

Einfluß von Zeatin auf Atmung und Photosynthese der Mesophyll- Protoplasten von *Petunia*

U. KULL* und F. HOFFMANN**

*Biologisches Institut der Universität Stuttgart
und **Lehrstuhl für Botanische Entwicklungsphysiologie der Universität Hohenheim

Influence of Zeatin on Respiration and Photosynthesis of Mesophyll Protoplasts of *Petunia*

Abstract. Application of 1 ppm zeatin raises the respiration rate (measured by the Warburg method) of leaf mesophyll protoplasts of *Petunia hybrida* by about 50% after 4 h; afterwards there is a rapid decrease. While the rate of respiration in the controls rises after 5 to 6 h, 1 ppm zeatin has a strong inhibitory effect. When the protoplasts are incubated with 0.1 ppm zeatin the rise in the rate is much slower, and after 7 h the rate is 30 % higher than in the controls. Abscisic acid (10 ppm) decreases the respiration rate so that after 5 h it is less than half that of the controls. Later on there is a rise as in the controls, perhaps caused by senescence promoting effects of abscisic acid. The photosynthetic rate of the mesophyll protoplasts measured by $^{14}\text{CO}_2$ fixation decreases with increasing age of the preparation. The protoplasts previously incubated with zeatin for 1 to 3 h show an increase in photosynthesis: with 0.1 ppm zeatin the ^{14}C -fixation rate is higher the longer the hormone could operate. With 1 ppm zeatin we get a typical optimum curve similar to that for respiration. These optimum curves indicate the inhibitory effect of high concentrations of zeatin on respiration and photosynthesis.

Additional index words: zeatin; abscisic acid; protoplasts; respiration; photosynthesis.

Pflanzliche Protoplasten sind ein sehr geeignetes Versuchsobjekt für Untersuchungen, bei denen Substanzen aus dem Milieu aufgenommen werden, da die Stoffe die Zelloberfläche direkt erreichen. Daher ist es naheliegend, sie für Versuche über die physiologische Wirkung von Phytohormonen heranzuziehen; bisher sind allerdings nur Untersuchungen mit Auxinen bekannt geworden (GREGORY u. COCKING 1966; POWER und COCKING 1970; BAYER 1973). In Fortsetzung von Arbeiten über den Einfluß von Zeatin auf die Atmung grüner Blätter (MAILÄNDER und KULL 1973) schien es von Interesse, entsprechende Versuche mit Protoplasten auszuführen, nachdem die grundsätzlichen Phänomene bezüglich der Atmung der Protoplasten geklärt waren (HOFFMANN *et al.* 1974). Einige Untersuchungen mit Abscisinsäure schlossen sich an. Ferner wurde der Einfluß von Zeatin auf die Photosyntheserate der Protoplasten durch Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung aus $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ geprüft. Die

Eingegangen am 29. November 1973

*Adressen: D 7000 Stuttgart 60, Ulmer Str. 227, BRD.

**D 7000 Stuttgart 72, BRD.

photosynthetische Aktivität von Protoplasten aus Blattgewebe ist schon von KANAI und EDWARDS (1973) und von WEGMANN und MÜHLBACH (1973) nachgewiesen worden.

Material und Methoden

Die Gewinnung der Mesophyll-Protoplasten

aus *Petunia hybrida* erfolgte nach dem bei POTRYKUS und DURAND (1972) und HOFFMANN (1973) beschriebenen Verfahren.

Atmungsmessungen

Die Messung der Atmungsintensität erfolgte mit der direkten Warburg-Methode (vgl. HOFFMANN *et al.* 1974).

Zeatin gelangte in insgesamt 5 Versuchsserien jeweils in Konzentrationen von 1 ppm = 4,56 $\mu\text{mol l}^{-1}$ und 0,1 ppm = 0,456 $\mu\text{mol l}^{-1}$, Abscisinsäure in 3 Versuchsreihen in einer Konzentration von 10 ppm = 38 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in Mannitmedium zur Anwendung. Die Einwirkung der Phytohormone begann 20 bis 30 min vor Beginn der Atmungsmessungen.

