

Regulation und Bedeutung der Peroxidase-Musteränderungen in sproßdifferenzierenden Kalluskulturen von *Nicotiana tabacum* L.*

M. Mäder, P. Münch und M. Bopp

Botanisches Institut der Universität Heidelberg,
Hofmeisterweg 4, D-6900 Heidelberg, Federal Republic of Germany

Eingegangen am 12. Dezember 1974; angenommen am 27. Januar 1975

Regulation of Peroxidase Patterns during Shoot Differentiation in Callus Cultures of *Nicotiana tabacum* L.

Summary. Peroxidase activity and isoenzyme pattern were studied during dedifferentiation of tobacco stem-sections leading to callus formation and during redifferentiation of tobacco callus leading to formation of shoots. These processes are both accompanied by an increase in total peroxidase activity and by characteristic changes in isoenzyme pattern. The isoenzyme pattern of tobacco callus differs from that of tobacco stem-tissue. The plantlets differentiated from the callus show the same pattern as seedlings do.

During the differentiation process, before any buds are visible, the callus shows a peroxidase pattern that is determined by a reduction of fast-migrating anodic isoenzymes and by an increase of activity in all the other peroxidase isoenzymes. The formation of this pattern is independent of the growth regulators responsible for the differentiation; only the kind of differentiation itself determines the pattern.

By artificial inhibition of callus growth it is possible to induce an isoenzyme pattern very similar to that of differentiation; the fast-migrating anodic enzymes are reduced in activity but the others are not increased as they are during differentiation. Therefore the question arises whether there are two independent processes taking place in differentiating callus. The one process, inhibition of growth in the cells that do not differentiate, is accompanied by a reduction of fast-migrating anodic isoenzymes. The other process, formation of meristemoïds in the callus, is accompanied by a sharp rise in peroxidase activity of the other anodic and cathodic isoenzymes.

Einleitung

Peroxidase-Aktivitäts- und Musteränderungen sind bisher für die verschiedensten Pflanzen und Pflanzenorgane beschrieben worden. Am auffälligsten sind diese Änderungen bei Wachstum und Differenzierung (Gardiner and Cleland, 1974; Thomas and Neucere, 1974), bei Alterung (Schaefer, 1971), Verletzung (Birecka *et al.*, 1973), Infektion (Matsuno and Uritani, 1972), Hormonapplikation (Lavee and Galston, 1968) und Lichtwirkung (Schopfer und Plachy, 1973).

Trotz der vielen Untersuchungen war es bisher nicht möglich, die causalen Zusammenhänge der Peroxidase-Musteränderungen zu beleuchten, vor allem weil zu wenig Definitives über die biologische Funktion und die Lokalisation der multiplen Peroxidase-Formen bekannt war.

Nachdem neuerdings zumindest bei Tabakgeweben die eindeutige Lokalisation bestimmter Isoenzyme bzw. Isoenzymgruppen der Peroxidase in der Zellwand

* IAA = Indole-3-essigsäure, 5-FdUrd = Fluordesoxyuridin.

(Lee, 1973; Mäder *et al.*, 1974) und anderer im Cytoplasma (Mäder *et al.*, 1974) nachgewiesen werden konnte und außerdem die Peroxidase-Musteränderungen bei Tabak nur die Zellwandperoxidasen betreffen (Mäder, 1974; Mäder *et al.*, 1974) müssen die Peroxidase-Musteränderungen in Zusammenhang mit der Biochemie der Zellwände gesehen werden, zumal nach Lamport (1970) und Ridge and Osborne (1971) Peroxidasen in der Zellwand zu den spezifischen Zellwandproteinen gehören.

Die folgende Arbeit befaßt sich im wesentlichen mit der Frage, ob die im Tabak-Callus Sproßdifferenzierung auslösenden Phytohormone direkt auf die Peroxidase-Isoenzyme wirken oder ob ihre Änderung eher sekundäre Folgen der durch Phytohormone ausgelösten Differenzierungsprozesse sind.

