

Die Trennung von Zellteilung und Suberinsynthese in dereprimiertem pflanzlichem Speichergewebe durch Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

G. KAHL, G. ROSENSTOCK und H. LANGE

Botanisches Institut der Universität Frankfurt a. M.

Eingegangen am 9. Mai 1969

Morphogenetic Separation of Cell Division and Suberin Biosynthesis in Potato Tuber Tissue by Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane

Summary. Differential derepression of the genome of potato tuber cells by slicing of the tuber tissue leads to cell divisions. This mitotic activity is totally suppressed by Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris)-buffer widely used in biochemical research. The blockage is reversible if tissue slices are transferred to water in order to wash out the Tris-ions.

The actual reason for the inhibition of mitotic activity by Tris is as yet unknown. As a possible mechanism of action an uncoupling of electron transfer from phosphorylation in the mitochondrial respiratory chain is discussed. However, experiments show no difference in O_2 -absorption between Tris-treated tissue and control in water. Moreover the application of several inhibitors of respiration causes exactly the same effects in both tissues. Amytal (blockage of flavoproteids) has no influence on the respiratory rate at any time. Antimycin A (blockage of electron flow from cytochrome b to cytochrome c) as well as HCN (inhibition of cytochrome-oxidase) inhibit respiration of both tissues during the first 24 hours after derepression. Later on the respiration becomes resistant to both inhibitors. So the quality of respiration is assumed to be the same in mitotic active potato slices as in the Tris-treated tissue.

Recent results of biochemical analyses of events in carbohydrate breakdown of the tissues in question point to a differential effect of Tris on several enzymes as possible reason for its inhibitory action.

Einleitung

Durch Verwundung dereprimiertes Parenchym der Kartoffelknolle (*Solanum tuberosum* L.) läßt sich mittels Variation äußerer Bedingungen (Feuchtigkeit, CO_2 -Konzentration) in zwei Entwicklungsrichtungen lenken: Objekttypische Zellteilung zusätzlich Suberinisierung der Zellwände (= *Wundperidermbildung*) einerseits, Proliferation und Teilung der Wundzellen ohne Suberinsynthese (= *Callusentwicklung*) andererseits (vgl. LANGE u. ROSENSTOCK, 1963; LANGE, 1969). Es gelang nunmehr einen dritten Reaktionstyp zu finden, in dem jegliche *Zellteilung unterdrückt* bleibt, die *Suberinsynthese dagegen unbehindert* abläuft.

Es stehen danach drei Gewebetypen gleicher genetischer Konstitution aber unterschiedlicher Histogenese nach Derepression für weiterführende stoffwechselphysiologische Analysen auf vergleichender Grundlage zur Verfügung.

Material und Methoden

Das Versuchsmaterial und die Methoden der Vorbehandlung wurden bereits von KAHL et al. (1969) ausführlich beschrieben. Die unter Verwendung verschiedenartiger Atmungsinhibitoren durchgeführten Gaswechsellmessungen erfolgten mit standardisierten Warburg-Methoden. Die Cyanidkonzentration von $2,2 \cdot 10^{-4}$ mol in der Atmosphäre wurde nach ROBBIE (1948) eingestellt; die Antimycin A-Konzentration betrug 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, die des Amytals 1 mM/ml. Vorversuche ergaben, daß diese Konzentrationen für optimale Reaktionen ausreichen. Der pH der unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen sowie der Wasser-Kontrollen wurde in jedem Falle auf 7,5 eingestellt. Die Gewebescheiben wurden vor jeder O_2 -Absorptionsmessung jeweils 30 min lang der Hemmstoffwirkung ausgesetzt.

Suberinbildung wurde durch histochemische Färbereaktion mit Hilfe von Sudan III-Glycerin im mikroskopischen Präparat nachgewiesen.

Ergebnisse und Diskussion

Bei dem durch Verwundung dereprimierten Parenchym der Kartoffelknolle wird unter dem Einfluß des in biochemischen Untersuchungen häufig verwendeten Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffers eine reversible Mitosehemmung bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Suberinsynthese erzielt. Dagegen wird im Kontrollversuch durch reines Leitungswasser die mitotische Aktivität nicht grundsätzlich beeinflusst (vgl. Abb. 1 und 2).

