

Lehrstuhl für Allgemeinen Pflanzenbau der Universität Bonn und Lehrstuhl  
für Grünlandlehre der TU München in Weihenstephan

## **Veränderung des Hydroxyprolinegehaltes in Gewebeabschnitten landwirtschaftlicher Nutzpflanzen mit unterschiedlichem Ausdehnungswachstum**

Von  
**M. Huber-Reinhard, W. Kühbauch und G. Voigtländer**

(Eingegangen am 9. 5. 1986)

### **Summary**

#### **Variation in the Concentration of Cell Wall Hydroxyproline in Sections of Crop Plants with Differing Extension Growth**

Hydroxyproline was determined in cell walls, extracted from plant tissues differing in extension growth. Investigations with cell walls of rape (*Brassica napus* L. var. napus), corn (*Zea mays* L.) and bean (*Vicia faba* L.) showed the following results:

1. Hydroxyproline content in the cell walls of these 3 species increased with the age of the plant tissue along with decreasing ability to expand.
2. Varieties of the same species, showing reduced extension growth in the respective growth stages had more hydroxyproline incorporated in the cell walls than comparable tissue sections of faster growing varieties.

### **Einleitung**

Die Bedeutung der Zellwand für das Ausdehnungswachstum von Pflanzen ergibt sich aus dem Wechselspiel zwischen dem Turgor der Zellen und der Festigkeit der Zellwand (Cleland, 1971). Die Zellwände begrenzen das Ausdehnungsvermögen der einzelnen Zellen und können somit das Wachstum und den Ertrag beeinflussen (Nevins et al., 1968; Cleland, 1977; Rayle und Cleland, 1977). Glykoproteiden, die gelegentlich unter der Bezeichnung „Extensin“ erwähnt werden, wird eine für die mechanischen Eigenschaften der Zellwand wesentliche Funktion zugeschrieben. Ein typischer Bestandteil der Glykoproteide in Pflanzenzellwänden ist das Hydroxyprolin (Bailey und Kauss, 1974). Während die Rolle der Glykoproteide in der Zellwand nicht eindeutig geklärt werden konnte, wurde verschiedentlich gezeigt, daß der Hydroxyprolinegehalt in Zellwänden mit zunehmendem Alter und mit nachlassender Ausdehnung des Pflanzengewebes ansteigt (Cleland und Karlsnes, 1967; Ridge und Osborne, 1970; Sadava und Chrispeels, 1973; Klis, 1976; Holst et al., 1980). In Übereinstimmung damit wurde als Folge einer Beeinflussung des Streckungswachstums durch Auxin oder durch Wuchshemmstoffe vielfach ein zum Wachstum gegenläufiger Prozeß der Einlagerung von Hydroxyprolin in die Zellwand beobachtet (Cleland, 1968; Ridge und Osborne, 1970; Fuji et al., 1981).

In der vorliegenden Arbeit werden an isoliertem Zellwandmaterial aus verschiedenen Sorten bzw. Gewebsabschnitten von Raps, Mais und Ackerbohnen der Hydroxipropylgehalt sowie morphologische Kenngrößen der Pflanzen untersucht.

### Material und Methoden

#### Pflanzenmaterial

Pflanzenzellwand wurde aus Keimpflanzen von Raps, Mais und Ackerbohnen präpariert.

Raps: Im Rapsortiment stehen Sorten mit unterschiedlicher Wüchsigkeit zur Verfügung. Die für den Zwischenfruchtbau empfohlenen Sorten Komet und Kroko zeichneten sich durch ein stärkeres Längenwachstum des Hypokotyls aus, während die Sorten Erglu und Kosa bereits im frühen Entwicklungsstadium ein langsamerer Wachstum zeigen. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus unter Lichtabschluß bei Temperaturen zwischen 15 °C und 25 °C. Die Wachstumsgeschwindigkeit der etiolierten Keimpflanzen wurde über die Länge des Hypokotyls von je 20 Individuen einer jeden Sorte gemessen. Geerntet wurden Hypokotyl und Keimblatt nach 5, 7 und 9 Tagen. Zu