Material und Methoden

Pflanzen. *Nicotiana tabacum* L. White Burley wurde aus Samen im Gewächshaus angezogen. Calluskulturen wurden aus *ca.* 1 cm langen Sproßsegmenten auf Nähragar nach Murashige and Skoog (1962) oder Nagata and Takebe (1971) angezogen, subkultiviert und zur Differenzierung gebracht. Die Phytohormonkonzentrationen der Nährböden sind, sofern nicht im Text vermerkt, Tabelle 1 zu entnehmen. Die Gewebekulturen wurden in Rundgläsern 25 × 150 mm im 12 h-Tag (2—3000 Lux) und 25° C gehalten.

Extraktion, Aktivitätsmessung, Elektrophorese und Auswertung erfolgte nach den bereits beschriebenen Methoden (Mäder *et al.*, 1974).

Proteinbestimmung wurde nach Biuret durchgeführt.

Tabelle 1

1. MS	IAA 4 mg/l	Kinetin	0,05 mg/l	
2. MS	IAA 2 mg/l	Kinetin	1 mg/l	
3. MS	IAA 2 mg/l	Kinetin	2 mg/l	
4. NT	— —	6-Benzylaminopurin	1 mg/l	
5. NT	— —	6-Benzylaminopurin	1 mg/l	Caseinhydrolysat 5 %

MS = Salze und Vitamine nach Murashige and Skoog. NT = Salze und Vitamine nach Nagata and Takebe.

Ergebnisse

1. Änderung des Peroxidase-Musters beim Übergang von Sproß- zu Callusgewebe

Tabak-Sproßstücke weisen bei diskelektrophoretischer Trennung der Rohextrakte mit Guajakol als Substrat zwei Gruppen von Peroxidase-Isoenzymen auf. Die eine Gruppe (G_I) mit maximal 6 Banden wandert schnell in anodischer Richtung, die andere Gruppe (G_{III}) mit einer starken und zwei schwachen Banden wandert langsam zur Kathode (Abb. 1). Das Auftreten der Peroxidase-Isoenzyme des Tabaks in distinkten Gruppen nach elektrophoretischer Trennung stimmt überein mit den Ergebnissen von Sheen (1969), Ritzert and Turin (1970) und Lee (1972), obwohl diese mit anderen Trennmethode gewonnen wurden.

Werden isolierte Sproßstücke auf einen Nährboden nach Murashige and Skoog (1962) mit 5 mg (2 mg) IAA und 0,5 mg (0,2 mg) Kinetin/l aufgebracht, dann entwickeln sich bereits nach drei Tagen neue Peroxidase-Banden, die von den bisher vorhandenen deutlich abgegrenzt in einer langsam wandernden, anodischen

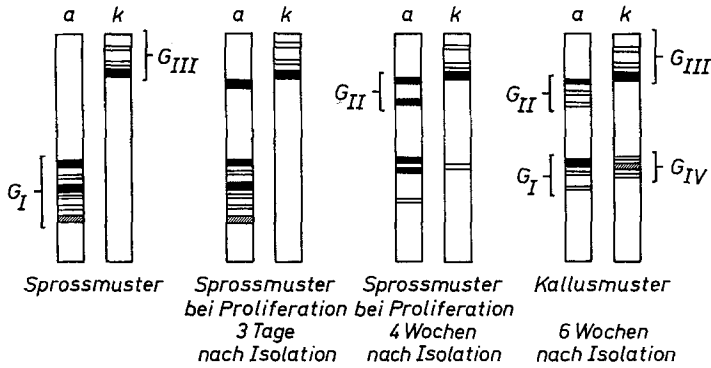


Abb. 1. Veränderung des Peroxidase-Musters während der Dedifferenzierung von Tabak-Sproßgewebe zu Tabak-Callus. *a* anodische Trennung, *k* kathodische Trennung, G_I — G_{IV} (Isoenzymgruppen)