Die Hemmwirkung ist konzentrationsabhängig. Bei Verwendung von $\geq 0,1$ mol Trispuffer wird die Mitose vollständig unterbunden; Konzentrationen geringer als 0,025 m andererseits lassen keinerlei Beeinflussung der Zellteilungsrate erkennen (vgl. Abb. 3).

Die Blockierung der Zellteilung ist reversibel. Wird nämlich das Gewebe nach 1—4tägiger Inkubation aus Tris-Puffer in Wasser überführt, setzt sofort der Zellneubildungsprozeß ein. Das umgelagerte Gewebe führt dann nachträglich die gleiche Anzahl von Zellteilungen durch wie die Kontrolle, seine Zellteilungsfrequenz (Mitosen/Zeiteinheit) ist sogar wesentlich höher (vgl. Abb. 4). Verhindert man die Ausschwemmung des Tris-Ions, indem das Gewebe in Luft anstatt in Wasser überführt wird, dann bleibt die mitotische Aktivität weiterhin blockiert.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Hinweisen in der Literatur, wonach auch der Ablauf anderer Reaktionen in verschiedenen Systemen bei Tris-Gegenwart gehemmt oder völlig unterbunden wird: Hill-Reaktion isolierter Chloroplasten, oxydative Phosphorylierung isolierter Mitochondrien von Bohnenhypokotylen, Proteinsynthese bei *Escherichia*

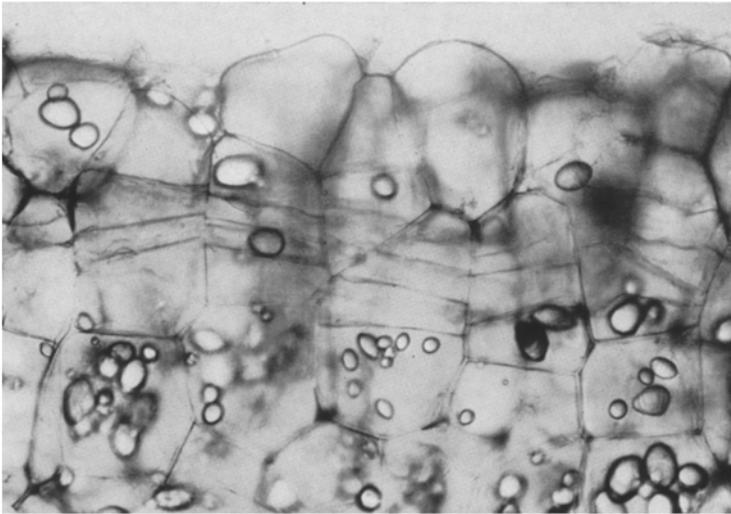


Abb. 1. Zellneubildung in dereprimiertem Speicherparenchym nach 5tägiger Reaktion in Wasser von $\text{pH} = 7,5$ (Vergr. $200\times$)

