

Induktionsbedingungen der Suberinsynthese und Zellproliferation bei Parenchymfragmenten der Kartoffelknolle

H. LANGE*, G. ROSENSTOCK und G. KAHL
Botanisches Institut der Universität Frankfurt a. M.

Eingegangen am 28. August/18. September 1969

Differentiated Conditions for the Induction of Suberin Synthesis or Cell Proliferation in Potato Tuber Tissue after Derepression

Summary. Experiments with potato tuber fragments under normal atmospheric conditions (0.03% CO₂) suggest that a wound periderm, prominently marked by suberin synthesis, develops regularly, independently of preparation technics. It has been demonstrated that potato parenchym is able to perform differentiated reactions depending on the changing influences on the reacting cells caused by the wound stimulus and partial isolation. Suberin synthesis and the cicatrization effect can be suppressed totally if changes remain insignificant as compared with the cellular state in the intact organ. This requires: 1. separating the tissue without bruising it to avoid deformations of the protoplasmatic structure; 2. removing adjacent fragments of destroyed cells by rinsing the slices; 3. maintaining cell turgidity by keeping the moisture in the reaction atmosphere at 100%. Moreover 10% CO₂-concentration is necessary, corresponding to the intercellular air *in situ*.

Within 24 hours after depression these conditions induce spontaneous proliferation uniformly in all superficial cell layers of tissue slices, accompanied by multiple mitosis in place of the typical suberized wound periderm. Inhibition of suberin biosynthesis is reversible by subsequent modification of reaction conditions. In contrast a method has been found to induce suberin formation only and to suppress any cell division activity (Kahl et al., 1969 a). This provides the opportunity to analyse causal corresponding physiological reactions in genetically identical cells. The advantage of this method — compared with long term experiments involving hormone-activated growth in sterile tissue culture — is the possibility of controlling quantitative and qualitative changes in biochemical pathways immediately after derepression.

Einleitung

Um kausale Wirkungsmechanismen entwicklungsphysiologischer Prozesse bei Pflanzen aufzuklären, scheint es sinnvoll, die bei genetisch identischem Material mit unterschiedlichen histogenetischen Reaktionen verknüpften Stoffwechselwege in vergleichender Weise zu analysieren. Unser Ziel ist es, eine solche Aufgabenstellung an einem anatomisch-histologisch vergleichsweise einfachen, zudem rasch reagierenden und praktisch jederzeit in ausreichender Menge verfügbaren Objekt anzugehen.

* Diese Arbeit enthält einen Auszug aus der Habilitationsschrift von H. Lange, Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Frankfurt a. M., 1969.

Gewebefragmente aus dem Knollenparenchym der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum* L.) besitzen innerhalb einer zeitlich begrenzten Phase von wenigen Tagen die Potenz zur Neubildung von Zellen. Der Regenerationsprozeß kommt zum Stillstand, nachdem das entfernte oder lokal verletzte primäre Abschlußgewebe durch ein Wundperiderm ersetzt worden ist. Charakteristisch für diesen Vorgang ist die Suberinsynthese, wobei sowohl die Membranen der an die Wunde grenzenden Speicherparenchym- als auch der neugebildeten Peridermzellen einem Verkorkungsprozeß unterworfen werden. Auch bei steriler Gewebekultur und Behandlung mit Phytohormonen bleiben nach eigenen Untersuchungen Suberinisierung und Peridermentwicklung die vorherrschenden im mikroskopischen Bild erfaßbaren Primärreaktionen (vgl. auch Wurm, 1960 und die zusammenfassende Darstellung von Gautheret, 1959). Callus, der zur Anlage von Sproß- und Wurzelorganen führen kann, entsteht in der Regel erst nachfolgend subperidermal durch Streckung und mehrfache Teilung parenchymatischer Zellen, die schließlich die oberflächliche verkorkte Gewebezone aufsprengen und als intercellularenreiche Calluswucherungen hervorbrechen.