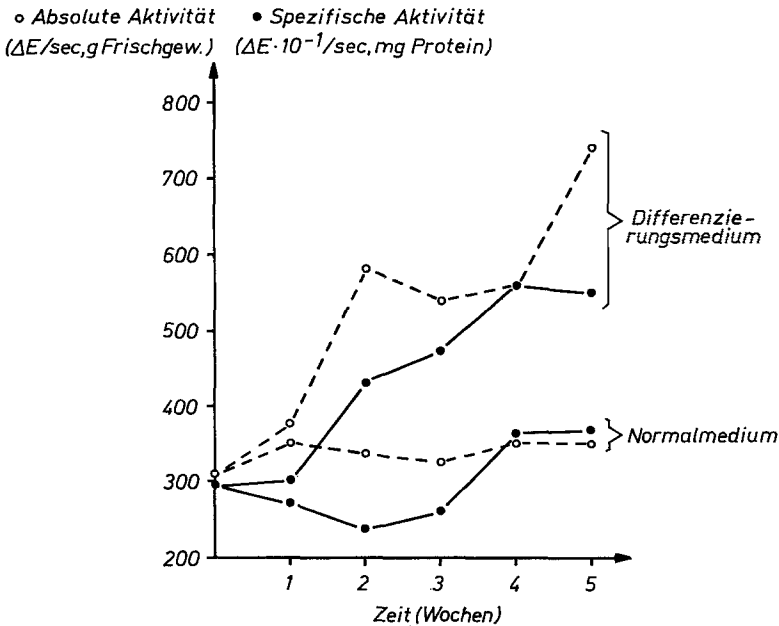


Abb. 2. Peroxidase-Gesamtaktivität während der Sproßdifferenzierung des Tabak-Callus

Gruppe (G_{II}) angeordnet sind (Abb. 1). Diese Gruppe ist bei der intakten Tabakpflanze nur im Wurzelgewebe nachzuweisen, sie ist außerdem charakteristisch für Tumor-, Callus- und Samengewebe (vergl. Mäder *et al.*, 1974).

Die Induktion neuer Banden nach Isolierung von Sproßstücken ist ein oft beschriebener Effekt, der als Wundreaktion angesehen werden muß, denn er findet auch nach einfacher Dekapitation von Sprossen im oberen Sproßteil statt und ist bei Kultivierung von Sproßstücken auf Nährböden auch ohne Phytohormone im Substrat zu finden. Allerdings können Phytohormone die Peroxidase-Neubildung bei den verschiedensten Pflanzen auf unterschiedliche Weise beeinflussen

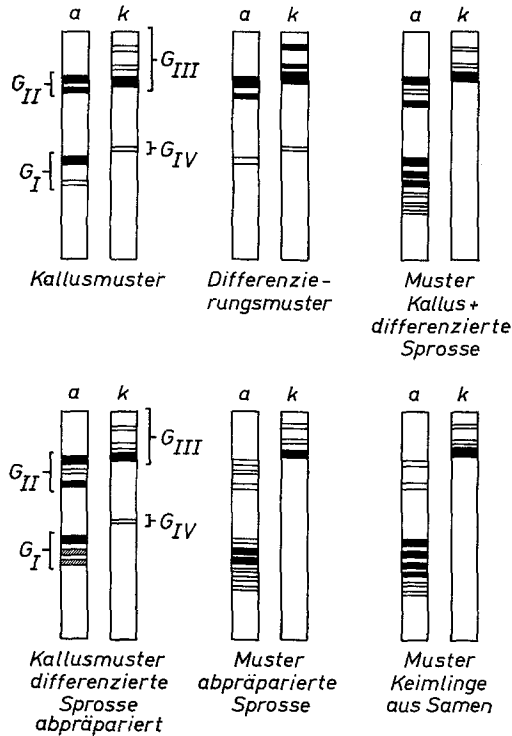


Abb. 3. Veränderung des Peroxidase-Musters während der Sproßdifferenzierung des Tabak-Callus. (Wie aus Abb. 1 und 3 ersichtlich, zeigt das Callusmuster gewisse Variationen. Es konnte inzwischen geklärt werden (unveröffentlicht), daß diese Callusmuster-Variationen physiologisch bedingt sind und mit Alter und Wuchsform des Callus in Zusammenhang stehen.) *a* anodische Trennung, *k* kathodische Trennung, G_I — G_{IV} (Isoenzymgruppen)

(Lavee and Galston, 1968; Birecka and Galston, 1970; Khan *et al.*, 1972; Gaspar *et al.*, 1973).

