

Beeinflussung der Anthocyan synthese in Keimlingen von *Sinapis alba* L. durch α -Methyl-DL-tryptophan

H. SCHRAUDOLF

Botanisches Institut der Universität Gießen

Eingegangen am 1. August 1967

*Influence of α -Methyl-DL-tryptophan on Anthocyanin Synthesis in Seedlings of *Sinapis alba* L.*

Summary. α -methyl-DL-tryptophan stimulates anthocyanin synthesis in dark grown seedlings of *Sinapis alba* L. Effective concentrations are between 10^{-4} M and 10^{-3} M. This stimulation is accompanied by an inhibition of root and shoot growth.

The induction of anthocyanin synthesis by red light (3×10^8 erg cm^{-2} sec^{-1}) is complete after an exposure time of 3 minutes regardless of whether or not the plants were treated with α -methyl-DL-tryptophan.

Isonicotinic acid hydrazide inhibits growth of *Sinapis alba* in a similar manner. It does not affect anthocyanin synthesis.

Einleitung

Bei Versuchen zur Analyse des Biogenesewegs, der in allen Senfölglicoside führenden Familien der *Rhooadales* (sensu Wettstein) vorkommenden Indolglucosinolate erwies sich α -Methyl-DL-tryptophan als ausgezeichneter Hemmstoff der Biogenese dieser Verbindungen (SCHRAUDOLF i. V.). Gleichzeitig wird bei Applikation dieses Inhibitors das Wurzel- und Sproßwachstum etiolierter Keimlinge von *Sinapis alba* erheblich gehemmt. Die durch α -Methyl-DL-tryptophan hervorgerufene Wachstumshemmung ist begleitet von einer erheblichen Zunahme des Anthocyan gehalts der Keimlinge. Über diese bislang nicht beschriebene Wirkung der aminosäureanalogen Verbindung soll hier berichtet werden, nachdem kürzlich WAGNER, BINGER und MOHR (1967) auf einen entsprechenden Effekt von Chloramphenicol hingewiesen haben.

Material und Methoden

Als Samenmaterial diente *Sinapis alba* L. (Sorte Giselba, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Gießen, Ernte 1966). Pro Versuch wurden jeweils 50 in Größe und Färbung homogene Samen ausgewählt und in Plastikdeckeldosen ($10 \times 10 \times 5$ cm) auf Chromatographiepapier (3 Lagen MN 2214ff.) zur Keimung gebracht. Zugesezt wurden jeweils 5 ml Wasser bzw. Hemmstofflösung. Das Wachstum erfolgte im Dauerdunkel bei $25^\circ \pm 0,5^\circ$ C.

Zur Exposition im HR diente ein Lichtfeld, das mit Hilfe von Plexiglasfiltern und Leuchtstoffröhren geeigneter Emission hergestellt war. Der Emissionsschwerpunkt liegt bei 660 nm. Die mittlere Energie des Lichtfeldes auf der Höhe des Versuchsguts betrug $3 \times 10^3 \text{ erg cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$. Die Belichtung erfolgte jeweils 24 Std nach der Aussaat.

Extrahiert wurden jeweils 2×20 Keimlinge in 10 ml eines von WAGNER und MOHR (1966) angegebenen Mediums. Die Extraktion erfolgte jeweils 3 bzw. 4 Tage nach Aussaat. Das Alter der Keimlinge bei der Extraktion ist in den jeweiligen Legenden der Abbildungen und Tabellen angegeben. Die Messung des Anthocyan-gehalts erfolgte nach der Methode derselben Autoren in Cuvetten von 1 cm Schichtlänge. Die in den Tabellen angegebenen Wurzel- und Sproßlängen sind Mittel aus jeweils 40 Keimlingen.

α -Methyl-DL-tryptophan (α -MT) wurde durch die Sigma Chemical Comp., St. Louis, bezogen; Isonicotinsäurehydrazid war ein von Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, geliefertes Produkt.

Ergebnisse

In Konzentrationen zwischen 10^{-5} m und 10^{-3} m hemmt α -MT Hypokotyl- und Wurzelwachstum etiolierter Keimlinge von *Sinapis alba*

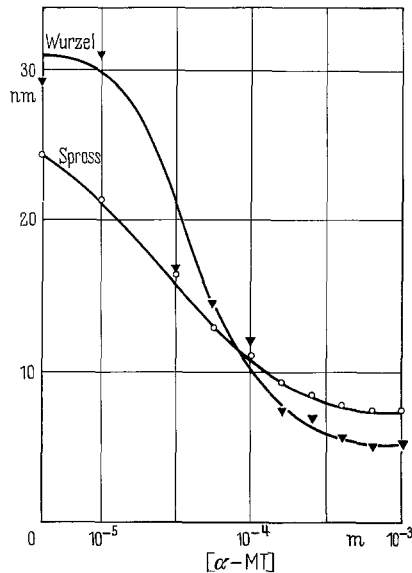


Abb. 1. Wirkung steigender Konzentrationen von α -Methyl-DL-tryptophan auf das Sproß- und Wurzelwachstum etiolierter Keimlinge von *Sinapis alba* L. Mittelwerte aus 40 Keimlingen. Dauerdunkel $25 \pm 0,5^\circ \text{ C}$