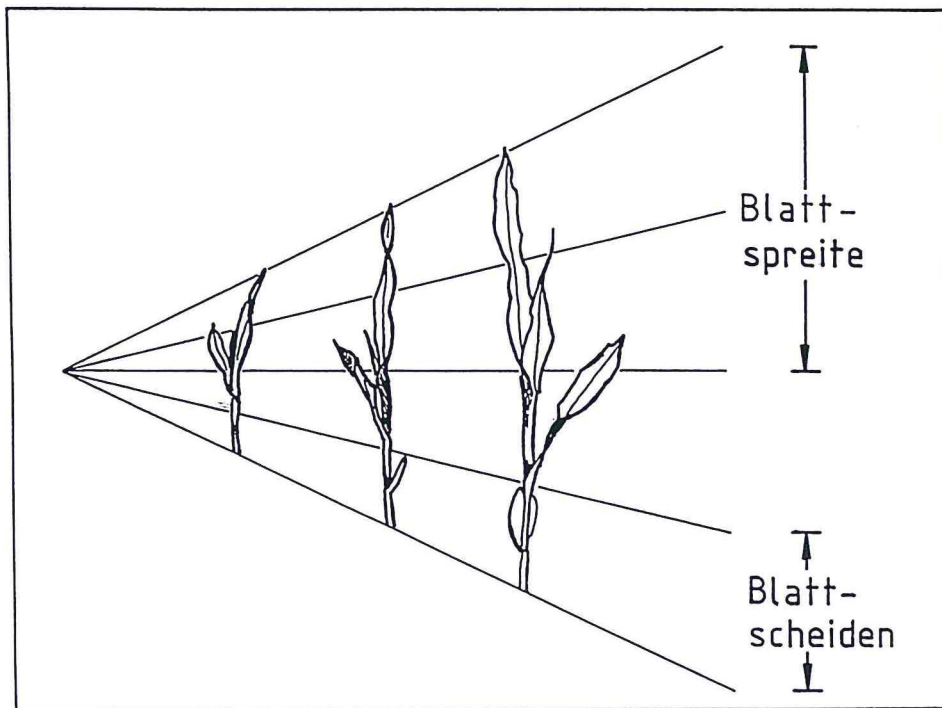


Abb. 1:

Schematische Darstellung der Probenahme an Maispflanzen im 3- bis 7-Blatt-Stadium.

diesen Zeitpunkten waren, über alle Sorten ermittelt, durchschnittliche Hypokotyllängen von 2,8 cm bzw. 4,8 cm und 5,3 cm erreicht.

**Mais:** Anhand der FAO-Zahlen wurden Sorten mit unterschiedlich raschem Längenwachstum ausgewählt. Als eine in ihrer frühen Entwicklung sehr langsam wachsende Hybride konnte die Sorte Harro mit der gerundeten FAO-Zahl 700 ermittelt werden. Zum Vergleich dienten Sorten mit FAO-Zahl von rund 200 (Precox oder Multi) bzw. 300 (Helix). Die Probenahme erfolgte bei einer Wuchshöhe zwischen 10 und 25 cm. Die Unterteilung der Sproßmasse wurde entsprechend dem in der Abbildung 1 dargestellten Ernteschema vorgenommen. Als morphologische Kenngröße zur Beschreibung der sortentypischen Wachstumsunterschiede wurde an je 20 Individuen einer jeden Sorte die Länge der Blätter gemessen; diese ist als Mittelwert der Summe aller Blätter („Blattgesamtlänge“) der Einzelpflanzen einer jeden Sorte wiedergegeben.

**Ackerbohne:** In Vorversuchen wurde die Geschwindigkeit des Längenwachstums verschiedener Ackerbohnsorten geprüft. Die zu einem rascheren Längenwachstum befähigten Sorten Herz-Freya und Webo wurden der relativ langsam wachsenden Sorte Minor gegenübergestellt. Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus bei 16stündiger Belichtung und einer mittleren Temperatur von 16 °C bis zu einem Stadium, in dem etwa 3 bis 5 Internodien erkennbar gestreckt waren. Das Längenwachstum der Internodien wurde je Sorte an einer Stichprobe von 20 Pflanzen gemessen.

In einem weiteren Versuch wurden die Sorten Diana, Herz-Freya und Minor bis zu einem Wachstumsstadium, in dem 7 Internodien gebildet waren, unter Freilandbedingungen in Plastikbehältern (54 × 75 × 31 cm) angezogen, um auch an älteren Pflanzen die Veränderung des Hydroxyprolingehaltes von den basalen zu den apikalen Internodien zu verfolgen.