Messung der Photosyntheseintensität

Die Protoplastensuspension wurde zunächst im Mannitmedium 1—3 h mit Zeatin der Konzentration 0,1 ppm bzw. 1 ppm vorinkubiert. Danach erfolgte die Messung der Photosyntheserate bei einer Belichtungsdauer von 30 min. Als Medium diente 0,4 M Mannit/0,23 M NaHCO_3 im Verhältnis 95 : 5, eingestellt auf pH 7,2 mit 0,22 M HCl. Ein ml Medium enthielt 10^6 Protoplasten; nach Abzug des Protoplasten-Volumens errechnet sich daraus ein CO_2 -Gehalt von 9,72 μM . Die Beleuchtung erfolgte mit 2×100 W Krypton-Lampen (5 000 lx an der Suspensionsoberfläche) bei 24 °C Wasserbad-Temperatur. Zu jeder Probe wurden 2 $\mu\text{C } ^{14}\text{C}$ ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) zugegeben. Nach 30 min erfolgte die Abtötung und Extraktion durch Zugabe von heißem Äthnaol. Dann wurde scharf abzentrifugiert, der Überstand eingedampft und in 60% Äthanol aufgenommen.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Szintillationszähler im Dioxan-Cocktail mit 83% Ausbeute.

Die Chlorophyll-Bestimmung

bei Aliquoten der Protoplasten-Suspension (als Bezugsgröße für die Photosynthese-Leistung) erfolgte durch Messung der Extinktion bei 652 nm.

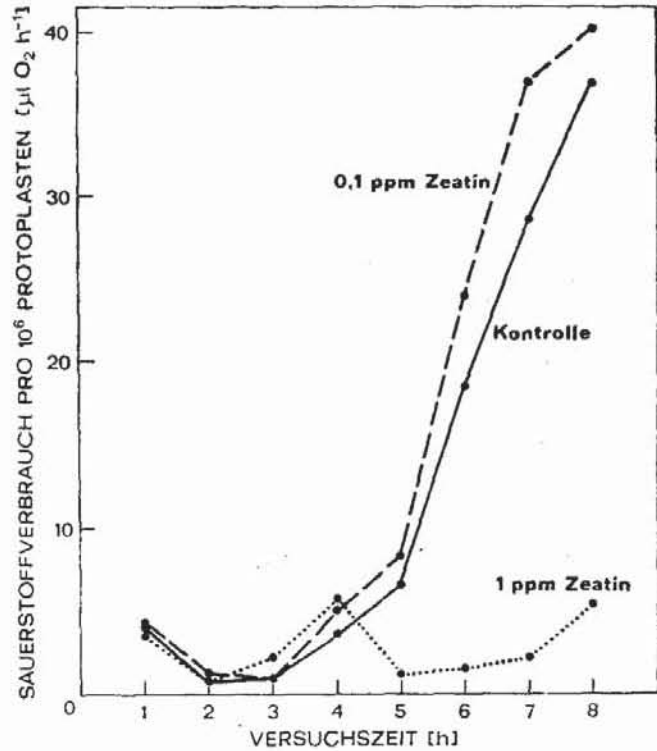
Ergebnisse

Atmung

Der zeitliche Verlauf der Atmungsintensität bei den Kontrollproben ohne Phytohormonzusatz zeigt stets das bei HOFFMANN *et al.* (1974) geschilderte Verhalten (vgl. Abb. 1). Protoplasten in 1 ppm Zeatin weisen zunächst eine Förderung der Atmung auf, so daß diese nach 4 h um 50% über den Kontrollen liegt. Dann geht die Atmungsrate aber rasch zurück, so daß während der Phase des starken Atmungsanstiegs der Kontrollen eine ausgeprägte Hemmung zu beobachten ist. Erst nach 7 h ist (bei 2 Versuchsreihen) ein erneuter schwacher Atmungsanstieg festzustellen. Die um eine Zehnerpotenz geringere Zeatinkonzentration ist anfangs ohne erkennbaren Einfluß; erst nach etwa 4—5 h setzt eine stärkere Zunahme der Atmungsrate als in den Kontrollen ein, so daß nach etwa 7 Stunden eine Förderung von ca. 30% beobachtet wird.