Callusentwicklung, die als Spontanreaktion sofort nach Isolierung eines Gewebefragments in den Zellen unmittelbar an den Wundflächen einsetzt, ist bisher nur deskriptiv als seltenes Phänomen der Wundreaktion erwähnt, jedoch weder unter histogenetischen noch physiologischen Aspekten genauer untersucht worden (vgl. Olufsen, 1903; Kabus, 1912; Wurm, 1960; Fellenberg, 1963). Callusbildung dieser Art setzt Zellproliferation voraus, die von mitotischen Prozessen begleitet wird, aber Verkorkung ausschließt.

Bei beiden Entwicklungsformen muß für die Stoffwechselaktivierung und histologische Neubildungen eine partielle Derepression bzw. differenzielle Genaktivität vorausgesetzt werden (vgl. Kahl et al., 1969 b und die dort zitierte Literatur).

Im Rahmen dieser ersten Arbeit wird über die kontrollierte Induktion unterschiedlicher morphogenetischer Restitutionsphänomene durch milieubedingte Steuerung der genetischen Information berichtet. In der Folge sollen die damit verknüpften respiratorischen und biochemischen Stoffwechselreaktionen auf vergleichender Basis diskutiert werden.

Material und Methode

Experimentiert wurde — soweit keine abweichenden Angaben verzeichnet sind — mit 1 mm (ca. 6—7 Zelldurchmesser) dicken Parenchym Scheiben inklusive Rinde und Korkhaut von Kartoffelknollen der Sorte „Saskia“. Reproduktionen wurden durchgeführt mit den Sorten „Erstling“ und „Feldeslohn“. Die ausgereiften Knollen, nach der Ernte im Dunkeln bei 5° C aufbewahrt, wurden jeweils 14 Tag vor dem Schneiden durch Umlagerung der späteren Versuchstemperatur von 20° C angepaßt.

Alle Scheiben lagen während der Reaktionsdauer in wasserdampfgesättigten, kontinuierlich mit Luft oder definierten Luft-CO₂-Gasgemischen durchströmten Exsiccatoren. Kontrolle der anatomischen und histochemischen Reaktionen erfolgte lichtmikroskopisch (Suberinbildung durch Färbung mit Sudan III Glycerin). Phytopathogene Organismen machten sich weder auf vernarbendem noch Callus bildendem Parenchym störend bemerkbar.

Die hier angewandte Behandlung des Versuchsmaterials besitzt Vorteile gegenüber der Sterilkultur unter äußerer Nährstoff- und Phytohormonzufuhr. Insbesondere ist das reagierende Parenchym für unmittelbar nach der Isolierung einsetzende Stoffwechselfmessungen — im Rahmen parallellaufender biochemischer Untersuchungen — unter Ausschaltung zusätzlicher Einflußfaktoren sofort verfügbar.

Ergebnisse

Callusproliferation des Kartoffelparenchyms soll nach Beobachtungen von Kabus (1912) nur unter Luftabschluß möglich sein. Da „Luftabschluß“ aber mehrere Veränderungen des Reaktionsmilieus beinhaltet, erschien es notwendig, verschiedene atmosphärische Bedingungen *in vitro* definiert einzustellen und auf ihre Wirksamkeit zu prüfen.

1. Der O₂-Faktor

Als wirksame Komponente kommt der verminderte Sauerstoffzutritt in Frage, denn nach Befunden von Magness (1920) und Burton (1950) ist der O₂-Partialdruck im Intercellularensystem der Kartoffelknolle und anderer Speicherorgane gegenüber der Außenatmosphäre deutlich herabgesetzt, die Angabe der Werte variiert von etwa 8—15%.

Eigene Versuche ergaben jedoch, daß eine Verminderung des O₂-Partialdruckes in der Reaktionsatmosphäre auf 10, 7,5 und 5% die Ausbildung eines normal verkorkten Periderms bei verletztem Kartoffelparenchym in keinem Falle beeinträchtigt. Parallel dazu durchgeführte Gaswechselfmessungen ließen ebenfalls keine grundlegenden Abweichungen vom typischen Wundatmungsverlauf erkennen (vgl. Lange, 1970). Bei 1% O₂ schließlich machte sich zwar eine verminderte Zellteilungsaktivität bemerkbar, die Suberinsynthese jedoch konnte auch dann noch nicht unterbunden werden. Damit scheidet der O₂-Faktor als wirksame Komponente aus.