### Zellwanduntersuchung

Das Pflanzenmaterial wurde in Anlehnung an ein von Kauss und Glaser (1974) beschriebens Verfahren in einer Reibschale (Raps) bzw., nach Abkühlen mit flüssigem Stickstoff, mit einem Sorvall-Mixer homogenisiert und in 0,36 M Saccharosepuffer über Nacht belassen, um durch Plasmolyse das Ablösen der Zellmembran von der Zellwand zu vervollständigen. Im Anschluß daran wurde bei 800 g zentrifugiert und das Sediment wiederholt mit einer 0,5 % Lösung Dodecylsulfat-Natriumsalz nachgewaschen. Dadurch sollten Membranen zerstört und einer Kontamination der Zellwand durch Bestandteile des Zellinhaltes vorgebeugt werden. Zur weiteren Reinigung der Zellwandpräparate wurde das verbleibende Pflanzenmaterial in Anlehnung an English et al. (1971) in einem Chloroform-Methanolgemisch noch einmal homogenisiert, die flüssige Phase über einen Porzellan- bzw. Glasfildertiegel abgesaugt, mit Aceton nachgewaschen und die so isolierte Zellwand im Exsikkator unter verringertem Atmosphärendruck getrocknet. Ein Teil der präparierten Zellwand (20 mg) wurde in Glasampullen eingeschmolzen und mit 6 n Salzsäure bei 120 °C 12 Stunden hydrolysiert. Anschließend wurde die Salzsäure durch wiederholtes Einengen bzw. Aufnehmen des Hydrolysatrückstandes in Wasser entfernt. Zuletzt wurde das Hydrolysat in 5 ml Wasser aufgenommen und durch Filtration über Glasfilter von unlöslichen Bestandteilen gereinigt. Der Hydroxyprolingehalt dieser wässrigen Lösung wurde nach Kivirikko und Liesmaa (1959) bzw. an älteren Ackerbohnen nach Drodz et al. (1976, entsprechend einer Mo-