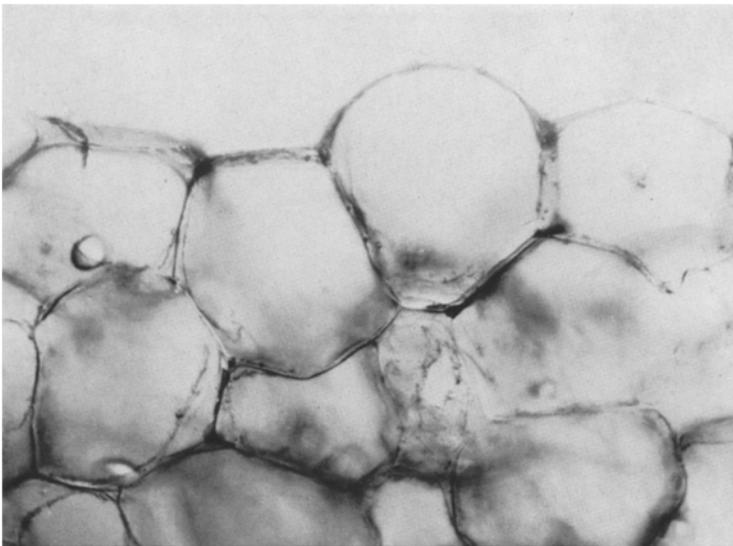


Abb. 2. Hemmung der Zellneubildung im gleichen Gewebe durch Tris-Puffer von $\text{pH} = 7,5$ nach 5tägiger Inkubation (Vergr. $300\times$)

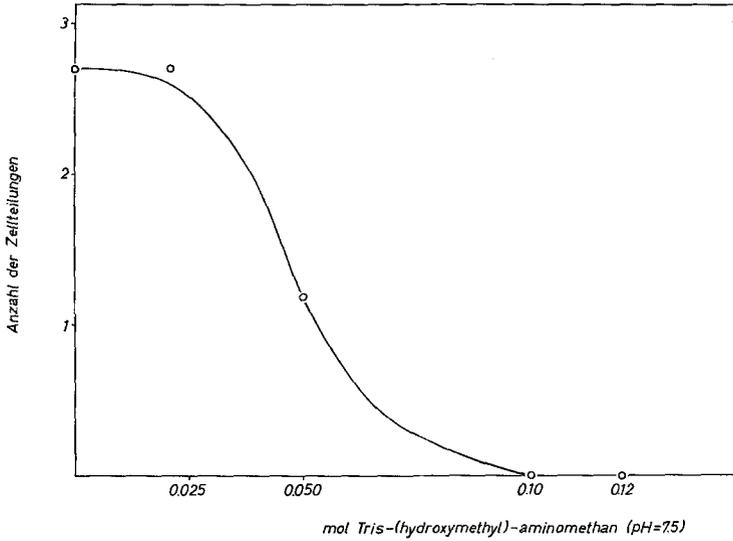


Abb. 3. Hemmung der mitotischen Aktivität in Abhängigkeit von der Tris-Konzentration

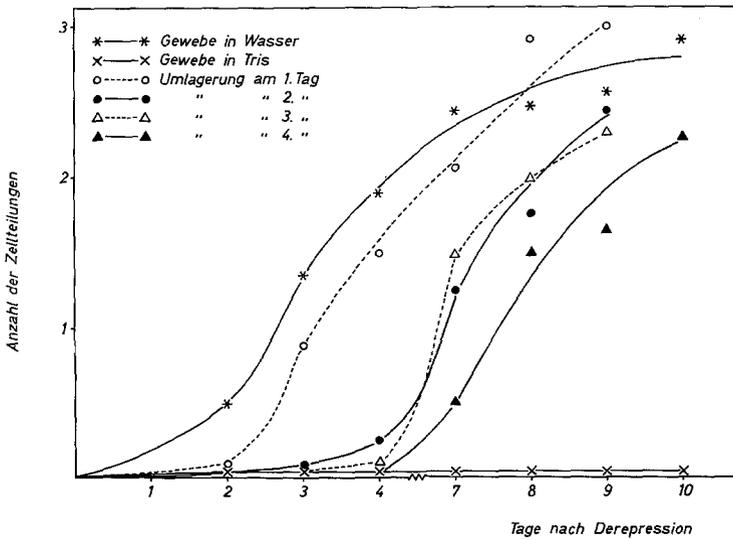


Abb. 4. Aufhebung der Mitosehemmung durch Umlagerung des Gewebes aus Tris-Puffer in Wasser

coli (GOOD et al., 1966), Aktivität der Lactatdehydrogenase (MAHLER, 1961), Zellteilung in Hela- und L-Kulturen (SWIM, 1961).