2. Der CO₂-Faktor

Als ein anderes mögliches Agens kommt der CO₂-Faktor in Betracht, denn CO₂ wird im intercellularen Gasraum der Kartoffelknolle in erhöhtem Maße angereichert. Die von Deveaux (1890), Magness (1920), Boswell und Whiting (1940) sowie Burton (1952) ermittelten Daten machen Werte von 5—11% wahrscheinlich. Differenzen innerhalb dieser, in jedem Falle aber gemessen an der normalen Luftzusammensetzung sehr hoch liegenden Werteskala sind auf Sorten- und Lagertemperaturunterschiede zurückzuführen.

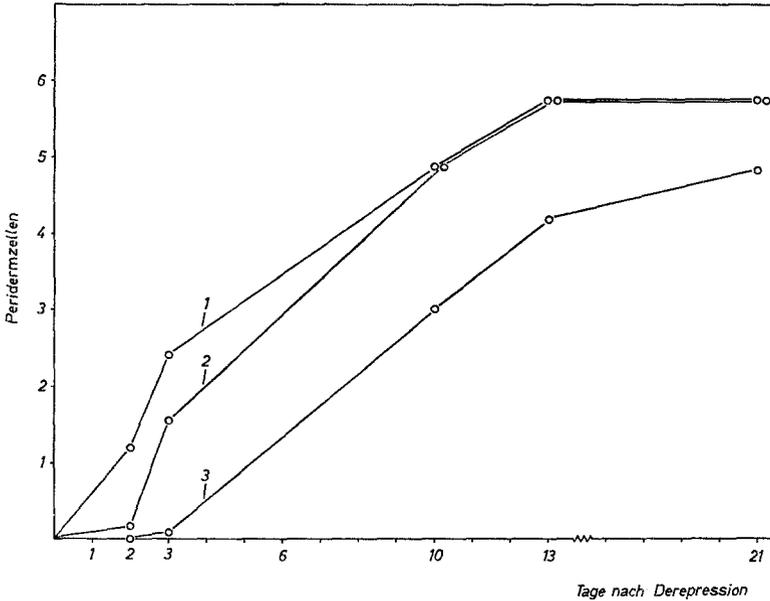


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der Peridermzellenbildung in Abhängigkeit von der äußeren CO_2 -Konzentration bei 6 mm dicken Kartoffelparenchymscheiben. Kurve 1: 0,03 sowie 5% CO_2 ; Kurve 2: 10% CO_2 ; Kurve 3: 20% CO_2

Von mehreren Autoren wurde hohen CO_2 -Konzentrationen in vergleichbaren Dimensionen eine hemmende Wirkung auf verschiedenste Zelleistungen bei unterschiedlichen Versuchsobjekten zugeschrieben (vgl. Lange, 1970). Über anatomisch-histologische Auswirkungen dieser CO_2 -Konzentrationen auf verletztes Kartoffelparenchym liegen bisher jedoch keine Befunde vor.

Erste eigene Ergebnisse zur Klärung dieser Frage sind in den graphischen Darstellungen der Abb. 1 zusammengefaßt. Danach beeinflußt ein CO_2 -Anteil bis zu 5% im kontinuierlich durchströmten, nahezu wasserdampfgesättigten Reaktionsraum den normalen Reaktionsablauf überhaupt nicht, die Zellteilungsraten bleiben stets gleich. 10% CO_2 bewirken nur eine schwache anfängliche Verzögerung der Peridermzellenbildung. Nach Reaktionsabschluß sind die Vernarbungsintensitäten identisch. In einem zu 15 oder 20% mit CO_2 angereicherten Luftgemisch ist die Hemmwirkung in der 3tägigen Anfangsphase sehr ausgeprägt, später kommt es aber durch verstärkt ablaufende Reaktion zu einer Angleichung. In gleicher Weise macht sich auch eine Verzögerung der Suberinbildung nur anfänglich bemerkbar. Callusproliferationen treten bei den verwendeten CO_2 -Konzentrationen überhaupt nicht oder nur vereinzelt