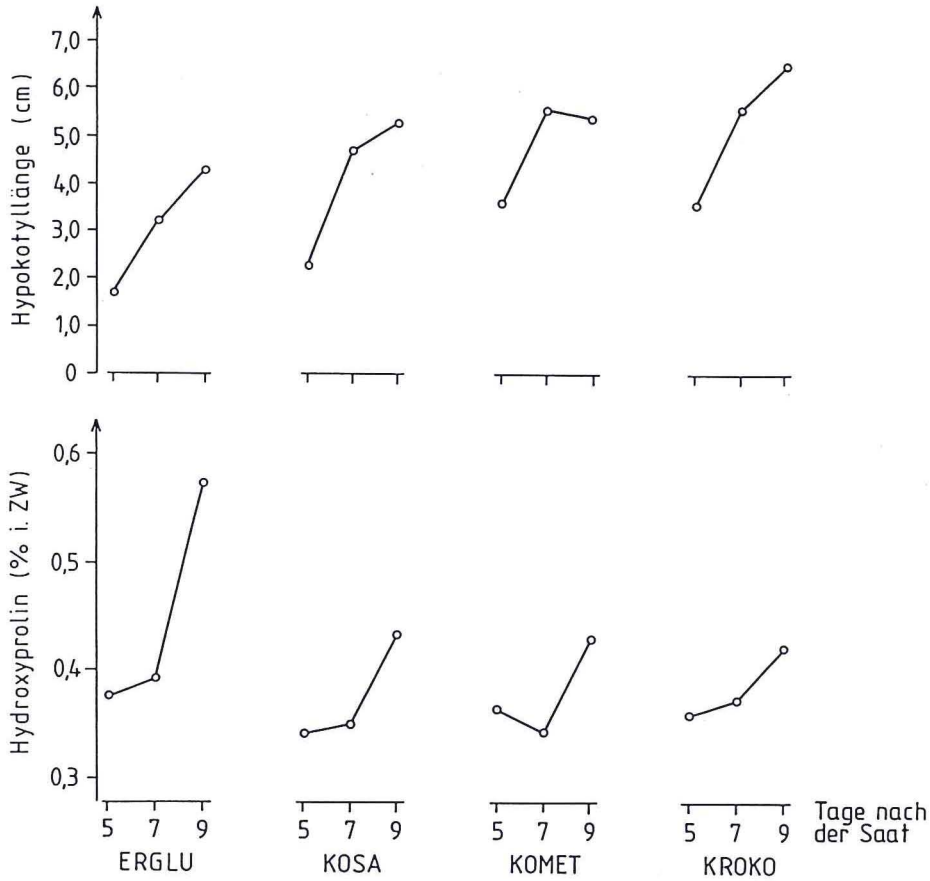


Abb. 2: Hypokotyllänge und Hydroxyprolinegehalt in der Zellwand des Hypokotyls etiolierter Rapskeimpflanzen der Sorten Erglu, Kosa, Komet und Kroko im Zeitraum zwischen dem 5. und 9. Tag nach der Saat.

difikation der Firma TECATOR: Application Short Note 21/84) bestimmt. Der Hydroxyprolinegehalt ist im folgenden bezogen auf die trockene Zellwand (% i. ZW) angegeben.

### Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 2 ist das Längenwachstum der 4 Raps-Sorten vom 5. bis zum 9. Tag nach der Saat angegeben. Fünf Tage nach der Saat zeigen die Sorten Komet und Kroko jeweils ein deutlich längeres Hypokotyl als Erglu und Kosa. Das Hypokotyl der Sorten Erglu und Kroko streckt sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes, während das der Sorten Kosa und Komet nach dem 7. Tag nur noch geringfügig zunimmt bzw. im Längenwachstum stagniert; so war das Hypokotyl der Sorten Komet und Kroko zu diesem Zeitpunkt bereits um mehr als 1 cm länger als das der Sorten Erglu und Kosa.

Diese Unterschiede bleiben, wenn auch weniger deutlich ausgeprägt, bis zum 9. Tag nach der Saat erhalten.

Mit fortschreitendem Längenwachstum des Hypokotyls nimmt der Gehalt an Hydroxyprolin in den Zellwänden aller Sorten vom 5. bis zum 9. Tag zu — besonders deutlich vom 7. bis zum 9. Tag. In diesem Zeitraum war auch das Längenwachstum des Hypokotyls deutlich zurückgegangen. Darüber hinaus wurden die höchsten Hydroxyprolingehalte in den Zellwänden der Sorte Erglu gemessen, die sich im Vergleich mit den anderen Sorten durch ein insgesamt geringeres Längenwachstum auszeichnet. Der Anteil des Hydroxyprolins am Gesamtprotein der Zellwand (hier nicht dargestellt) umfaßte jeweils weniger als 10 %.

In Abbildung 3 ist die Summe der Blattlängen von Maispflanzen sowie der Hydroxyprolingehalt in deren Zellwand wiedergegeben. Die Ergebnisse sind in der Reihenfolge aufsteigender FAO-Zahlen angeordnet. Die Hydroxyprolingehalte geben den Mittelwert aus vier separaten Versuchen an. In den Zellwänden der Blattscheiden, die einen höheren Anteil an wachsendem Gewebe enthalten, war der Hydroxyprolingehalt stets niedriger als in den Blattspreiten. Darüber hinaus ist festzustellen, daß die rascher wachsenden Sorten mit FAO-Zahl 200 und 300 vor allem in den Blattscheiden geringere Hydroxyprolingehalte in der Zellwand aufweisen als die langsamer wachsende Sorte der FAO-Zahl 700.

Die Internodienlänge von Ackerbohnen, als Mittelwert aus vier separaten Versuchen zu je 20 Pflanzen ermittelt, ist in Abbildung 4 dargestellt. Die unteren Internodien

