

# Wachstums-„burst“ nach Anaerobiose: ein „stored growth“-Effekt beim Streckungswachstum von Koleoptilen

Growth Burst after Anaerobiosis: a “Stored-Growth” Effect in *Avena* Coleoptiles

A. Krauß und A. Hager

Institut für Biologie I der Universität Tübingen

(Z. Naturforsch. 31 c, 312–316 [1976]; eingegangen am 25. Februar 1976)

Herrn Prof. Bünning zum 70. Geburtstag gewidmet

Coleoptiles, Growth Enhancement, Auxin Effect, Anaerobiosis

Extension growth of 1-cm segments of *Avena* coleoptiles (studied in liquid medium by means of a flow chamber) was anomalously increased after short anaerobic treatment. The normal growth rate in air-saturated medium without indole-3-acetic acid (IAA) was about  $5 \mu\text{m}/\text{min}$ ; the rate decreased under anaerobiosis to about  $1 \mu\text{m}/\text{min}$ , followed by an increase up to  $30 \mu\text{m}/\text{min}$  when aerobic conditions were restored. This “growth burst” continued for about 10 min; then the rate decreased to the initial value of  $5 \mu\text{m}/\text{min}$ . In the same segment growth enhancement could be induced repeatedly by anaerobic treatments. The phenomenon of growth burst after anaerobiosis may be named “anaerobiosis-aerobiosis-transition effect” (ANA-effect).

The ANA-effect was also observed under conditions of acid-induced growth at pH 4. Furthermore it appeared in coleoptile segments whose growth rate had already been enhanced by IAA.

Anaerobic pre-treatment not only stimulated extension growth but when applied before IAA addition also overcame the lag phase of IAA-induced growth enhancement.

It is supposed that a compound essential for coleoptile growth is accumulated during anaerobiosis; such compound together with oxygen may cause the observed growth burst. Possible candidates for this compound are discussed.

Eine Analyse der auxininduzierten Reaktionen im Cytoplasma, am Plasmalemma und in der Zellwand könnte erleichtert werden, wenn die einzelnen Schritte zeitlich auseinandergezogen und somit nacheinander zum Ablauf gebracht werden könnten. Ein solcher Versuch ist z. B. von Ray<sup>1</sup> gemacht worden, welcher durch eine Sistierung der Zellstreckung bei Koleoptilen mit Hilfe isotonischer Mannitlösungen zu klären versuchte, ob unter solchen Bedingungen die auxinbedingte Erhöhung der Zellwandplastizität fortschreitet. Er fand nach Aufhebung der isotonischen Bedingungen eine verglichen mit der Kontrolle erhöhte Wachstumsrate, die nach etwa 35–40 min wieder auf die normale Rate absank. Ray bezeichnete dieses Phänomen als „stored-growth“-Effekt. Allerdings konnte dieser Effekt bei einer Wiederholung durch Cleland und Rayle<sup>2,3</sup> nicht wieder gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wird ein „stored-growth“-Effekt beschrieben, der nach Anaerobiose in Erscheinung tritt. Die Geschwindigkeit des Streckungswachstums von Koleoptilsegmenten, die während einer eingeschobenen anaeroben Phase nahezu

Null ist, steigt nach Sauerstoffzugabe sprunghaft an und liegt etwa 10 min lang weit über der normalen Wachstumsrate. Dieser Wachstums-„burst“, der im folgenden als *Anaerobiose-Aerobiose-Übergangseffekt* (ANA-Effekt) bezeichnet wird, bietet die Möglichkeit, bestimmte Eigenschaften und Parameter des Streckungswachstums besonders günstig verfolgen und messen zu können und gewährt neue Einblicke in die Vorgänge beim Streckungswachstum; er zeigt, daß während der anaeroben Phase eine für die Zellstreckung essentielle Substanz akkumuliert wird oder eine Zustandsänderung erfolgt, die dann bei Anwesenheit von  $\text{O}_2$  unmittelbar zur Zellstreckung führt.