im Bereich der für die Solanaceen typischen inneren Phloemstränge auf. Auch auf die Membranen dieser, anfangs einem Streckungsprozeß unterworfenen peripheren Zellen werden nachfolgend Suberinlamellen aufgelagert, ein charakteristisches Wundperiderm entwickelt sich in der darunterliegenden Zellreihe.

Durch diesen Befund schien zunächst nach dem O₂- nun auch der CO₂-Faktor als äußere Ursache für die histologische Entwicklungssteuerung nach Derepression auszuschneiden. Einen weiteren Anknüpfungspunkt ergab jedoch die Untersuchung von Gewebezylindern, die mittels eines Korkbohrers aus der Knolle ausgestanzt und nach Ausschneiden einer dünnen Scheibe aus ihrer Mitte als zwei Restteile von jeder Seite wieder in das verletzte Organ zurückgesteckt wurden (vgl. Olufsen, 1903), so daß im Inneren ein kleiner Hohlraum entstand. Dabei kam es zur Bildung von Callusblasen, jedoch nur auf den zwei planparallelen, in diesem Falle durch Rasierklingschnitt erzeugten Wundflächen. Die durch den Korkbohrer gestanzten konkaven und konvexen Wundflächen dagegen zeigten trotz gleicher atmosphärischer Reaktionsbedingungen das normale Korkperiderm.

Von dieser Beobachtung ausgehend wurden nachfolgend Gewebefragmente unter variierten Präparationsbedingungen aus dem Knollenparenchym isoliert und erneut atmosphärischen Reaktionsverhältnissen ausgesetzt, die denen im Inneren des Organs gleichen. Für die Callusinduktion zeigten sich dabei folgende Bedingungen als notwendige Voraussetzung:

Alter der Versuchsknollen nicht höher als 4—6 Wochen nach Ernte, andernfalls ist Kaltlagerung (2—7° C) notwendig; wasserdampfgesättigtes Reaktionsmilieu; „saubere“ Gewebetrennung unter Vermeidung von Zelleformationen; Beseitigung anhaftender Stärke, Vacuolenflüssigkeit sowie von Plasmaresten des zerstörten Gewebes durch *kurzes Abspülen*, aber Vermeidung *dauernder Benetzung* der Schnittflächen mit Wasser.

Die Histogenese der Callusbildung nimmt dann folgenden Verlauf: Bei Ausbleiben jeder Suberinsynthese kommt es bereits während der ersten 24 Std nach Derepression zum Proliferieren aller durch den Schnitt freigelegten Zellen, soweit sie selbst unversehrt geblieben sind (Abb. 3). Im Verlauf von 4 Tagen haben sich callöse Wucherungen gebildet, die bei gleichzeitig ablaufenden Mitosen bis zum Mehrfachen ihres Zelldurchmessers (im Ruhezustand) über die Schnittfläche hinausragen (Abb. 4). Häufig sind die Proliferationsschläuche so eng aneinander gelegt, daß der Eindruck eines geschlossenen Gewebes entsteht. Die Gesamtzahl der Teilungen im Periderm wird erreicht und oft übertroffen, auch dann, wenn die Scheiben aus ein und demselben Organ isoliert wurden.