Während der Proliferation des Sproßgewebes werden neben der Neubildung der Banden von G_{II} und einem allmählichen Anstieg der Gesamtaktivität der Peroxidase die Banden der Gruppe G_I von den ursprünglich 6 auf 3 reduziert. Es entsteht mit der fortschreitenden Entwicklung des Callus letztlich das typische „Callusmuster“, das außer den oben beschriebenen Veränderungen noch eine weitere kathodische Isoenzymgruppe (G_{IV}) aufweist, die aber nur sehr schwach ausgeprägt und nicht immer nachzuweisen ist (Abb. 1 und Abb. 4). Der Callus wurde auf einem Medium nach Murashige and Skoog (1962) mit 2 mg IAA und 0,05 mg Kinetin/l in einem Rhythmus von 4—5 Wochen subkultiviert.

Alle Peroxidase-Isoenzyme des Callus werden ins Nährmedium abgegeben und können hier nachgewiesen werden.

2. Sproßdifferenzierung des Tabak-Callus

Auf Nährböden, die eine der in Tabelle 1 gegebenen Hormonzusammensetzungen haben, differenziert sich der Callus zu Sproß und Blättern. Das Wachs-

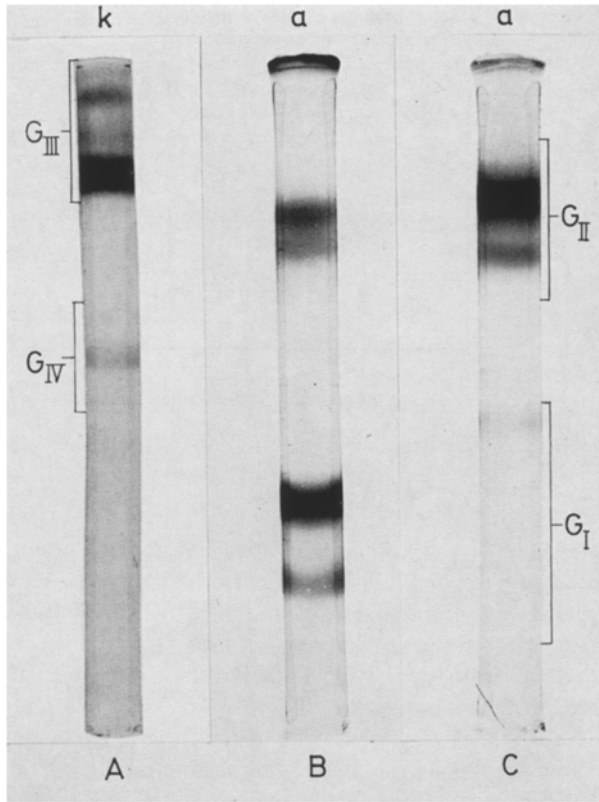


Abb. 4 A—C. Peroxidase-Muster: (A) Callus undifferenziert (Callusmuster), kathodische Trennung (*k*); (B) Callus undifferenziert (Callusmuster), anodische Trennung (*a*); (C) Callus sproßdifferenzierend (Differenzierungsmuster), anodische Trennung (*a*) G_I — G_{IV} (Isoenzymgruppen)

tum des Callus ist dabei gegenüber den nicht differenzierenden, auf normalem Wachstumsmedium wachsenden Kontrollen deutlich verringert. Die Peroxidase-Gesamtaktivität bezogen auf Frischgewicht oder lösliches Protein nimmt jedoch stark zu (Abb. 2). Das Peroxidase-Muster ändert sich während der Differenzierung zweimal. Zunächst werden im Verlaufe der Differenzierungsinduktion die Banden der Gruppe G_I bis auf eine einzige schwach aktive Bande reduziert. Entsprechend dem Anstieg der Peroxidase-Gesamtaktivität werden die Aktivitäten der Gruppen G_{II} und G_{III} gesteigert (Abb. 3 und 4). Ein bis zwei Wochen vor makroskopischem Sichtbarwerden von Knospen ist dieses Muster am deutlichsten ausgebildet. Es tritt bei allen Nährböden (Tabelle 1) in derselben Ausprägung auf, lediglich der Zeitverlauf von Musterbildung und Sproßdifferenzierung ist offensichtlich vom IES-Gehalt im Nährboden abhängig (Abb. 5).