## Material und Methodik

### Anzucht von *Avena sativa*

„Siegeshafer I“ der Fa. Svalöf, Schweden, wurde auf feuchtem Zellstoff, bedeckt mit feuchtem Sägemehl, im Dunkeln bei  $21^\circ\text{C}$  und 90% rel. Feuchtigkeit angekeimt.

### Messung des Streckungswachstums der *Avena*-Koleoptilen in einer Durchflußkammer

Für die Versuche wurden 5 Tage alte, 18–20 mm lange Koleoptilen ausgewählt. Die Koleoptilspitzen

Requests for reprints should be sent to Prof. A. Hager, Institut für Biologie I, Auf der Morgenstelle 1, D-7400 Tübingen.

wurden in der Länge von 3 mm abgeschnitten und die darauf folgenden Segmente von 10 mm Länge verwendet. Die Primärblätter wurden entfernt. Die Koleoptil-Segmente wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn 2 min in Aqua bidest. bzw. Puffer unter Vakuum infiltriert. Dadurch wurde während der Versuche an den Zellen der Koleptilen ein schnellerer Gas- und Lösungsmittelwechsel erreicht. Außerdem verminderte sich der Auftrieb der Koleptilen in der Wachstumskammer.

Zur Beobachtung des Wachstums diente ein Horizontalmikroskop der Fa. Leitz, Wetzlar, mit einer zusätzlichen Mikrometerschraube zur Feineinstellung. Es enthielt ein Zeiss-Objektiv mit zehnfacher und ein Mikrometer-Okular mit sechsfacher Vergrößerung. Damit konnte bis zu einer Genauigkeit von  $2\text{ }\mu\text{m}$  gemessen werden. Als Lichtquelle diente eine Mikroskopierlampe mit vorgeschaltetem Grünfilter (kombiniert aus UVILEX-Glas der Fa. Schöninger, München, und 2 Schichten CELLON-Grünfilter der Fa. Gummi-Menzel, München).

Das Wachstum der Koleoptilsegmente wurde in einer senkrecht stehenden Plexiglas-Kammer ( $34 \times 22 \times 7\text{ mm}$  Außenmaße) gemessen<sup>4</sup>. Die Zu- und Ableitungen bestanden aus Glasrohr mit kurzen Silikonschlauch-Verbindungen. Die Lösungen wurden durch zwei in einem Wasserbad befindliche Glasrohrwendel geleitet und so auf die gewünschte Temperatur gebracht (Kontrolle nach Durchströmen der Wachstumskammer). Die Durchströmungsgeschwindigkeit betrug ca.  $25\text{ ml/min}$ ; Temperaturkonstanz wurde nach Durchfluß von ca. 10 bis  $100\text{ ml/min}$  erreicht. Die Geschwindigkeit wurde durch einen Quetschhahn am Ableitungsschlauch unterhalb der Wachstumskammer reguliert. — Der Lösungswechsel erfolgte durch Drehen eines Patenthahnes mit zwei schrägen Bohrungen vor der Wachstumskammer. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde nach dem Umschalten kurzzeitig erhöht, um den Lösungswechsel zu beschleunigen. — Wachstumskammer und Umschaltahhnen waren auf ein Gestell geschraubt, das fest mit dem Horizontalmikroskop verbunden war. Die Lösungen wurden in den Vorratsgefäßen ab 45 min vor Versuchsbeginn und während der Versuche mit Luft bzw.  $\text{N}_2$  durchperlt. Zur Stickstoffsättigung der Lösungen wurde Stickstoff speziell der Fa. Messer Griesheim, Dortmund, verwendet, aus dem Reste an Sauerstoff durch Chemisorption mit Hilfe einer Oxisorb-Patrone (Chromtrioxid an Kieselgel) entfernt wurden.