(Abb. 1). Diese Hemmung ist schon beim Ansatz im Dauerdunkel begleitet von einer schwachen aber signifikanten Förderung der Anthocyan-synthese (Abb. 2).

Werden die Keimlinge 24 Std nach der Aussaat einer zunehmenden Expositionszeit hellroter Strahlung (HR) ausgesetzt, steigt zunächst parallel zur Expositionszeit die α -MT bedingte Förderung der Anthocyanthese. Der Einfluß der jeweiligen Behandlung hatte sich am

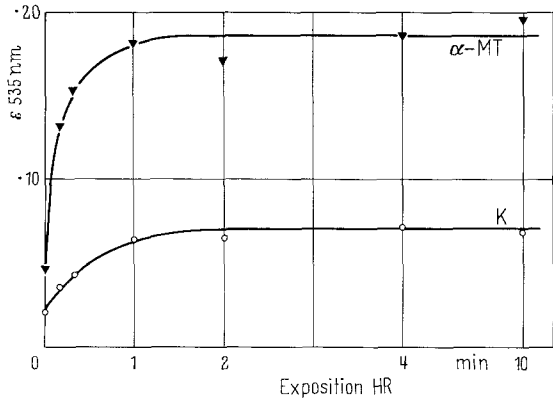


Abb. 2. Wirkung kurzfristiger Bestrahlung mit HR auf die Anthocyanthese in 3 Tage alten etiolierten Keimlingen von *Sinapis alba*. Mittel aus 3×20 Keimlingen. HR-Belichtung 24 Std nach Aussaat. Anzucht $25 \pm 0,5^\circ$ C. Dunkel. Ordinate: Dauer der HR-Bestrahlung (3×10^3 erg $\text{cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Abszisse: Extinktion 535 nm.
 ●—● Kontrolle, ▼—▼ 6×10^{-4} m-Methyl-DL-tryptophan

3. Tag nach der Aussaat manifestiert. Die Extraktion der Keimlinge und Bestimmung des Anthocyanangehalts erfolgte zu diesem Zeitpunkt. Ab einer Belichtungszeit von 3 min ist sowohl in der Kontrolle, als auch im Ansatz mit α -MT ein erster Sättigungszustand erreicht (Abb. 2) (s. a. MOHR, 1967). Generell übertrifft unter den von uns gewählten Bedingungen einer kurzen HR-Exposition die durch Zusatz von α -MT erreichte Förderung der Anthocyanthese die von WAGNER, BINGER und MOHR (1967) beobachtete Steigerung im Dauerdunkelrot. Auch scheint zumindest bis zum Erreichen der ersten Sättigung eine absolute Unabhängigkeit der Förderung der Farbstoffsynthese von der Strahlungs-dosis nicht gegeben. Die Abhängigkeit der Anthocyanthese von der Hemmstoffkonzentration ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1. Wirkung steigender Konzentrationen von α -Methyl-DL-tryptophan auf die Anthocyanthese und das Wachstum von *Sinapis alba* L. 3 Tage alte im Dunkel ($25 \pm 0,5^\circ$ C) gezogene Keimlinge (5 min HR 3×10^3 erg $\text{cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$, 24 h nach Aussaat)

| α -D,L-MT m | 535 nm ϵ | g Frischgewicht 20 Keimlinge |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------|
| 0 | 0,032 | 1,05 |
| 10^{-5} | 0,040 | 0,96 |
| 5×10^{-5} | 0,066 | 0,78 |
| $7,5 \times 10^{-5}$ | 0,068 | 0,68 |
| 10^{-4} | 0,086 | 0,62 |
| 2×10^{-4} | 0,093 | 0,53 |
| 4×10^{-4} | 0,148 | 0,50 |
| 6×10^{-4} | 0,163 | 0,45 |
| 8×10^{-4} | 0,159 | 0,46 |
| 10^{-3} | 0,168 | 0,38 |

Auch bei Ansätzen im Dauerweißlicht (Phillips TL/67 W/32; 3×10^4 erg cm⁻² sec⁻¹) und im Dauerdunkelrot war bei Zusatz von 6×10^{-4} m α -MT eine Förderung der Anthocyanynthese um 15–20% zu beobachten. Das uns zur Verfügung stehende Dunkelrotfeld hat eine physiologisch ungünstige Emissionsverteilung, die Energie des Feldes beträgt 2×10^4 erg cm⁻² sec⁻¹. Im Dauerlicht und Dauerdunkelrot ist gegenüber den Kontrollen vornehmlich das Wurzelwachstum gehemmt.