Abscisinsäure führt in einer Konzentration von 10 ppm nach wenigen Stunden zur Hemmung der Atmung (Abb. 2), so daß diese nach ungefähr 5 h Versuchsdauer weniger als die Hälfte der Kontrollen beträgt. Danach kommt

Abb. 1. Verlauf der Atmungsrate bei Mesophyll-Protooplasten nach Applikation von 0,1 ppm und 1 ppm Zeatin (manometrische Bestimmung nach Warburg).



es allerdings zu einem Atmungsanstieg wie bei den Kontrollen. Mit geringeren Abscisinsäure-Konzentrationen wurden ebenfalls einige Versuche durchgeführt; sie erbrachten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse, so daß hier weitere Untersuchungen zu einer Aussage erforderlich sind.

Photosynthese

Zunächst wurde die Photosyntheseleistung der Petunien-Protooplasten geprüft und hierzu bei einer Photosynthesezeit von 5–60 min die ¹⁴C-Einbaurrate bestimmt. (Abb. 3.) Die Einbaurrate in lösliche Verbindungen nimmt bei längeren Versuchszeiten ab, auch streuen hier die Werte stärker. Wahrscheinlich hängt dies mit der Synthese alkoholunlöslicher Stoffe zusammen. Zur Kontrolle wurde weiterhin die Dunkelfixierung im Verlauf von 45 min geprüft, sie liegt bei 0,30 μmol CO₂ mg⁻¹ Chlorophyll. Eine weitere Probe wurde mit 10⁻⁴ M Phenanthrolin als Photosynthese-Hemmer versetzt, die Fixierungsrate liegt hier im Licht nach 60 min bei 0,75 μmol CO₂ mg⁻¹ Chlorophyll.

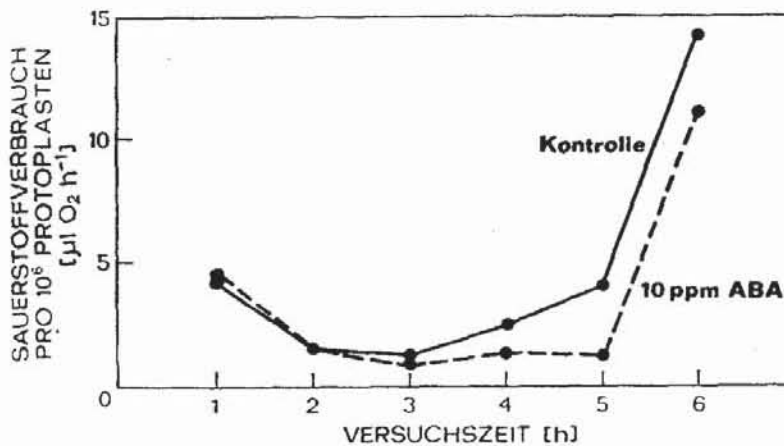


Abb. 2. Verlauf der Atmungsrate bei Mesophyll-Protooplasten nach Applikation von 10 ppm Abscisinsäure (manometrische Bestimmung nach Warburg).