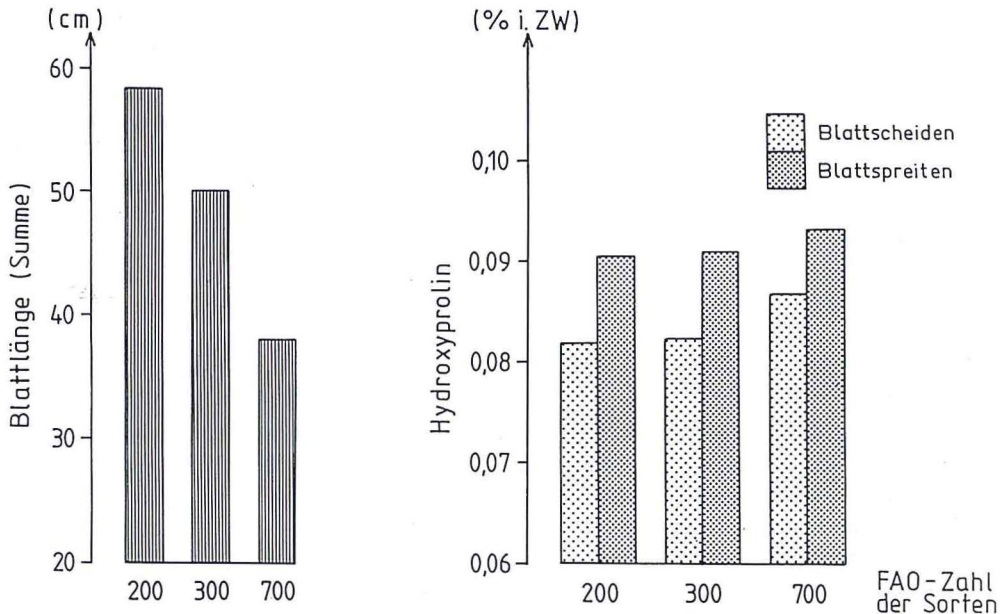


Abb. 3: Blattgesamtlänge und Hydroxyprolingehalt in den Zellwänden der Blattscheiden bzw. Blattspreiten der Maissorten Precox oder Multi (FAO 200) sowie der Sorten Helix (FAO 300) und Harro (FAO 700).

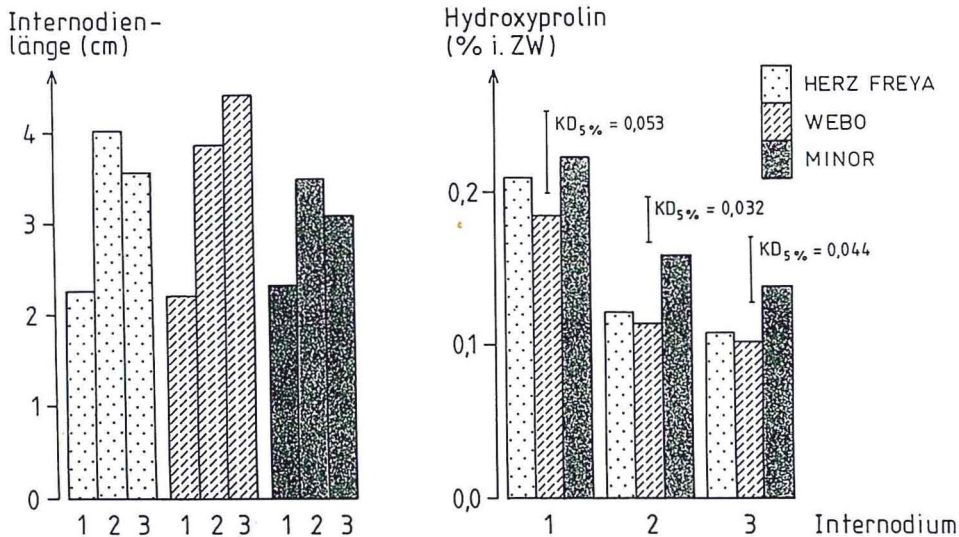


Abb. 4: Internodienlänge des ersten, zweiten und dritten Internodiums der Ackerbohnen-sorten Herz-Freya, Webo und Minor sowie der Hydroxyprolingehalt in deren Zellwand.

waren im Mittel ca. 2 cm lang und damit deutlich kürzer als die daran angrenzenden jüngeren Internodien, die bis zu 4 cm Länge erreichten. Sortenunterschiede zwischen Herz-Freya, Webo und Minor zeigten sich vor allem im zweiten und dritten Internodium. In der Sorte Minor waren die Internodien durchschnittlich um 0,4 cm im zweiten, und um 0,9 cm im dritten Internodium, kürzer als die der beiden Vergleichssorten.