Während in Übereinstimmung mit WAGNER und MOHR (1966) die Steigerung der Farbstoffsynthese durch die applizierten kurzen Expositionen im HR vornehmlich in den Kotyledonen abläuft, ist bei

Fütterung mit α -MT eine deutliche Zunahme des Anthocyangehalts auch in den oberen, direkt unter dem Kotyledonarhaken gelegenen Bereichen des Hypokotyls zu beobachten.

Tabelle 2. *Wirkung steigender Konzentrationen von Isonicotinsäurehydrazid auf Wachstum und Anthocyangehalt Sinapis alba L. 4 Tage alte, im Dunkel ($52 \pm 0,5^\circ$ C) gezogene Keimlinge (5 min HR 3×10^3 erg cm⁻² sec⁻¹, 24 h nach Aussaat)*

| INSH m | 535 nm ϵ | g Frischgewicht 25 Keimlinge |
|----------------------|----------------------|---------------------------------|
| 0 | 0,060 | 1,65 |
| 10^{-4} | 0,044 | 1,66 |
| $2,5 \times 10^{-4}$ | 0,069 | 1,55 |
| 5×10^{-4} | 0,037 | 1,10 |
| $7,5 \times 10^{-4}$ | 0,026 | 0,94 |
| 10^{-3} | 0,020 | 0,86 |

Ob eine gleichzeitig auftretende Öffnung eines großen Anteils der Kotyledonarhaken α -MT behandelte Pflanzen ein direkter Effekt des Inhibitors ist oder erst sekundär durch geotrope Beeinflussung der Keimlinge hervorgerufen wird, ist noch nicht geklärt. Bedingt durch die starke Hemmung des Wachstums der Keimwurzel ist die Standfestigkeit der Keimlinge auf dem Substrat aus feuchtem Filtrierpapier äußerst gering. Geotrope Reize während der ersten Wachstumsphasen können somit als Ursache der Hakenöffnung nicht ganz ausgeschlossen werden.

Einzig nachweisbares Umsetzungsprodukt des α -D, L-MT in den angewandten Umsetzungszeiten war eine Verbindung, die nach ihrem chromatographischen und papierelektrophoretischen Verhalten als α -Methyl-D-Malonyltryptophan angesprochen werden kann.

Die Förderung der Anthocyanynthese durch α -MT ist kein direkter Effekt der Wachstumshemmung. Isonicotinsäurehydrazid, das in Konzentrationen über 10^{-4} m eine vergleichbare Hemmung des Sproß- und Wurzelwachstums hervorruft, ist ohne Wirkung auf die Anthocyanynthese (Tabelle 2).

Diskussion

Als Wirkung einer Applikation von α -Methylaminosäuren werden in vivo und in vitro vornehmlich Hemmungen der Transaminierung und Decarboxylierung nativer Aminosäuren beschrieben. Dieser Effekt wird neben dem wirksameren 5-Hydroxy- α -Methyltryptophan auch dem bei unseren Versuchen angewandten α -MT zugeschrieben. Trotz dieser

Hemmung der Decarboxylase wird jedoch für beide Analoga über einen Abbau zu den entsprechenden Aminen berichtet (WEISSBACH u. Mitarb., 1960). Aus den hier dargestellten Ergebnissen wurde darüberhinaus eine N-Malonylesterbildung α -Methyl-D-tryptophans wahrscheinlich, dies in Übereinstimmung mit der Umsetzung von D-Tryptophan in *Sinapis alba* (SCHRAUDOLF und BERGMANN, 1965).

In Tieren und Mikroorganismen ist für α -MT die Fähigkeit zur Induktion der Tryptophanpyrrolase nachgewiesen worden (GREENGARD, 1964; MADRAS und SOURKES, 1965); ein Effekt, mit dem auch die Wirkung von α -MT auf die Biogenese von Actinomycin D in Verbindung gebracht worden ist (SIVAK und KATZ, 1962).

Beide Effekte reichen zur Erklärung der gesteigerten Anthocyan-synthese nicht aus. Tryptophanpyrrolase ist in höheren Pflanzen bislang nicht nachgewiesen. Die Hemmung der Decarboxylase bzw. Aminosäuretransaminasen wird auch durch Isonicotinsäurehydrazid, einen spezifischen Blocker pyridoxalphosphatabhängiger Enzyme erzielt, ohne daß diese Verbindung einen entsprechenden Effekt auf die Farbstoff-synthese zeitigt.