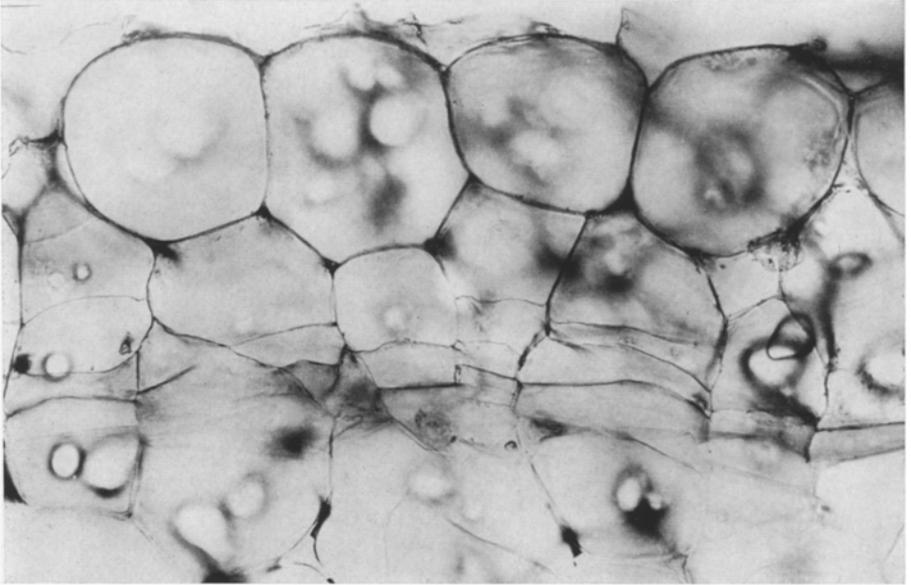


Abb. 2. Typisches Wundperiderm mit suberinierten Membranen (dunkel getönt) von einer 1 mm dicken Kartoffelparenchymscheibe, 5 Tage nach Derepression

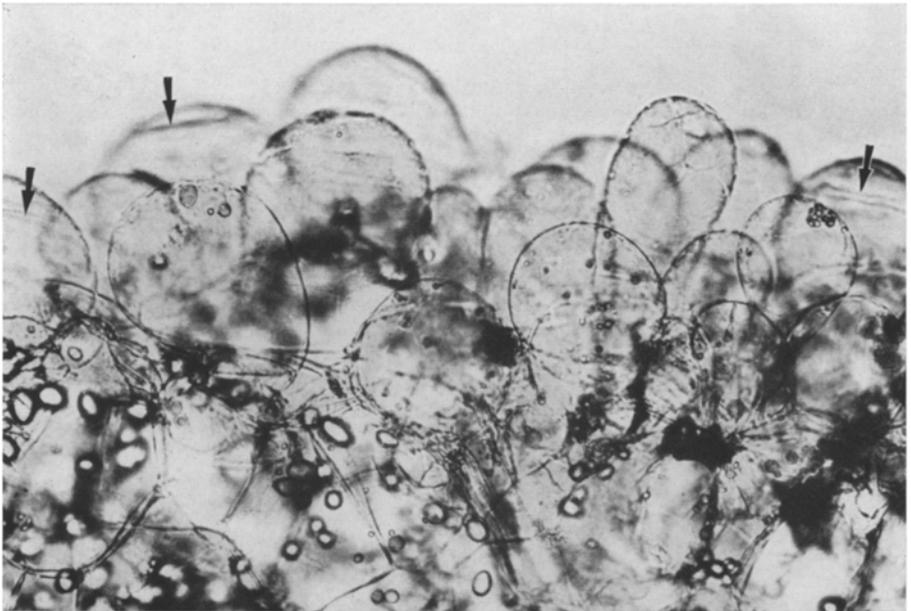


Abb. 3. Callusproliferationen 32 Std nach Derepression. (Bereits erfolgte Mitosen sind an einigen schwach abgezeichneten Primordialmembranen erkennbar, vgl. Pfeilrichtung)