Die zweite Änderung fällt mit dem Sichtbarwerden der differenzierenden Sproßknospen zusammen. Die Aktivitäten der Gruppen G_{II} und G_{III} nehmen wieder entsprechend der Gesamtaktivität ab und die Banden der Gruppe G_I

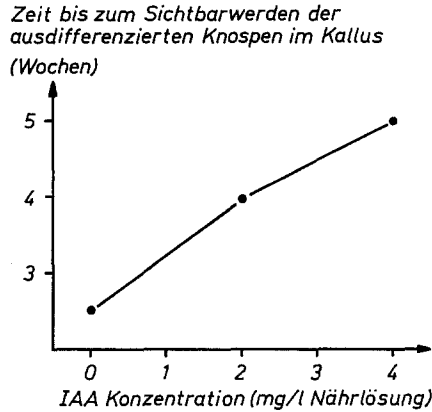


Abb. 5. Abhängigkeit der Differenzierungsdauer von der IAA-Konzentration im Nährboden

treten erneut auf (Abb. 3) und zwar in den auswachsenden Sprossen. Trennt man diese in einem frühen Entwicklungsstadium (wenn der Callus noch nicht ganz und gar von den differenzierenden Sprossen durchwachsen ist) vom Callus ab, so findet man in diesem nur das bekannte typische Callusmuster (Abb. 3). Das gesamte Isoenzympektrum der ausdifferenzierten Pflänzchen stimmt mit dem aus Samen angezogener Keimlinge überein (Abb. 3). Auch dieses Muster ist unabhängig von der Art der Wuchsstoffe im Nährboden. Es unterscheidet sich von dem Muster adulter Pflanzen ebenso wie das Keimlingsmuster durch Anwesenheit der Isoenzymgruppe G_{II} , die bei adulten Pflanzen (wie oben bereits erwähnt) in Sproß, Blatt und Blüte fehlt. Diese Untersuchungen zeigen, daß sich das Peroxidase-Muster unabhängig von der Art der Induktion (Phytohormone im Nährboden) nach der Art der Differenzierung richtet.

In der speziellen Ausprägung des Peroxidase-Musters, des sogenannten „Differenzierungsmusters“, während der Knospeninduktion im Callus können Parallelen gesehen werden zu den von Lee (1972) beschriebenen Musteränderungen bei künstlicher oder hormonal gesteuerter Hemmung des Calluswachstums. Um die Zusammenhänge deutlicher zu machen wurden die folgenden Experimente unternommen.

3. Änderung des Peroxidase-Musters bei Hemmung des Calluswachstums

Kulturen von Tabak-Callus auf Wachstums- oder Differenzierungsnährboden gezogen mit 10^{-4} M 5-FdUrd [nach Capesius und Bopp (1970) ein Hemmstoff der DNA-Synthese und Zellteilung] führte zum völligen Stopp des Wachstums und der Differenzierung. Ähnliche aber nicht ganz so drastische Hemmungen des Callus-Wachstums ließen sich durch Weglassen der Phytohormone oder der Kohlenhydrate im Nährboden erzielen. Unabhängig vom Nährboden und von den Wachstumshemmung bedingenden Ursachen wurden analog den Versuchen von Lee (1972) die Banden der schnell wandernden anodischen Gruppe (G_I) reduziert (Abb. 6). Bei den mit 5-FdUrd auf Differenzierungsnährboden gehemmten Calli