Die Messung der Längenänderung der Koleoptilsegmente in der Durchflußkammer erfolgte in Abständen von 1 min. Die abgebildeten Kurven des Wachstumsverlaufes der Segmente sind Durchschnittswerte aus jeweils 6–8 Einzelversuchen. Die

dem Mittelwert entsprechenden Wachstumskurven wurden abgebildet.

### Chemikalien

IES (Indol-3-essigsäure) wurde von Serva, Heidelberg, bezogen.

### Ergebnisse

Abb. 1 zeigt die nach Anaerobiose anomal veränderte Wachstumsrate 1 cm langer Koleoptil-Seg-

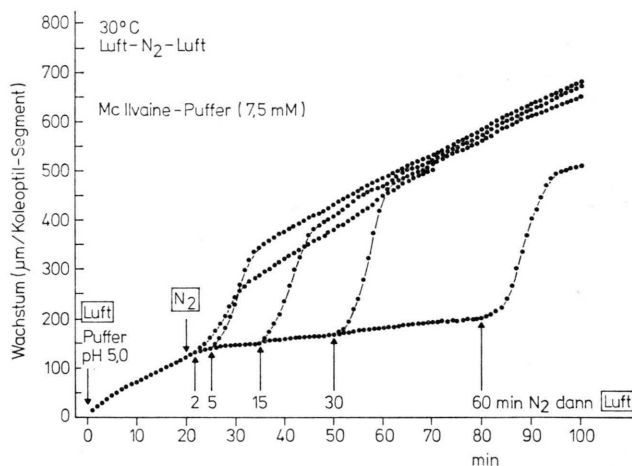


Abb. 1. Wachstumsverlauf 1 cm langer Koleoptilsegmente von *Avena sativa* in Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0. In  $\text{O}_2$ -freiem Puffer ( $\text{N}_2$ -gesättigt) erfolgt Sistierung des Wachstums; nach erneuter Zugabe von lufthaltigem Puffer ist etwa 10 min lang eine Art Superwachstum zu beobachten (ANA-Effekt).

mente, die sich in Pufferlösung pH 5,5 befinden. Während des Versuchs sind 4 Geschwindigkeitsphasen beim Streckungswachstum zu unterscheiden: 1. die normaler Wachstumsrate in lufthaltigem Puffer ( $5\text{ }\mu\text{m/min}$ ); 2. die auf  $1\text{ }\mu\text{m/min}$  reduzierte Wachstumsrate unter anaeroben Bedingungen; 3. die unmittelbar nach  $\text{O}_2$ -Zugabe stark erhöhte Rate ( $30\text{ }\mu\text{m/min}$ ), der sog. „stored growth“-Effekt; 4. die Phase mit einer ähnlichen Wachstumsrate wie unter Phase 1 ( $4\text{--}5\text{ }\mu\text{m/min}$ ).

Ein „stored growth“-Effekt ist bereits nach 5 min Anaerobiose deutlich zu beobachten. Der Wachstums-„burst“ nach  $\text{O}_2$ -Zugabe dauert dann unabhängig von der Länge der Anaerobiose-Vorbehandlung etwa 10 min.

Befindet sich das Koleoptil-Segment während des Versuchs in IES-Lösung ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ), eingestellt auf pH 5,5, so ist in der  $\text{O}_2$ -haltigen Lösung nach einer lag-Phase von etwa 10 min eine Auxin-bedingte