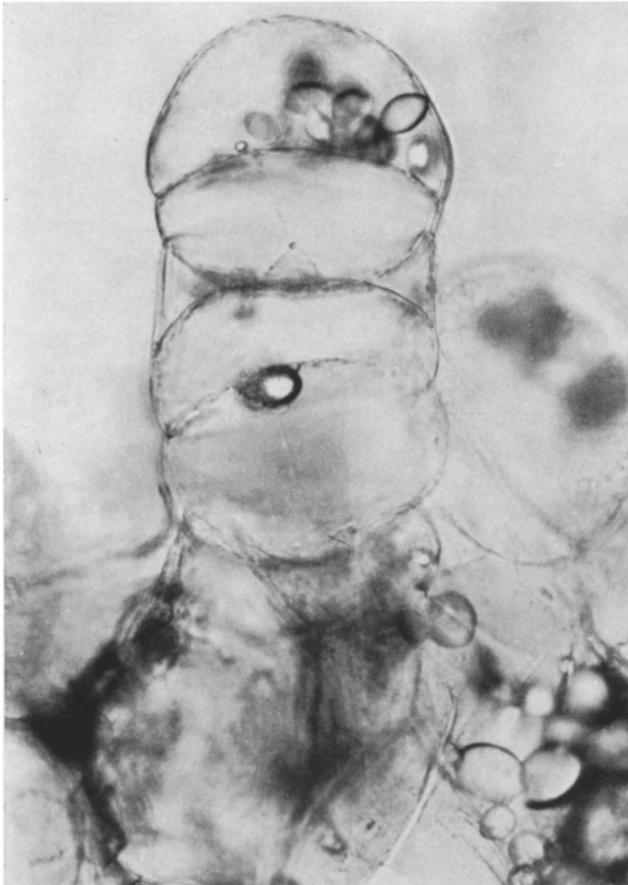


Abb. 4. Einzelne, durch mehrere Mitosen gebildete Callusproliferation, 4 Tage nach Derepression

Wesentlich erscheint folgender Unterschied: bei einer Vernarbungsreaktion finden die aufeinanderfolgenden Mitosen stets in der jeweils *basalen* Tochterzelle der Peridermmutterzelle statt, während die zentrifugal abgegliederten Phellemelemente sukzessive verkorken. In einer Callus entwickelnden Zelle dagegen ist immer die zuletzt durch Proliferation gebildete *apikale* Tochterzelle weiter teilungsaktiv. Eine Calluszelle zeichnet sich auch — lichtoptisch beurteilt — durch erhöhten Plasmagehalt, intensivere Plasmaströmung und vermehrte Plasmaorganellen gegenüber der Peridermzelle aus. Der histologische Kontrast zwischen den unterschiedlichen Reaktionen wird durch die Abb. 2 bzw. 3 und 4 photographisch dokumentiert.

Die in der Literatur mehrfach zitierte und bisher unwidersprochene Schlußfolgerung (vgl. z.B. Olufsen, 1903), daß Kartoffelparenchym unabhängig von der Art der Verletzung auf den Wundreiz immer mit prinzipiell gleicher Reaktion antwortet, ist nach diesen Befunden nicht mehr allgemein gültig.

3. Modifizierter CO₂-Gehalt der Reaktionsatmosphäre

Bei verringertem CO₂-Gehalt von 10 auf 5% im Reaktionsraum erscheint die Callusbildung deutlich abgeschwächt, bei 1% treten sogar nur noch vereinzelt Calluszellen auf, während der Verkorkungsprozeß überwiegt. Wird der CO₂-Gehalt andererseits auf 15, 20 und 30% eingestellt, so ist doch keine weitere Verstärkung der Callusbildung zu konstatieren, vielmehr wirken sich auch in diesem Falle oft sporadisch einsetzende Verkorkungsprozesse hemmend aus. Eine Kombination von 10% CO₂ mit vermindertem O₂-Partialdruck (15, 10 und 5%) hat weder erkennbar reaktionshemmenden noch zusätzlich fördernden Einfluß.

Zusammenfassend läßt sich aussagen, daß die Optimalbedingungen der Callusinduktion *in vitro* annähernd identisch mit den meßbaren Bedingungen *in situ* sind.