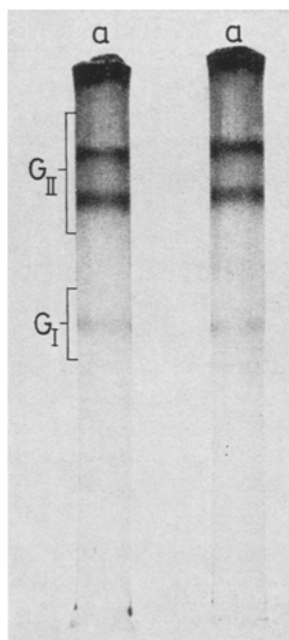


Abb. 6. Peroxidase-Muster bei künstlicher Hemmung von Calluswachstum und -differenzierung mit 5-FdUrd (10^{-4} M) im Nährboden, anodische Trennung (a). G_{I} — G_{II} (Isoenzymgruppen). (Vgl. dazu auch Abb. 4)

erfolgte der Übergang am schnellsten. Vielleicht addieren sich hier die wachstumshemmenden Effekte von 5-FdUrd und Differenzierungsnährboden (vgl. oben).

Bei der künstlichen Wachstumshemmung des Tabak-Callus unterbleibt auf jeden Fall ein Anstieg der Peroxidase-Gesamtaktivität und auch die Erhöhung der Aktivitäten der Gruppen G_{II} und G_{III} . Das zeigt, daß bei der Differenzierung des Callus neben der eventuell mit der Wachstumshemmung in Zusammenhang stehenden Reduktion der Banden in G_{I} noch andere, die Peroxidase deutlich beeinflussende Prozesse ablaufen müssen.

Diskussion

Beide Prozesse, die Dedifferenzierung von Tabak-Sproßgewebe zu Tabak-Callusgewebe und die Redifferenzierung von Tabak-Callus zu Sprossen und Blättern, sind mit charakteristischen Änderungen der Peroxidase-Muster verbunden. Von den Änderungen werden im wesentlichen die Zellwand-lokalisierten Isoenzyme betroffen (vgl. Mäder *et al.*, 1974). Die vom Callus ausdifferenzierten Sprosse und Blätter zeigen gleiche Muster wie die Ausgangspflanzen. Beide Prozesse sind begleitet von einem starken Anstieg der Peroxidase-Gesamtaktivität. Die Dedifferenzierung wird mit der Ausbildung eines stabilen Callusmusters beendet. Für die Induktionsphase der Redifferenzierung ist ein sogenanntes „Differenzierungsmuster“ charakteristisch, das erst später in Sproß- bzw. Blatt-

muster übergeht. Dieser letztere Übergang, der mit einem erneuten Auftreten der schnell wandernden anodischen Isoenzyme verknüpft ist, wurde ähnlich für Embryo-differenzierendes Karottengewebe beschrieben (Wochok and Burleson, 1974). Alle Isoenzyme der Gewebe werden auch in den entsprechenden Nährböden nachgewiesen. Im Gegensatz zu Ritzert und Turin (1970) wurden keine Isoenzyme gefunden, die nur im Nährboden auftreten.

Wie durch künstliche Hemmung des Calluswachstums nachgewiesen werden konnte, kommt das „Differenzierungsmuster“ aufgrund zweier gegenläufiger Prozesse zustande, einmal dem Abbau der schnell wandernden anodischen Banden, zum anderen der Aktivitätserhöhung aller übrigen Isoenzyme. In beiden Fällen, der Dedifferenzierung und der Redifferenzierung ist die Änderung des Peroxidase-Musters von der ausgelösten Differenzierungsform (Callus, Sproß, Blatt) abhängig (vergl. dazu Simola, 1973) und nicht von der auslösenden Faktorenkombination (Phytohormone). Die verschiedenen Muster sind demnach nicht die direkten Folgen eines Hormoneingriffs (vgl. hierzu Lavee and Galston, 1968; Gaspar *et al.*, 1973) und es läßt sich keine Kausalbeziehung Phytohormon-Musteränderung ableiten.