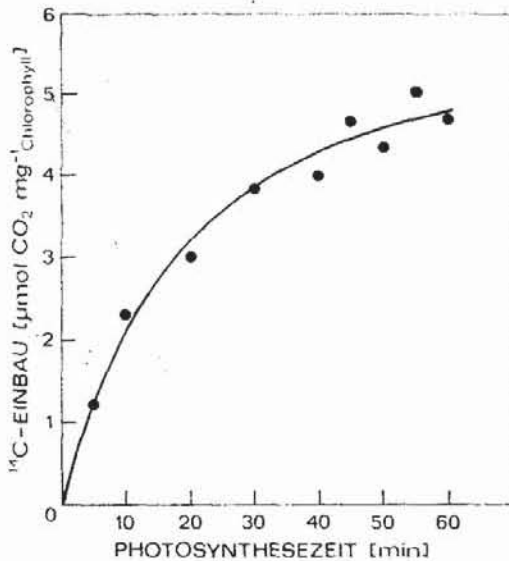


Abb. 3. ¹⁴C-Einbau in alkohollösliche Stoffe bei Mesophyll-Protoplasten in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer.

Nach diesen Vorversuchen erfolgte die Untersuchung des Einflusses von Zeatin auf die ¹⁴CO₂-Fixierungsrate. Die Protoplasten wurden nach ein-, zwei- und dreistündiger Vorinkubation in Zeatinlösungen von 0,1 und 1 ppm mit NaH¹⁴CO₃ versetzt und 30 min belichtet. Die ohne Zeatin vorinkubierten Kontrollen zeigen mit zunehmendem Alter eine Verringerung der Photosyntheserate (Abb. 4). Bei Zeatinapplikation ist die Einbaurate in allen Fällen erhöht. Mit 1 ppm Zeatin läßt sich eine typische Optimum-Kurve mit einer maximalen Photosyntheseleistung nach zweistündiger Hormoneinwirkung erkennen. Nach 3 h Inkubation ist die aufgenommene Zeatinmenge offenbar bereits überoptimal. Bei der geringeren Zeatinkonzentration (0,1 ppm) liegt die Einbaurate um so höher, je länger das Hormon einwirken konnte.

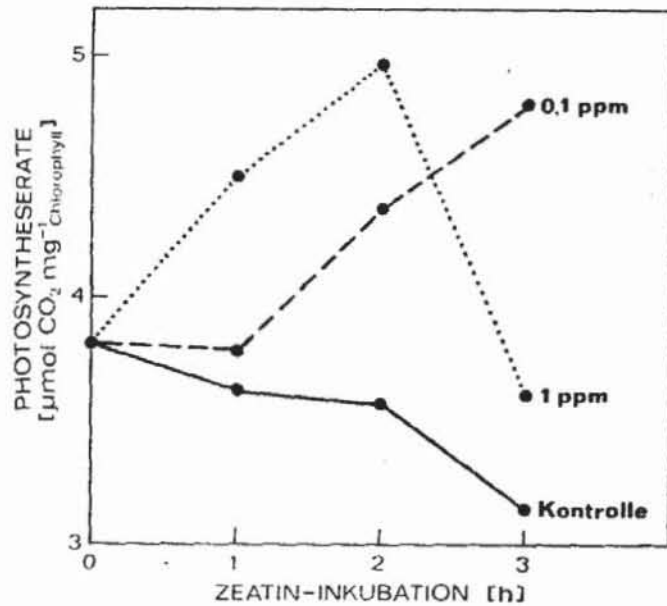
In einem weiteren Versuch wurde der Effekt von 0,01 ppm Zeatin bei zweistündiger Inkubation geprüft. Mit einer Photosyntheserate von 4,10 µmol CO₂ ordnet sich der Wert zwanglos in die Meßergebnisse ein und zeigt gleichzeitig, daß auch diese geringe Hormonkonzentration von $4,56 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol l}^{-1}$ die Photosyntheseleistung noch eindeutig fördernd beeinflusst.