Die den genannten Hemmwirkungen zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen sind bis jetzt in keinem Fall geklärt. MAHLER (1961) sowie HAUPTMANN et al. (1968) diskutieren mögliche Ursachen; vor allem wird auf die entkoppelnde Wirkung des Tris-Ions bei der oxydativen Phosphorylierung in der Atmungskette hingewiesen. Da die über längere Zeit fortgesetzte Zellteilungsaktivität im dereprimierten Parenchym der Kartoffelknolle ATP-Synthese voraussetzt, könnte die Zellteilungshemmung durch Tris-Puffer eine Verhinderung der ATP-Synthese an der Atmungskette reflektieren. Folgende Versuche sollten klären, ob diese Möglichkeit im dereprimierten Kartoffelknollenparenchym realisiert ist.

1. Ein Vergleich der O_2 -Absorption dereprimierten Gewebes in Tris und in reinem Wasser zeigt, daß trotz unterschiedlicher Histogenese der charakteristische Wundatmungsverlauf völlig übereinstimmt (vgl. Abb. 5).

2. Die Applikation verschiedener Atmungsinhibitoren läßt für die in Wasser inkubierten Kontrollen folgende in Abb. 6 A zusammengefaßte Reaktionsmerkmale erkennen:

Amytal (blockt das Flavoprotein in der Atmungskette) hat keinen hemmenden Einfluß auf die O_2 -Absorption, fördert sie zeitweise sogar um etwa 20%.

Antimycin A (verhindert den Elektronenübergang von Cytochrom b zu Cytochrom c) inhibiert die Atmung sofort nach Derepression um etwa 65%. Im weiteren Verlauf der Wundheilung jedoch nimmt diese Empfindlichkeit stetig ab; nach 20 Std ist die gesamte Atmung Antimycin A-resistent.

HCN (inaktiviert Cytochrom a/a_3) hemmt die O_2 -Aufnahme kurz nach Derepression ebenfalls um etwa 65%. Danach wird die Atmung jedoch zunehmend unempfindlich, ist nach 48 Std völlig Cyanid-resistent und wird in der Folge geringfügig gefördert.

Abb. 6 B ermöglicht einen Vergleich dieser Ergebnisse mit jenen, die unter sonst gleichartiger Behandlung mit den genannten Atmungsinhibitoren bei Tris-Geweben erzielt wurden. Man erkennt daraus, daß die Atmung von gewässerten und Tris-gehemmten Geweben qualitativ gleichartig ist.

Danach ist offensichtlich, daß im Laufe der Wundheilung in beiden Geweben Umstellungen in der Atmungskette vorgenommen, die Elektronen in fortlaufend geringerem Maße über Cytochrom c \longrightarrow Cytochrom a/a_3 zum Sauerstoff transferiert werden. Wahrscheinlich ist in beiden Geweben ein autoxydables Cytochrom b_7 für den Cyanid- und Antimycin A-resistenten Elektronentransport verantwortlich. (HACKETT

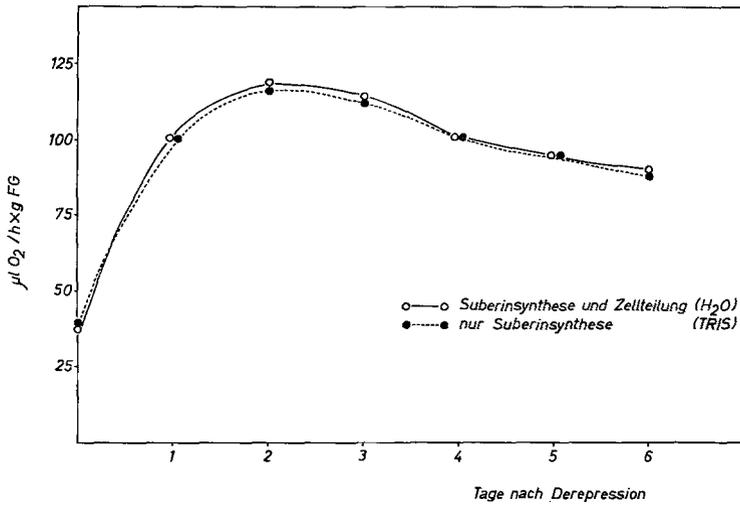


Abb. 5. Atmungsverlauf mitotisch aktiven und inaktiven Kartoffelknollenparenchyms