Auf jeden Fall stehen die Musteränderungen in Zusammenhang mit der Ausbildung der Zellwände (Mäder *et al.*, 1974) wobei zu klären bleibt, ob veränderte Peroxidase-Isoenzyme zur Ausbildung veränderter Zellwände [eventuell über Ligninsynthese (Harkin and Obst, 1973)] beitragen oder ob sie in veränderten Zellwänden Sekundärfunktionen wie IAA-Oxidation, Infektionsabwehr usw. übernehmen.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

- Birecka, H., Briber, K. A., Catalfamo, J. L.: Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid and ethylene effects. *Plant Physiol.* **52**, 43—49 (1973)
- Capesius, I., Bopp, M.: DNA-Synthesehemmung durch 5-FdUrd bei *Sinapis alba* L. *Z. Naturforsch.* **25b**, 1475—1477 (1970)
- Gardiner, M. G., Cleland, R.: Peroxidase changes during the cessation of elongation in *Pisum sativum* stems. *Phytochemistry* **13**, 1095—1098 (1974)
- Gaspar, T., Khan, A. A., Fries, D.: Hormonal control of isoperoxidases in lentil embryonic axis. *Plant Physiol.* **51**, 146—149 (1973)
- Harkin, J. M., Obst, J. R.: Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science* **180**, 296—298 (1973)
- Khan, A. A., Gaspar, T., Roe, C. H., Bouchet, M., Dubuco, M.: Synthesis of isoperoxidases in lentil embryonic axis. *Phytochemistry* **11**, 2963—2969 (1972)
- Lamport, D. T. A.: Cell wall metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**, 235—270 (1970)
- Lavee, S., Galston, A. W.: Hormonal control of peroxidase activity in cultured perlargonium pith. *Amer. J. Bot.* **55**, 890—893 (1968)
- Lee, T. T.: Interaction of cytokinin, auxin and gibberellin on peroxidase isoenzymes in tobacco tissue cultured in vitro. *Canad. J. Bot.* **50**, 2471—2477 (1972)
- Lee, T. T.: On extraction and quantitation of plant peroxidase isoenzymes. *Physiol. plantarum* (Cph.) **29**, 198—203 (1973)
- Mäder, M.: Über Lokalisation und Regulation der Peroxidase-Isoenzyme in differenzierenden Calluskulturen von *Nicotiana tabacum* L. *Dokt.-Dissertation Universität Heidelberg* (1974)
- Mäder, M., Meyer, Y., Bopp, M.: Lokalisation der Peroxidase-Isoenzyme in Protoplasten und Zellwänden von *Nicotiana tabacum* L. *Planta* (Berl.) **122**, 259—268 (1975)

- Matsuno, H., Uritani, I.: Physiological behavior of peroxidase isoenzymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. *Plant Cell Physiol.* **13**, 1091—1101 (1972)
- Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plantarum (Cph.)* **15**, 473—457 (1962)
- Nagata, T., Takebe, Y.: Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta (Berl.)* **99**, 12—20 (1972)
- Ritzert, R. W., Turin, B. A.: Formation of peroxidases in response to indole-3-acetic acid in cultured tobacco cells. *Phytochemistry* **9**, 1701—1705 (1970)
- Schaefer, H.: Vergleichende Untersuchungen über das Auftreten von Isoenzymen der Peroxidase in den Blättern und Triebspitzen der Rebe. *Weinwissenschaften* **26**, 112—134 (1971)
- Schopfer, P., Plachy, C.: Die organspezifische Photodetermination der Entwicklung von Peroxidaseaktivität im Senfkeimling (*Sinapis alba* L.) durch Phytochrom. *Z. Naturforsch.* **28**, 296—301 (1973)
- Sheen, S. J.: The distribution of polyphenols, chlorogenic acid oxidase and peroxidase in different plant parts of tobacco, *Nicotiana tabacum* L. *Phytochemistry* **8**, 1839—1847 (1969)
- Simola, L. K.: Changes in the activity of several enzymes during root differentiation in cultured cells of *Atropa belladonna*. *Z. Pflanzenphysiol.* **68**, 373—378 (1973)
- Thomas, D. L., Neucere, N. J.: A comparative investigation of peroxidases from germinating peanuts (*Arachis hypogaea*) electrophoresis. *Amer. J. Bot.* **61**, 457—463 (1974)
- Wochok, Z. S., Burselson, B.: Isoperoxidase activity and induction in cultured tissues of wild carrot: a comparison of Proembryos and Embryos. *Physiol. plantarum (Cph.)* **31**, 73—75 (1974)