuster bedeutsam ist; während die Aktivitätsabnahme bei den Zonen der A-Gruppe in Korrelation mit der Wachstumshemmung verläuft, wird die Aktivität der Zonen der B-Gruppe — wobei regelmäßig eine von ihnen besonders hervorgehoben wird — unabhängig von den Wachstumsergebnissen von der eingesetzten Cytokininkonzentration bestimmt.

Bei den wuchsstoffsensitiven Tabakgewebekulturstämmen a und c (aus 2,4 D-Medien) äußert sich der Cytokinineinfluß in Form zunehmender Wachstumshemmung. Da gleichlaufend damit die Trockensubstanzanteile zunehmen, dürfte der Wachstumsrückgang in erster Linie auf einer Hemmung des Streckungswachstums beruhen, wahrscheinlich als Folge einer vorzeitig einsetzenden Differenzierung und Änderung der Zellwände, sowohl die Wandstärke als auch die chemische Zusammensetzung betreffend, wie es nach Cytokinineinfluß bei verschiedenen Versuchsobjekten erkannt und beschrieben ist (Halperin 1969, Torrey & Fosket 1970, Halmer & Thorpe 1976). Unsere bei den 2,4 D-Stämmen durch Cytokininbehandlung erhaltenen morphologischen Befunde weisen auf eine geringe Auxinbeteiligung beim Ablauf der Wachstums- und Differenzierungsprozesse bei den Tabakgewebekulturen hin. Möglicherweise geschieht dies über Aktivierung der Auxinabbauenzymsysteme, da, wie man annimmt, der wachstumshemmende Einfluß der Cytokinine über Förderung des Auxinabbaus vor sich gehen kann (Gaspar & Xhaufflaire 1967). Der Einfluß wachstumshemmender Konzentrationen von l-Mandelsäure und t-Zimtsäure, denen auf Grund ihrer optischen Konfiguration Antiauxineigenschaften zugeschrieben werden (Audus 1972; diese wurden für die t-Zimtsäure bereits nachgewiesen, Kandeler 1972), läßt in den iseolektrischen Peroxidasemustern Änderungen beobachten, die den durch Cytokinin ausgelösten Änderungen — nämlich deutlich abgeschwächte Farbintensitäten bei den Zonen der A-Gruppe und erhöhte Intensitäten besonders einer Zone der B-Gruppe — ähnlich sind. Diese Einflußnahme der beiden Phenylcarbonsäuren auf die Peroxidasmuster deuten darauf hin, daß zusätzlich zu der Aktivierung der Auxinabbausysteme eine Abnahme der Auxinwirkung unter Cytokinineinwirkung eventuell noch über andere Regulationsmechanismen erreicht wird.

Danksagung

Wir danken Frau Brigitte Grauwald für ihre wertvolle Mitarbeit. Dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Österreichischen Nationalbank sei für finanzielle Unterstützung gedankt, sowie der Österreichischen Studiengesellschaft für Atomenergie für die Nutzungsmöglichkeit einzelner Einrichtungen des Instituts für Landwirtschaft.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Schriftenverzeichnis

AUDUS L. J. 1972. Plant growth substances I: Chemistry and Physiology. — Leonard Hill, London. S. 179—186.

DELINCEE H. & RADOLA B. J. 1972. Detection of peroxidase by the print technique in thin-layer isoelectric focusing. — Anal. Biochem. 48: 536—545.

GASPAR T. & XHAUFFLAIRE A. 1967. Effect of kinetin on growth, auxin catabolism, peroxidase and catalase ativities. — Planta (Berl.) 72: 252—257.

HALMER P. & THORPE T. A. 1976. Kinetin induced changes in cell wall composition of tobacco callus. — Phytochemistry 15: 1585—1588.

HALPERIN W. 1969. Morphogenesis in cell cultures. — Ann. Rev. Plant Physiol. 20: 395—418.

KANDELER R. 1972. Entwicklungsphysiologie der Pflanzen. — Sammlung Göschen 7001: 31—34.

LEE T. T. & SKOOG F. 1965. Effects of substituted phenols on bud formation and growth of Tobacco tissue cultures. — Physiol. Plant. 18: 386—402.

— 1972. Interaction of cytokinin, auxin, and gibberellin on peroxidase isoenzymes in tobacco tissues cultured in vitro. — Canad. J. Bot. 50: 2471—2477.

MÄDER M., NESSEL A. & BOPP M. 1977. Über die physiologische Bedeutung der Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer Eigenschaften. II. pH-Optima, Michaelis-Konstanten, Maximale Oxidationsraten. — Z. Pflanzenphysiologie 82: 247—260.

MURASHIGE T. & SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. — Physiol. Plant. 15: 473—497.