Diskussion

Die Befunde über die Veränderungen der Atmungsintensität durch Zeatin können mit denjenigen verglichen werden, die an Blattscheiben bzw. intakten Blättern erhalten wurden (MAILÄNDER und KULL 1973). Die zeitlichen Veränderungen der Atmungsrate bei Blattscheiben von *Ailanthus* entsprechen — bei Anwendung der zehnfachen Konzentration des Phytohormons (10 ppm, 100 ppm) — weitgehend dem, was an den Protoplasten beobachtet werden konnte. Der Vorgang läuft allerdings bei letzteren innerhalb weniger Stunden, bei den auf Zeatin gehaltenen Blattscheiben in 48 h ab. Die maximale Steigerung der Atmungsrate liegt bei den Protoplasten nach 4 h bei +50%, bei den Blattscheiben nach 24 h bei +20%. Die dabei ins Blatt gelangten Zeatin-Konzentrationen sind denjenigen des Milieus der Protoplasten vergleichbar.

Die starke Hemmung der Atmung nach einigen Stunden durch 1 ppm Zeatin ist vielleicht dadurch verursacht, daß eine zu hohe Dosis des Hor-

Abb. 4. Photosyntheserate von Mesophyll-Protoplasten bei halbstündiger Belichtung und Vorinkubation mit 0,1 ppm bzw. 1 ppm Zeatin für 1 bis 3 h.



mons einwirkt. Man könnte allerdings auch an eine Hemmung der Alterungsvorgänge denken, mit denen der starke Atmungsanstieg möglicherweise zusammenhängt (vgl. HOFFMANN *et al.* 1974). Eine derartige Erklärung legt zumindest der in 2 Versuchsreihen beobachtete stark verzögerte und abgeschwächte Atmungsanstieg gegen Versuchsende nahe.

Die Hemmung der Atmung durch Abscisinsäure steht im Einklang mit den Befunden von POSKUTA *et al.* (1972), die bei Anwendung von 100 und 200 ppm bei Blättern von Erdbeere und Mais eine starke Verringerung der Atmungsrate fanden. Der nach über 5 h einsetzende Atmungsanstieg könnte mit einer Förderung der Seneszenz zusammenhängen, wie sie von zahlreichen Untersuchungen mit Abscisinsäure gut bekannt ist (vgl. ADDICOTT und LYON 1969). Diese Alterungsförderung kann sich bei Protoplasten naturgemäß erheblich rascher auswirken, als bei ganzen isolierten Blättern (vgl. NEWMAN *et al.*, 1973; KULL und UNGER 1974).

Die CO₂-Einbauraten bei den Photosynthese-Versuchen sind denjenigen vergleichbar, die WEGMANN und MÜHLBACH (1973) bei Sonnenblumenblatt-Protoplasten fanden. Legen wir den Wert von 10 min Photosynthese zugrunde, so sind unsere Werte etwa doppelt so hoch wie bei den genannten Autoren. Die Ursachen für die im Vergleich zu intaktem Blattgewebe geringen Raten werden von WEGMANN und MÜHLBACH diskutiert. Die Erhöhung der Photosyntheserate unter dem Einfluß von Zeatin entspricht Befunden, die mit Blattgewebe und dem künstlichen Cytokinin Kinetin erhalten wurden (JORDANOV und POPOV 1966, MEIDNER 1967, TREHARNE *et al.* 1970, weitere Lit. vgl. KULL 1972). Gewebekulturen lieferten ähnliche Ergebnisse (NEUMANN und RAAFAT 1973). Auch bei zellfreien Präparaten aus Blättern von *Arabidopsis* wurde eine Steigerung der Photosynthese durch Kinetin erzielt (BABADZHANOVA *et al.* 1971). TREHARNE *et al.* (1970) führen den Cytokinin-Effekt auf eine Erhöhung der Ribulose-1,5-diphosphatcarboxylase-Aktivität zurück (vgl. auch FEIERABEND 1969, 1970). Unsere Ergebnisse zeigen über diese Befunde hinaus, daß hohe Konzentrationen des natürlichen Cytokinins Zeatin die Photosynthese-Intensität wieder herabsetzen.