Ähnlich wie in den Untersuchungen mit Raps und Mais waren auch mit Ackerbohnen die Befähigung zum Ausdehnungswachstum und der Hydroxyprolingehalt der Zellwand negativ miteinander korreliert. So enthielten die stärker verlängerten jüngeren Internodien der Sorten Herz-Freya und Webo deutlich weniger Hydroxyprolin in der Zellwand als entsprechende Gewebeabschnitte der Sorte Minor. Die Varianzanalyse (Tab. 1) und die daraus abgeleitete Kritische Differenz (nach Sheffe und Sachs, 1974) zeigen, daß im zweiten Internodium die Unterschiede zwischen Herz-Freya und Webo im Vergleich zu Minor mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 1\%$  als signifikant anzusehen sind. Auch die Untersuchungen an älteren Ackerbohnen bestätigen diese Tendenz. In Abbildung 5 wird an den Sorten Diana, Herz-Freya und Minor der Hydroxyprolingehalt der Zellwand in 4–5 Internodien gezeigt. Die Sorte Diana ist nach Beschreibender Sortenliste (Bundessortenamt, 1981) durch ein im Vergleich zur Sorte Herz-Freya geringeres Längenwachstum ausgezeichnet, während die Sorte Minor für ihr besonders geringes Längenwachstum bekannt ist. In Übereinstimmung mit den oben geschilderten Ergebnissen ist bezüglich des Hydroxyprolingehaltes in der Zellwand dieser Sorte eine dem Längenwachstum entgegengesetzte Abstufung ihrer Hydroxyprolingehalte festzustellen. Darüber hinaus ist erkennbar, daß auch in älteren Pflanzen der Hydroxyprolingehalt von der Stengelbasis zum apikalen Ende der Pflanze abnimmt; d. h. sowohl die Sorten als auch die einzelnen Stengelabschnitte folgen der bereits festgestellten Tendenz, wonach eine umgekehrte Beziehung zwischen der Befähigung

Tab. 1: Varianzanalyse des Hydroxyprolingehaltes in der Zellwand der in Abb. 4 dargestellten Ackerbohneninternodien

		FG	MQ	Irrtumswahrscheinlichkeit (p), F-Test
1. Internodium	Sorte	2	0.01500	0.17
	Fehler	9	0.00686	
2. Internodium	Sorte	2	0.02322	0.00
	Fehler	9	0.00241	
3. Internodium	Sorte	2	0.01554	0.08
	Fehler	9	0.00451	

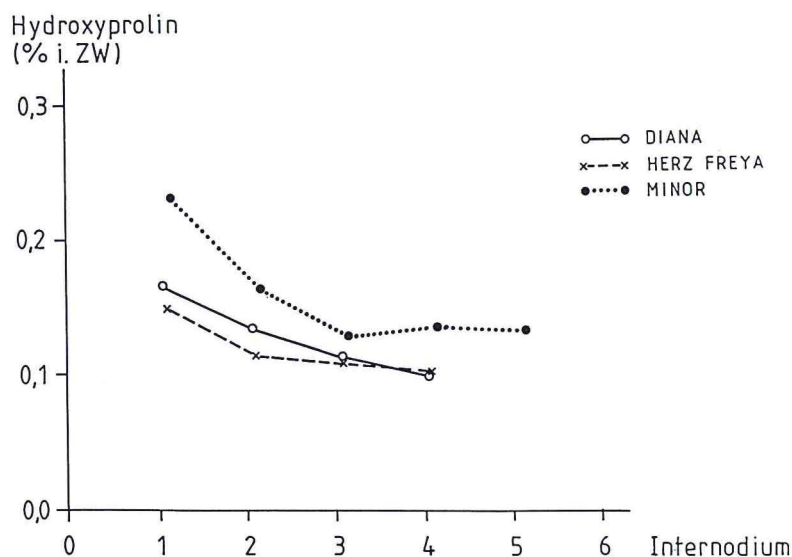


Abb. 5: Veränderung des Hydroxyprolingehaltes in der Zellwand von Ackerbohnenstengeln der Sorten Diana, Herz-Freya und Minor über das 1. basale Internodium zum 4. bzw. 5. Internodium.

gung zum Streckungswachstum und der Höhe des Hydroxyprolingehaltes der Zellwand existiert. Ob der Hydroxyprolingehalt der Zellwand generell als Auswahlkriterium für rasches Ausdehnungswachstum und beschleunigte Massenbildung landwirtschaftlicher Nutzpflanzen verwendet werden kann, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