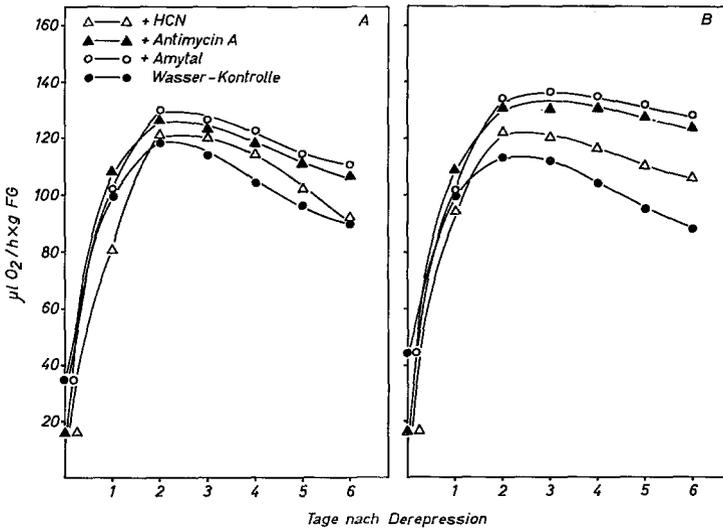


Abb. 6 A u. B. Atmungsverlauf von dereprimiertem Kartoffelknollenparenchym unter dem Einfluß verschiedener Atmungsinhibitoren. A Wasserkontrolle. B Inkubation in Tris-Lösung

et al., 1960). Die Wirkungslosigkeit des Amytals läßt sich zur Zeit nicht erklären. Im Hinblick auf das vorher aufgezeigte Problem muß festgehalten werden, daß die zellteilungshemmende Wirkung des Tris-Ions

keinesfalls auf einer Beeinflussung der Atmungskette oder einer Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung beruhen kann.

Literatur

- GOOD, N. E., G. D. WINGET, W. WINTER, T. N. CONNOLLY, S. IZAWA, and R. M. M. SINGH: Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* **5**, 467—477 (1966).
- HACKETT, D. P., D. W. HAAS, S. K. GRIFFITHS, and D. J. NIEDERPRUEM: Studies on development of cyanide-resistant respiration in potato tuber slices. *Plant Physiol.* **35**, 8—19 (1960).
- HAUPTMANN, S., u. W. GABLER: Zur Reaktion von Tris (hydroxymethyl)-aminomethan(Tris) mit einigen Aldehyden. *Z. Naturforsch.* **23b**, 111—112 (1968).
- KAHL, G., H. LANGE u. G. ROSENSTOCK: Substratspiegel, Enzymaktivitäten und genetische Regulation nach Derepression in pflanzlichen Speichergeweben. *Z. Naturforsch.* (1969) (im Druck).
- LANGE, H.: Vergleichende Histogenese, Atmungsstoffwechsel, Intermediatspiegel und Enzymaktivitäten bei vernarbendem und proliferierendem Kartoffelknollenparenchym. *Habil.-Schr. Joh. Wölg. Goethe-Univ. Frankfurt (Main)* (1969).
- , u. G. ROSENSTOCK: Physiologisch-anatomische Studien zum Problem der Wundheilung. II. Kausalanalytische Untersuchungen zur Theorie des Wundreizes. *Beitr. Biol. Pflanz.* **39**, 383—434 (1963).
- MAHLER, H. R.: The use of amine buffers in studies with enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **92**, 426—439 (1961).
- ROBBIE, W. A.: Use of cyanide in tissue respiration studies. *Methods in medical research* by V. R. POTTER. Chicago 1948.
- SWIM, H. E.: Amine and other nonbicarbonate buffers in cell culture media. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **92**, 440 (1961).

Dr. G. KAHL
Prof. Dr. G. ROSENSTOCK
Dr. H. LANGE
Botanisches Institut
6 Frankfurt a. M., Siesmayerstr. 70