Bei Anwendung von 1 ppm Zeatin erhält man für die Photosyntheserate ebenso wie für die Atmungsrate eine typische Optimum-Kurve der Abhängigkeit der Wirkung von der Konzentration. Letztere wird bei unseren Versuchen durch die Zeitachse wiedergegeben. Für Kinetin sind hemmende Einflüsse hoher Dosen auf verschiedene Faktoren bekannt (ROGOZINSKA *et al.* 1964; PENOT und HOURMANT 1969; vgl. auch SCHMITZ *et al.* 1972). Bei Untersuchungen mit Zeatin wurden entsprechende Ergebnisse bei der Atmung von Blattgewebe (MAILÄNDER und KULL 1973) und beim Fettsäurehaushalt (KULL und BÜXENSTEIN 1974; KULL, unveröffentlicht) erhalten.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des Bundesministers für Bildung und Wissenschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Fräulein A. Krauss und Fräulein B. Kühn danken wir für sorgfältige technische Assistenz.

Literatur

- ADDICOTT, F. T., LYON, J. L.: Physiology of abscisic acid and related substances. — *Annu. Rev. Plant Physiol.* **20** : 139—164, 1969.
- BABADZHANOVA, M. A., KHAITOVA, L. T., NASYROV, Y. S.: [Effect of kinetin on the fixation of carbon-14-dioxide by cellfree preparations of *Arabidopsis thaliana*.] Russ. — *Dokl. Akad. Nauk. Tadzh. SSR* **14** : 62—64, 1971.
- BAYER, M. H.: Response of *Nicotiana* mesophyll protoplasts of normal and tumorous origin to indoleacetic acid *in vitro*. — *Plant Physiol.* **51** : 898—901, 1973.
- FEIERABEND, J.: Der Einfluß von Cytokininen auf die Bildung von Photosyntheseenzymen in Roggenkeimlingen. — *Planta* **84** : 11—29, 1969.
- FEIERABEND, J.: Characterization of cytokinin action on enzyme formation during the development of the photosynthetic apparatus in rye seedlings. Enzymes of the reductive and oxidative pentose phosphate cyclus. — *Planta* **94** : 1—15, 1970.
- GREGORY, D. W., COCKING, E. C.: Studies on isolated protoplasts and vacuoles. II The action of growth substances. — *J. exp. Bot.* **17** : 68—77, 1966.
- HOFFMANN, F.: Die Aufnahme doppelt-markierter DNS in isolierte Protoplasten von *Petunia hybrida*. — *Z. Pflanzenphysiol.* **69** : 249—261, 1973.
- HOFFMANN, E., KULL, U., POTRYKUS, I.: Manometrische Atmungsmessungen an Protoplasten von *Petunia*. — *Biol. Plant.* **16** : 00—00, 1975.
- JORDANOV, I., POPOV, K.: [The effect of kinetin on the photosynthetic activity and metabolism of the chlorophyll-protein complex in leaves of different physiological states.] — *Dokl. bolg. Akad. Nauk* **19** : 1207—1210, 1966.
- KANAI, R., EDWARDS, G. E.: Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. — *Plant Physiol.* **51** : 1133—1137, 1973.
- KULL, U.: Wirkungen von Wuchsstoffen auf Speicherung und Stoffwechsel in vegetativen Pflanzenteilen. — *Bot. Studien (Jena)* **19**, 1972.
- KULL, U., BÜXENSTEIN, R.: Effect of cytokinins on the lipid fatty acids of leaves. — *Phytochemistry* **13** : 39—44, 1974.
- KULL, U., UNGER, M.: Wirkungen von Abscisinsäure auf den Kohlenhydrat- und Fettsäurehaushalt von *Coleus blumei*. — *Z. Pflanzenphysiol.* **72** : 135—140, 1974.
- MAILÄNDER, CHR., KULL, U.: Einfluß von Zeatin auf die Atmung grüner Blätter. — *Naturwissenschaften* **60** : 479, 1973.
- MEIDNER, H.: The effect of kinetin on stomatal opening and the rate of intake of carbon dioxide in mature primary leaves of barley. — *J. exp. Bot.* **18** : 556—561, 1967.
- NEUMANN, K. H., RAAFAT, A.: Further studies on the photosynthesis of carrot tissue cultures. — *Plant Physiol.* **51** : 685—690, 1973.
- NEWMAN, D. W., ROWELL, B. W., BYRD, K.: Lipid transformations in greening and senescing leaf tissue. — *Plant Physiol.* **51** : 229—233, 1973.
- PENOT, M., HOURMANT, A.: Variations de la perméabilité cellulaire au ³²P chez des disques de feuilles, sous l'action de la kinétine. — *Compt. rend. Acad. Sci. (Paris.) Sér. D* **269** : 1046—1409, 1969.
- POTRYKUS, I., DURAND, J.: Callus formation from single protoplasts of *Petunia*. — *Nature new Biol.* **237** : 286—287, 1972.