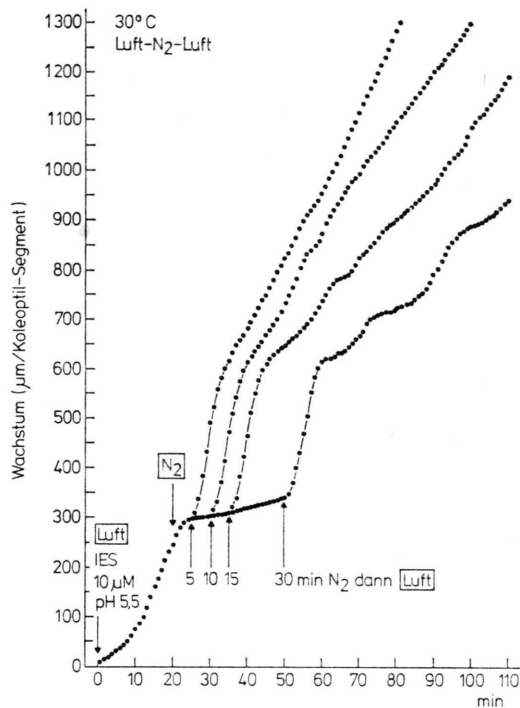


Abb. 2. Wachstumsverlauf von Koeptilsegmenten nach Zugabe von IES (eingestellt auf pH 5,5). Nach Sistierung des Wachstums unter verschiedenen langen anaeroben Bedingungen ist nach erneuter Luftzufuhr 10 min lang eine weitere Steigerung der Wachstumsrate über den Wert vor der eingeschalteten anaeroben Phase zu beobachten.

starke Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit festzustellen (Abb. 2). Dennoch läßt sich auch hier nach verschiedenen langen Zeiten der Anaerobiose (5–30 min) eine weitere Steigerung der Wachstumsrate und damit ein „stored growth“-Effekt nachweisen. Nach Abklingen dieses Effektes verläuft die Wachstumskurve vor allem der Segmente, die sich längere Zeit unter Anaerobiose befunden hatten, in charakteristischen Wellenbewegungen.

Abb. 3 zeigt, daß der ANA-Effekt an ein und demselben Koeptil-Segment mehrmals hintereinander hervorgerufen werden kann; des weiteren wird deutlich, daß eine nachfolgende IES-Zugabe bei Anwesenheit von O<sub>2</sub> zu der erwarteten Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit führt, daß aber auch in diesem Falle durch eine eingeschobene O<sub>2</sub>-freie Phase nochmals eine Steigerung der Geschwindigkeit erzielbar ist.

Abb. 4 beweist, daß das säureinduzierte Wachstum<sup>4–6</sup>, das bei einem Außen-pH-Wert von 4,0 auch unter anaeroben Bedingungen fast unverändert anhält, dennoch einen ANA-Effekt zeigt.

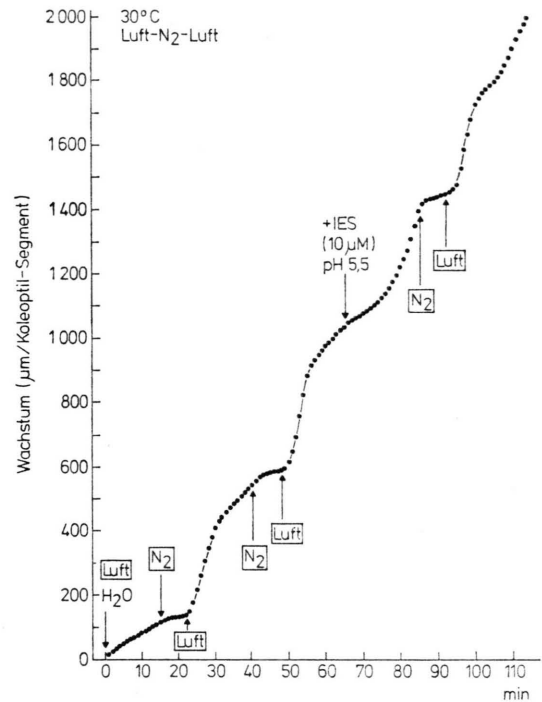


Abb. 3. Wachstumsverlauf von Koeptilsegmenten. Mehrmalige Auslösung des ANA-Effektes während des Streckungswachstums ein- und derselben Koeptile in auxin-freier und auxinhaltiger Lösung.