### Zusammenfassung

Von Raps (*Brassica napus* L. var. *napus*), Mais (*Zea mays* L.) und Ackerbohnen (*Vicia faba* L.) wurden Zellwände aus Pflanzengewebe mit jeweils unterschiedlicher Be-

fähigung zum Ausdehnungswachstum auf ihren Hydroxyprolinegehalt untersucht. Folgende Ergebnisse konnten festgestellt werden:

1. In den Zellwänden der drei untersuchten Arten war der Hydroxyprolinegehalt mit dem Alter, d. h. mit der nachlassenden Befähigung zum Ausdehnungswachstum, angestiegen.
2. Sorten der nämlichen Art, die ein langsames Wachstum zeigten, enthielten in vergleichbaren Gewebsabschnitten bzw. Wachstumsstadien mehr Hydroxyprolin in der Zellwand als die schneller wachsenden Vergleichssorten.

### Danksagung

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft am Lehrstuhl für Grünlandlehre der TU München in Weihenstephan und in Bonn durchgeführt. Die Autoren verbinden diese Veröffentlichung mit einem besonderen Dank. Ferner sei Frau Monika Leizner für ihre tatkräftige Mithilfe bei der Durchführung der Untersuchungen gedankt.

### Literatur

- Bailey, R. W. und Kauss, H., 1974: Extraction of hydroxyproline containing proteins and pectic substances from cell walls of growing Mung Bean hypokotyl segments. *Planta* **119**, 233—245.
- Bundessortenamt, 1981: Beschreibende Sortenliste 1981, Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen, Hackfrüchte. Alfred Strothe Verlag, Hannover.
- Cleland, R., 1968: Hydroxyproline formation and its relation to auxin-induced cell elongation in the *avena coleoptile*. *Plant Physiol.* **43**, 1625—1630.
- Cleland, R., 1971: Cell wall extension. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **22**, 1165—1170.
- Cleland, R., 1977: The control of cell enlargement. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **31**, 101—116.
- Cleland, R. und Karlsnes, A., 1967: A possible role of hydroxyproline-containing proteins in the cessation of cell elongation. *Plant Physiol.* **42**, 669—671.
- Drodz, M., Kucharz, E. und Szyja, J., 1976: A colorimetric micromethod for determination of hydroxyproline in blood serum. *Z. Med. Labortechnik* **17**, 163—171.
- English, P., Jurale, J. P. und Albersheim, P., 1971: Host-pathogen interactions. II. Parameters affecting polysaccharidedegrading enzymes secretion by *Colletotrichum lindemutianum* grown in culture. *Plant Physiol.* **47**, 1—6.
- Fuji, T., Suzuki, T. und Kato, R., 1981: Effect of growth inhibitor on the hydroxyproline level in cell walls of *Zea* primary roots. *Plant Cell Physiol.* **22**, 1185—1190.
- Holst van, G.J., Klis, F. M., Bouman, F. und Stegwee, D., 1980: Changing cell wall compositions in hypokotyls of dark grown bean seedlings. *Planta* **149**, 209—212.
- Kauss, H. und Glaser, C., 1974: Carbohydratebinding proteins from plant cell walls and their possible involvement in extension growth. *FEBS Letters* **45**, 304—307.
- Kivirikko, K. und Liesmaa, M., 1959: A colorimetric method for determination of hydroxyproline in tissue hydrolysates. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* **11**, 128—133.
- Klis, F. M., 1976: Glycosylated seryl residues in wall protein of elongating pea stems. *Plant Physiol.* **57**, 224—226.
- Nevins, D. J., English, P. D., und Albersheim, P., 1968: Changes in cell wall polysaccharides associated with growth. *Plant Physiol.* **43**, 914—922.
- Rayle, D. J. und Cleland, R., 1977: Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Curr. Topics Dev. Biol.* **11**, 187—214.
- Ridge, I. und Osborne, D., 1970: Hydroxyproline and peroxidase in cell walls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene. *J. Exp. Bot.* **21**, 843—856.



Sachs, D., 1984: Angewandte Statistik. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Sadava, D. und Chrispeels, M. J., 1973: Hydroxyproline-rich cell wall protein (Extensin): Role in the cessation of elongation in excised pea epicotyls. *Developmental Biol.* **30**, 49–55.

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. W. Kühbauch, Institut für Pflanzenbau, Universität Bonn, Katzenburgweg 5, D-5300 Bonn.