- POWER, J. B., COCKING, E. C.: Isolation of leaf protoplasts: macromolecule uptake and growth substance response. — *J. exp. Bot.* **21** : 64—70, 1970.
- ROGOZINSKA, J. M., HELGESON, J. P., SKOOG, F.: Tests for kinetin-like growth promoting activities of triacanthine and its isomer 6-(γ , γ' -dimethylallylamino)-purine. — *Physiol. Plant.* **17** : 165 to 176, 1964.
- SCHMITZ, R. Y., SKOOG, F., PLAYTIS, A. J., LEONARD, N. J.: Cytokinins, synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. — *Plant Physiol.* **50** : 702—705, 1972.
- TREHARNE, K. J., STODDART, J. L., PUGHE, J., PARANJOTHY, K., WAREING, P. F.: Effects of gibberellin and cytokinins on the activity of photosynthetic enzymes and plastid ribosomal RNA synthesis in *Phaseolus vulgaris*. — *Nature* **228** : 129—131, 1970.
- WEGMANN, K., MÜHLBACH, H. P.: Photosynthetic CO₂ incorporation by isolated leaf cell protoplasts. — *Biochim. biophys. Acta* **314** : 79—82, 1973.

U. KULL, F. HOFFMANN (Stuttgart a Hohenheim): **Vliv zeatinu na dýchání a fotosyntesu protoplastů z mezofylu petunie.** — *Biol. Plant.* **17** : 31—37, 1975.

Aplikací 1 ppm zeatinu se zvýší rychlost dýchání (měřeno Warburgovou metodou) protoplastů z mezofylu listů *Petunia hybrida* po 4 h asi o 50 %; pak následuje prudký pokles. Zatímco rychlost dýchání u kontrolních rostlin stoupá po 5 až 6 h, 1 ppm zeatinu má silný inhibiční účinek. Při použití 0.1 ppm zeatinu je vzestup rychlosti dýchání mnohem pomalejší a po 7 h je o 30 % vyšší než u kontrolních rostlin. Kyselina abscisová (10 ppm) snižuje rychlost dýchání tak, že po 5 h je rychlost dýchání o polovinu nižší než v kontrolní variantě. Později následuje vzestup, způsobený patrně vlivem kyseliny abscisové podporující stárnutí. Rychlost fotosynthesy protoplastů mezofylu měřená pomocí fixace ¹⁴CO₂ klesá se stárnutím preparátu. Protoplasty vystavené působení zeatinu během 1 až 3 h ukazovaly zvýšení rychlosti fotosynthesy. Při aplikaci 0.1 ppm zeatinu rychlost fixace ¹⁴CO₂ je tím větší, čím déle mohl hormon působit. Při aplikaci 1 ppm zeatinu byla získána typická optimální křivka podobná křivce pro dýchání. Tyto optimální křivky prokazují inhibiční účinek zeatinu na dýchání a fotosyntesu.