NESSEL A. & MÄDER M. 1977. Über die physiologische Bedeutung der Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer Eigenschaften. I. Trennung, Reinigung, chemische und physikalische Daten. — Z. Pflanzenphysiol. 82: 235—246.

RADOLA B. J. 1969. Thin-layer isoelectric focusing of proteins. — Biochim. biophys. Acta (Amst.) 194: 335—338.

RÜCKER W. & RADOLA B. J. 1971. Isoelectric patterns of peroxidase isoenzymes from Tobacco tissue cultures. — Planta (Berl.) 99: 192—198.

— & MARKOTAI J. 1977. Growth and isoelectric patterns of peroxidase in tobacco tissue cultures under the influence of growth regulator systems. — Electrofocusing and Isotachophoresis. Walter de Gruyter u. Co: 213—220.

SKOOG F. u. MILLER C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. — Symp. Soc. Exptl. Biol. 11: 118—131.

TORREY J. G. & FOSKET D. E. 1970. Cell division in relation to cytodifferentiation in cultured pea root segment. — Amer. J. Bot. 57: 1072—1080.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

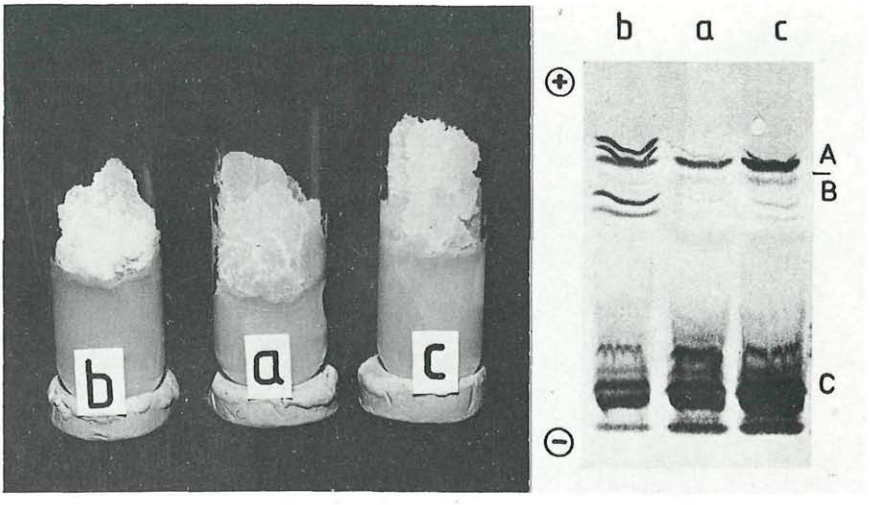

Abb. 1. Tabakgewebekulturstämme unter dem Einfluß unterschiedlicher Wuchsstoffbedingungen gezüchtet: Stamm b: IAA+BAP je 10^{-7} g/ml; Stamm a: 2,4 D 10^{-6} g/ml; Stamm c: 2,4 D 10^{-6} g/ml, jedoch die ersten 10 Passagen in IAA+BAP je 10^{-7} g/ml.

links: Die drei verschiedenen Gewebekulturstämme nach einer Kultivierungsperiode von 4 Wochen; Morphologie und Wachstumsrate sind bei den Kulturen deutlich verschieden.

rechts: Die Enzymauftrennungen; in den isoelektrischen Peroxidasemustern weisen die vergleichbaren Zonen der Enzymgruppen A und B bei den verschiedenen Stämmen unterschiedliche Aktivitäten auf.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

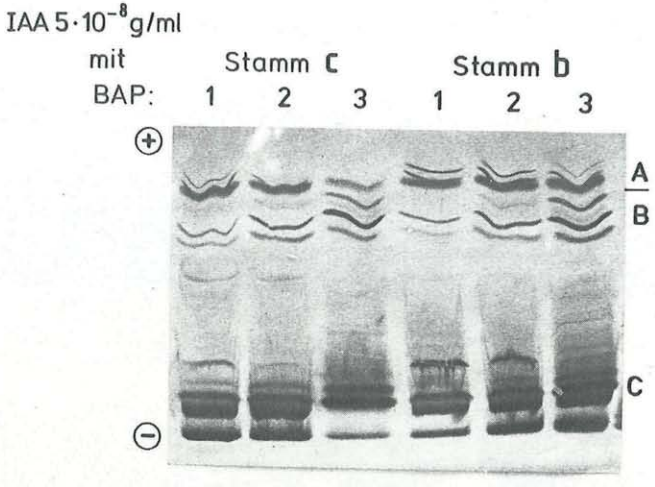

Abb. 2. Isoelektrische Peroxidasemuster von Tabakgewebekulturen der Stämme c und b gewachsen unter dem Einfluß von IAA 5.10^{-8} g/ml und steigenden BAP Konzentrationen: mit zunehmenden BAP-Konzentrationen sind Aktivitätsverschiebungen von den Zonen der Enzymgruppe A auf die Zonen der Gruppe B zu beobachten. 1 = BAP 5.10^{-8} g/ml; 2 = BAP 5.10^{-7} g/ml; 3 = BAP 5.10^{-6} g/ml.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