4. Umlagerungseffekt

Gewebescheiben, die nach 1, 2, 3 oder 4tägiger Reaktion bei 10% CO₂ in Luft normaler Zusammensetzung überführt werden, zeigen bereits jeweils 24 Std später Suberinlamellen in den zuvor gebildeten Calluszellen, die dadurch am weiteren Wachstum gehindert werden. Ein Korkperiderm entsteht durch zentripetale Teilungsfolge. Wird der Umlagerungszeitpunkt jedoch über 8—10 Tage hinaus verzögert, dann unterbleibt die Suberinsynthese vollständig und der histologische Entwicklungszustand des „offenen“, unvernarbten Callus bleibt erhalten. Offensichtlich ist das Genom zu diesem Zeitpunkt aus der Derepressionsphase wieder in ein Stadium erneuter Reprimierung eingetreten.

Diskussion

Durch kontrollierte Variation äußerer Bedingungen gelang es, den Komplex der normalerweise gleichzeitig ablaufenden histogenetischen Reaktionen von Kartoffelparenchymfragmenten in Einzelreaktionen aufzugliedern. An Stelle der normalen Vernarbung konnte Callusproliferation erreicht werden, d. h. Zellvermehrung ohne Verkorkung. Nachdem auch eine Methode gefunden wurde, Verkorkung ohne Zellvermehrung zu induzieren (vgl. Kahl et al., 1969 a), bietet sich die Möglichkeit, Veränderungen einzelner Stoffwechselprozesse und histologische Veränderungen, die nach Derepression auftreten, auf ihre Abhängigkeiten voneinander zu untersuchen.

Kartoffelparenchym zeichnet sich dadurch aus, daß im Gegensatz zu anderen Regenerationsgeweben (z. B. Karotte, Kohlrabi, Rote Beete oder Sproßabschnitte von Holzgewächsen) bei relativ einheitlicher anatomischer Zusammensetzung auch nahezu Zelle für Zelle gleichzeitig und gleichartig reagiert — wie an dünnen Scheiben gezeigt wurde. Praktisch lassen sich so unbegrenzte Mengen von physiologisch homogenem Untersuchungsmaterial gewinnen. Diese Eigenschaft ist besonders wichtig für die Callusproduktion, die bei anderen Geweben aus meist nicht näher bekannten Gründen trotz offenbar gleicher äußerer und innerer Voraussetzungen topographisch sehr unregelmäßig in Erscheinung tritt (vgl. Gautheret, 1959). Callusbildung ist bei vielen Objekten verschiedenster systematischer Zugehörigkeit eine typische Wundreaktion. Bei der Kartoffelknolle muß das Phänomen der Verkorkung, das die Entwicklung eines aus zuletzt toten Zellen zusammengesetzten Abschlußgewebes einleitet, als Ursache für das Ausbleiben der Callusbildung in wundflächennahen Gewebepartien angesehen werden. Durch Korkauflagerung an die äußeren periklinen und antiklinen Membranen der freigelegten Zellen schon innerhalb von 24 Std bei zentripetal gerichtete Teilungsfolge wird nämlich proliferierendes Streckungswachstum verhindert.

Der Befund, daß die CO_2 -Konzentration nicht allein das wirksame Regulationsprinzip vertritt, und die Auslösung der Suberinsynthese nur im Zusammenspiel mit zusätzlichen Faktoren erfolgt, läßt sich folgendermaßen deuten:

Zellen, die verletzungsbedingt aus der Mitte ihres ursprünglichen Gewebeverbandes an die Organoberfläche gelangen, werden plötzlich mit vielfach veränderten Lebensbedingungen konfrontiert. Unter anderem kommt es zu Veränderungen des Wanddrucks, der relativen Atmosphärenfeuchtigkeit und der CO_2 -Konzentration. Darüber hinaus können Substanzen aus dem Plasma oder den Vacuolen der getöteten Zellen in das Innere der intakt gebliebenen eindringen und Permeabilitätsveränderungen der Plasmagrenzschichten stattfinden (vgl. Eberhard, 1960). Schließlich müssen quetschungsbedingte Deformationen plasmatischer Strukturen durch den verletzenden Gegenstand angenommen werden.