Von besonderem Interesse ist die in Abb. 5 dargestellte Dominanz des ANA-Effektes über die lag-Phase des Auxin-induzierten Wachstums. Nach Zugabe von IES würde — wie die Kurve II zeigt — erst nach etwa 10 min die Wachstumsgeschwindigkeit stärker zunehmen. Gibt man Auxin aber nach einer Phase der Anaerobiose, steigt die Geschwindigkeit (durch den ANA-Effekt) sofort an. Nach Aufhören des ANA-Effektes (nach etwa 10 min) wird die Wachstumsrate aber nicht wieder vermindert, da nun die eigentliche Auxin-Wirkung zum Tragen kommt; die Wachstumsgeschwindigkeit bleibt unverändert hoch.

### Diskussion

Aus dem dargestellten Wachstumsverlauf von Koeptil-Segmenten bei einem Wechsel von aeroben zu anaeroben und schließlich wieder zu aeroben Bedingungen (Abb. 1) kann gefolgert werden, daß während der anaeroben Phase eine Substanz akkumuliert wird (Abb. 6) oder eine Zustandsänderung im molekularen Gefüge der Zellen stattfindet, welche für das Streckungswachstum von wesentlicher Be-

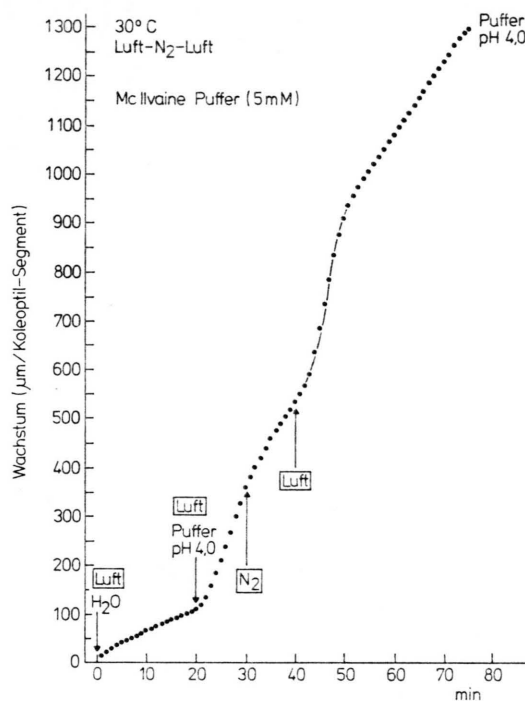


Abb. 4. Säureinduziertes Wachstum, ausgelöst durch Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,0), wird in der anaeroben Phase kaum gehemmt; nach Zufuhr von Luft zeigt es eine weitere Steigerung der Wachstumsrate.