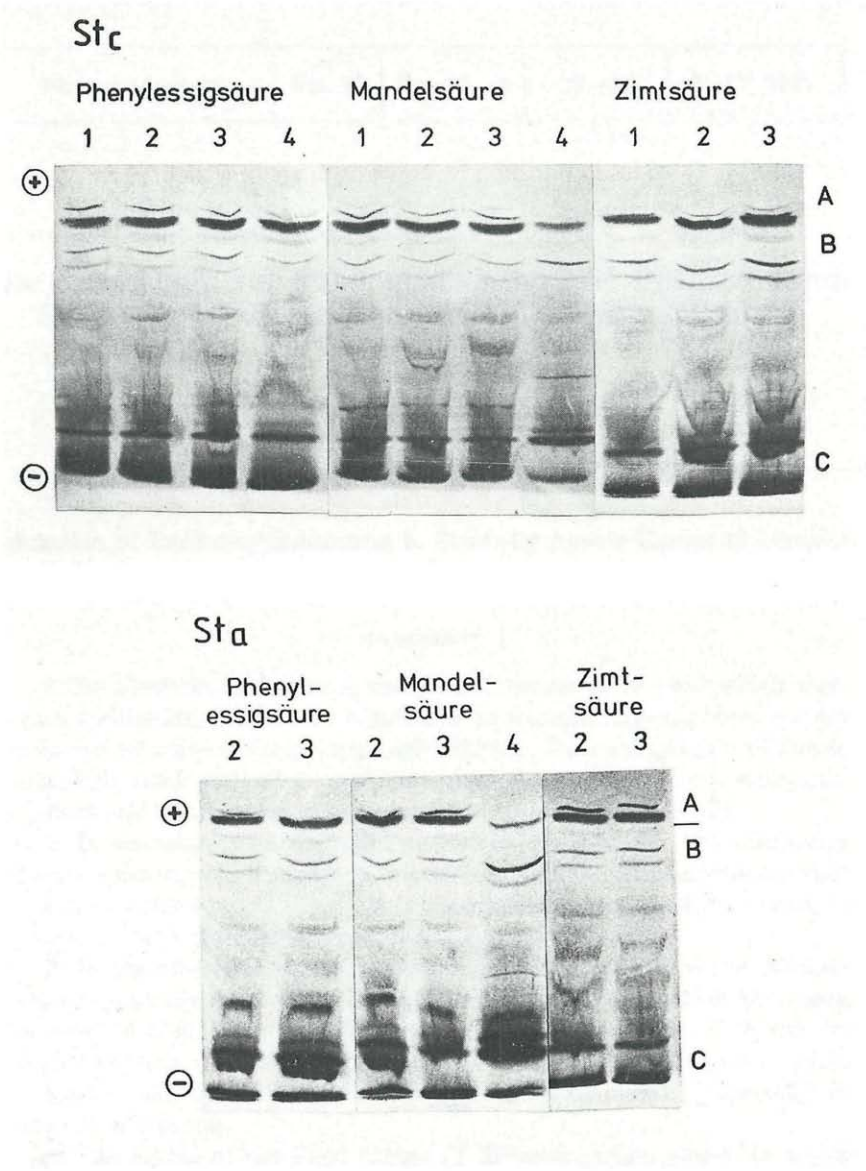

Abb. 3. Isoelektrische Peroxidasemuster von Tabakgewebekulturen der 2,4 D Stämme c (oben) und a (unten); 3 Wochen gewachsen in Medien mit IAA + BAP je 5.10^{-8} g/ml und zusätzlich mit verschiedenen Phenylcarbonsäuren: Unter dem Einfluß der höchsten verwendeten Konzentrationen nimmt die Aktivität bei den Zonen der Enzymgruppe A ab, bei Mandelsäure und Zimtsäure nimmt gleichzeitig die Aktivität der Zonen der B-Gruppe zu. 1 = 10^{-6} g/ml; 2 = 10^{-5} g/ml; 3 = 10^{-4} g/ml; 4 = 10^{-3} g/ml.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1978

Band/Volume: 19_1_2

Autor(en)/Author(s): Rücker Waltraud, Markotai Julius

Artikel/Article: Gewebewachstum und isoelektrische Peroxidasemuster bei Tabakgewebekulturen unter Einfluß von Cytokinin, verschiedenen Phenylcarbonsäuren und aromatischen Aminosäuren. 1-11