Charakteristisch ist, daß *Proliferation* immer dann gefördert wird, wenn das Ausmaß der Veränderungen gegenüber dem ursprünglichen Zustand möglichst gering bleibt. (Quetschungsfreies Schneiden, Abspülen von Zelltrümmern, feuchtes Reaktionsmilieu bzw. Turgeszenzerhalt der Zellen, 10% CO_2 in der Atmosphäre.) In einer Phase besonders labilen Zustands nach Derepression genügt, wie gezeigt, intensive Veränderung eines einzigen dieser Faktoren, um die Entwicklungsrichtung zur *Vernarbung* umzulenken.

Die Kartoffelzelle besitzt also die Potenz zu qualitativ abgestufter Reaktion. Ein Wundreiz, der weniger intensive Veränderungen induziert,

wird auch mit einer weniger umfangreichen Restitutionsreaktion beantwortet. Stärker in die cytologische Kontinuität eingreifende Störungen lösen zusätzliche Reaktionen im Zellstoffwechsel aus wie Citronensäurecyclusaktivität, Suberinbildung und die zu ihrer Synthese notwendigen Stoffwechselprozesse (vgl. Lange, 1969). Die Speicherparenchymzelle der Kartoffelpflanze besitzt somit die bisher unbeachtet gebliebene Fähigkeit, nach einer Derepression milieubedingt differenzierte Reaktionen auszuführen.

Literatur

- Boswell, J. G., Whiting, G. C.: Observations on the anaerobic respiration of potato tubers. *Ann. Bot.*, N.S. **4**, 257—268 (1940).
- Burton, W. G.: Studies on the dormancy and sprouting of potatoes. I. The oxygen content of the potato tuber. *New Phytologist* **49**, 121—134 (1950).
- Studies on the dormancy and sprouting of potatoes. II. The carbon dioxide content of the potato tuber. *New Phytologist* **50**, 287—296 (1952).
- Deveaux, H.: Sur la respiration des cellules à l'intérieur des tissus massifs. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **112**, 311—313 (1890).
- Eberhard, F.: Der Einfluß von mechanischer Beanspruchung, Verletzung und Infektion auf die Atmung In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. XII/2, S. 388—415 (W. Ruhland, ed.). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- Fellenberg, G.: Über die Organbildung an in vitro kultiviertem Knollengewebe von *Solanum tuberosum*. *Z. Bot.* **51**, 113—141 (1963).
- Gautheret, R. J.: *La culture des tissus végétaux*, p. 378. Paris: Masson & Cie. 1959.
- Kabus, B.: Neue Untersuchungen über Regenerationsvorgänge bei Pflanzen. *Beitr. Biol. Pflanzen* **11**, 1—52 (1912).
- Kahl, G., Lange, H., Rosenstock, G.: Substratspiegel, Enzymaktivitäten und genetische Regulation nach Derepression in pflanzlichen Speichergeweben. *Z. Naturforsch.* **24 b**, 911—918 (1969 b).
- — — Die Trennung von Zellteilung und Suberinsynthese in dereprimiertem pflanzlichem Speichergewebe durch Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan. *Planta (Berl.)* **87**, 365—371 (1969 a).
- Lange, H.: Atmungswege bei vernarbenden und proliferierenden Gewebefragmenten der Kartoffelknolle. *Planta* **90**, 119—132 (1970).
- Magness, J. R.: Composition of gases in intercellular spaces of apples and potatoes. *Bot. Gaz.* **70**, 308—316 (1920).
- Olufsen, L.: Untersuchungen über Wundperidermbildung an Kartoffelknollen. *Beih. bot. Zbl.* **15**, 269—308 (1903).
- Wurm, G.: Vergleichende Untersuchungen über Wachstum und Organbildung an Segmenten pflanzlicher Speicherorgane bei Kultur in vitro. *Flora (Jena)* **149**, 43—76 (1960).

Dr. H. Lange
 Prof. Dr. G. Rosenstock
 Dr. G. Kahl
 6 Frankfurt a. M.
 Botanisches Institut
 der Joh. Wlfg. Goethe-Universität
 Siesmayerstr. 70