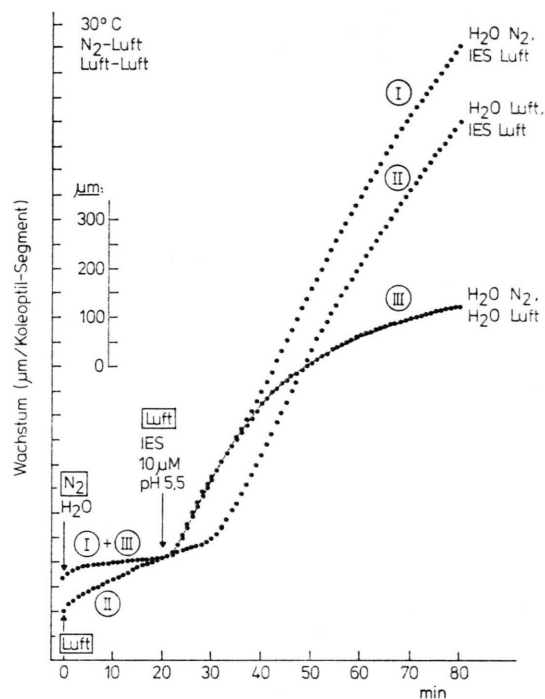


Abb. 5. Aufhebung der lag-Phase beim auxininduzierten Streckungswachstum durch den ANA-Effekt. Kurve III: Wachstumsverlauf von Koleoptilsegmenten in  $H_2O$  unter anaeroben, dann aeroben Bedingungen (ANA-Effekt); Kurve II: Wachstum in  $H_2O$ , dann IES-Lösung unter aeroben Bedingungen (lag-Phase beim auxininduzierten Streckungswachstum); Kurve I: Wachstum in  $H_2O$ , unter anaeroben, dann mit IES unter aeroben Bedingungen (Aufhebung der lag-Phase).

deutung ist. Aber erst im Moment der  $O_2$ -Zugabe führt diese Substanzanhäufung (oder Zustandsänderung) zu einem explosionsartigen Wachstum, das etwa 10 min anhält, d. h. solange, bis die während der Anaerobiose über das normale Maß hinaus angehäuften Substanz verbraucht ist (oder sonstige Veränderungen rückgängig gemacht worden sind).

In einer kürzlich aufgestellten Hypothese<sup>4</sup> wird angenommen, daß das Streckungswachstum dadurch ausgelöst wird, daß Auxin als Effektor einer membrangebundenen anisotropen  $H^+$ -ATPase wirkt; diese durch Auxin aktivierbare Protonenpumpe soll dann mit Hilfe von Atmungsenergie die Protonenkonzentration in einem Kompartiment an oder in der Zellwand erhöhen, wodurch wiederum eine enzymatische Zellwunderweichung und die Zellstreckung eingeleitet werden. Direkte Hinweise für eine Auxin-induzierte Protonenabgabe wurden in der Zwischenzeit von mehreren Autoren erbracht<sup>7-12</sup>. Im Hinblick auf diese Hypothese könnte man sich vorstellen, daß unter anaeroben Bedingungen in den Zellen ein erhöhter Reduktionsdruck zustande

kommt, der sich in einer Akkumulation von reduzierten Verbindungen (z. B. von NADH) manifestiert; bei Umschalten auf Aerobiose könnte dieses erhöhte Angebot von Reduktanten *via* Atmungskette zu einem erhöhten ATP-Angebot und damit zu einer maximalen Pumpleistung der  $H^+$ -ATPasen beitragen.

Allerdings wäre es im Falle von NADH schwer vorstellbar, daß die Größe des Pools für eine 10 min anhaltende Erhöhung der Wachstumsrate ausreichen würde, es sei denn, NADH wird während dieser Zeit durch die Umwandlung einer anderen akkumulierten Substanz ständig nachgeliefert. Als speicherfähige Substanzen kämen organische Säuren in Betracht, welche mit Hilfe von Dehydrogenasen dann den NADH-Spiegel einige Zeit über dem normalen Maß halten könnten. Eine Akkumulation von organischen Säuren ist z. B. in Kartoffelgeweben<sup>13, 14</sup> und in Extrakten von Erbsen<sup>15</sup> während einer Phase der Anaerobiose nachgewiesen worden.