Gerade die nach Applikation dieses Inhibitors erzielten Ergebnisse zeigen auch, daß die evtl. mit einer Wachstumshemmung verbundene Reduktion der Proteinsynthese und ein damit verbundener Anstieg in der Konzentration von Vorstufen bzw. energieliefernden Verbindungen nicht ausreicht, die Steigerung der Anthocyansyntheserate nach Fütterung von α -MT zu erklären.

Solange zwischen der Synthese der Indolglucosinolate und der Genese des Flavanskeletts keine biochemische Korrelation nachgewiesen ist, bietet auch die von uns beobachtete Hemmung der Rate der Glucobrassicin- und Neoglucobrassicinsynthese keinen Anhaltspunkt zur Interpretation der demonstrierten Ergebnisse. Dies um so mehr, als in *Tropaeolum majus* eine entsprechende Hemmung der Biogenese des Glucotropaeolins von uns nicht nachgewiesen werden konnte. Die Umsetzung des Phenylalanins, einer direkten Vorstufe der Flavonoide wird demnach durch α -MT nicht beeinflusst.

Solange eine biochemische Analyse der in *Sinapis* durch α -MT verursachten Veränderungen im Stoffwechsel aussteht, muß die Frage nach der Causa der nach Applikation dieser Verbindung einsetzenden Steigerung der Anthocyansynthese als offen betrachtet werden. Wir selbst versuchen durch Anwendung weiterer Indolverbindungen und anderer spezifisch wirkender Inhibitoren zur Klärung dieser Frage beizutragen.

Offen ist auch noch, ob die schwache Förderung der Anthocyan-synthese ohne HR-Belichtung real, d.h. ob ein teilweiser Ersatz der

photobiologischen Induktion der Anthocyansynthese durch α -MT möglich ist. Der steile Anstieg der Dosis-Effektkurve (Abb. 2) läßt nicht ausschließen, daß schon die geringe Belichtungszeit bei der Aussaat genügt, einen entsprechenden Effekt auszulösen. Der gleichartige zeitliche Verlauf der Dosis-Effektkurven spricht zunächst einmal gegen eine Sensibilisierung des induzierenden Systems durch α -MT.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Fräulein F. ONDERKA danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Literatur

- GREENGARD, O.: Tryptophan analogues and the mechanism of induction of rat-liver tryptophanpyrrolase, in vivo. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) **85**, 492—494 (1962).
- MADRAS, M. K., and T. L. SOURKES: Metabolism of α -Methyltryptophan. *Biochem. Pharmacol.* **14**, 1499—1506 (1965).
- MOHR, H.: Der Einfluß monochromatischer Strahlung auf das Längenwachstum des Hypocotyls und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von *Sinapis alba* L. (*Brassica alba* Boiss.) *Planta* (Berl.) **49**, 389—405 (1957).
- SCHRAUDOLF, H., u. F. BERGMANN: Der Stoffwechsel von Indolderivaten in *Sinapis alba* L. II. Untersuchungen zur Biogenese und Umsetzung von Indolglucosinolaten mit Hilfe von ringmarkiertem C-14-Tryptophan und S-35-Sulfat. *Planta* (Berl.) **67**, 75—95 (1965).
- SIVAK, A., and E. KATZ: Biosynthesis of the actinomycinchromophore. Influence of α -4-, 5-, and 6-Methyl-DL-tryptophan on actinomycin synthesis. *Biochim. biophys. Acta.* (Amst.) **62**, 80—90 (1962).
- WAGNER, E., E. BIENGER u. H. MOHR: Die Steigerung der durch Phytochrom bewirkten Anthocyansynthese des Senfkeimlings (*Sinapis alba* L.) durch Chloramphenicol. *Planta* (Berl.) **75**, 1—9 (1967).
- , u. H. MOHR: Kinetische Studien zur Interpretation der Wirkung von Sukzedanbestrahlungen mit Hellrot und Dunkelrot bei der Photomorphogenese (Anthocyansynthese bei *Sinapis alba* L.). *Planta* (Berl.) **70**, 34—41 (1966).
- — „Primäre“ und „sekundäre“ Differenzierung im Zusammenhang mit der Photomorphogenese von Keimpflanzen (*Sinapis alba* L.). *Planta* (Berl.) **71**, 204—221 (1966).
- WEISSBACH, H., W. LOVENBERG, and S. UNDENFRIEND: Enzymatic decarboxylation of α -methylamino acids. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **3**, 225—227 (1960).

Dr. H. SCHRAUDOLF
Botanisches Institut der Universität Gießen
63 Gießen, Senckenbergstr. 17—21