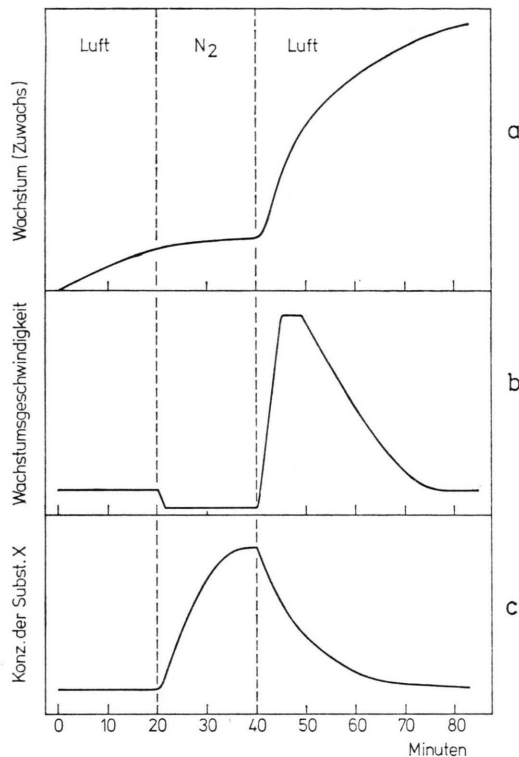


Abb. 6. Postulierte Konzentrationsänderung eine hypothetischen, für das Streckungswachstum essentiellen Verbindung x in den Segmenten von Koeptilen während des Wechsels von aeroben zu anaeroben und wieder aeroben Bedingungen (Kurve c). Streckungswachstum (Kurve a) und Wachstumsgeschwindigkeit (Kurve b) der Segmente unter denselben Bedingungen (schematisch).

Geht man von einer Ansammlung organischer Säuren während der Anaerobiose aus, wäre auch noch ein anderer Mechanismus für die Auslösung

des Wachstums-„burst“ denkbar. Da durch die Tätigkeit der oben erwähnten ATP-abhängigen Protonenpumpen eine pH-Erhöhung im Plasma eintreten müßte, könnten organische Säuren notwendig sein, das nicht exportierte  $\text{OH}^-$ -Ion zu neutralisieren<sup>16</sup>. Die elektrogenen  $\text{H}^+$ -Pumpen wären dadurch eine begrenzte Zeit imstande, effektiver zu arbeiten, d. h. den beobachteten Wachstums-„burst“ hervorzurufen.

Welche der genannten Möglichkeiten den ANA-Effekt auslöst, kann noch nicht entschieden werden.

- <sup>1</sup> P. M. Ray, Control Mechanisms in Cellular Processes, p. 185–212 (D. M. Bonner, ed.), Ronald Press, New York 1961.
- <sup>2</sup> R. Cleland u. D. L. Rayle, *Planta* **106**, 61–71 [1972].
- <sup>3</sup> D. L. Rayle u. R. Cleland, *Planta* **104**, 282–296 [1972].
- <sup>4</sup> A. Hager, H. Menzel u. A. Krauß, *Planta* **100**, 47–75 [1971].
- <sup>5</sup> A. Hager, Habil.-Schrift, Naturw. Fakultät, Univ. München 1962.
- <sup>6</sup> D. L. Rayle u. R. Cleland, *Plant Physiol.* **46**, 250–253 [1970].
- <sup>7</sup> R. Cleland, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **70**, 3092–3093 [1973].
- <sup>8</sup> M. L. Evans, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**, 195–223 [1974].
- <sup>9</sup> H. P. Haschke u. U. Lüttge, *Z. Naturforsch.* **28 c**, 555–558 [1973].
- <sup>10</sup> E. Marrè, P. Lado, R. Rasi-Caldogno u. R. Colombo, *Plant Sci. Lett.* **1**, 179–184 [1973].
- <sup>11</sup> D. L. Rayle, *Planta* **114**, 63–73 [1973].
- <sup>12</sup> Y. Yamagata u. Y. Masuda, *Plant Cell Physiol.* **16**, 41–52 [1975].
- <sup>13</sup> M. A. Aziz Khan, *Aust. J. Biol. Sci.* **26**, 1081–1086 [1973].
- <sup>14</sup> J. Barker u. L. W. Mapson, *Proc. Roy. Soc.* **125**, 383–402 [1963].
- <sup>15</sup> D. D. Davies, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**, 513–529 [1973].
- <sup>16</sup> H. P. Haschke u. U. Lüttge, *Plant Physiol.* **56**, 696–698 [1975].