

Einfluß von Gibberellinsäure (GA₃) auf die PAL-Aktivität und die Synthese von Phenylpropanderivaten in Zellkulturen von *Haplopappus gracilis*

Brief Report

HEINZ DETLEF GREGOR

Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der Freien Universität Berlin, Deutschland

Mit 2 Abbildungen

Eingegangen am 16. Oktober 1973

Summary

Effect of Gibberellic Acid (GA₃) on Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity and on the Synthesis of Phenylpropanoid Compounds in Cell Cultures of *Haplopappus gracilis*

Gibberellic acid (10^{-6} g GA₃/ml) present in the medium during 48 hours of irradiation with blue light completely inhibited anthocyanin production in *Haplopappus* cultures and PAL activity was 60% lower by this treatment. In the dark only a 35% inhibition of the enzyme was found. Compared to untreated controls synthesis of phenylpropane derivatives after addition of GA₃ showed a 40% inhibition in the blue light irradiated cultures and a 5% lower level in the cultures kept in the dark.

Die Anthocyan synthese, die bei *Haplopappus gracilis* durch Bestrahlung mit Blaulicht induziert wird, kann durch Gibberellin vollständig gehemmt werden (REINERT *et al.* 1964, LACKMANN 1968). Auch Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, EC. 4.3.1.5.), ein Enzym auf dem Biosyntheseweg des Anthocyan, das für die Produktion von Phenylpropankörpern für den B-Ring verantwortlich ist, wird durch Blaulicht induziert (GREGOR und REINERT 1972). Die folgenden Untersuchungen betreffen den Einfluß des Gibberellins auf die PAL-Aktivität und die Synthese von Phenylpropanderivaten in Zellkulturen von *Haplopappus gracilis*. Versuchsmaterial waren Zellkulturen aus dem Sproß von *Haplopappus gracilis* (REINERT und TORREY 1961), die auf Medium nach WHITE (1954) mit Zusatz von 2% Saccharose, 0,6% Difco-Agar und 5×10^{-9} g 2,4-D/ml (= 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) bei 23 °C im

Dunkeln gehalten wurden. Die verwendeten Suspensionskulturen¹ auf B-5-Medium (GAMBORG 1966) erhielten Dauerweißlicht (2000 Lux) bei 25 °C. Das Zellmaterial der Agarkulturen wurde alle 4 Wochen auf frisches Medium übertragen, 3 Wochen nach der Übertragung waren diese Kulturen für Versuche zur Anthocyan synthese und zur Bestimmung der PAL-Aktivität am besten geeignet. Die Transferperioden der Suspensionen betragen 10 Tage. Die Methoden der Bestrahlung mit Blaulicht sowie die Bestimmung des Proteingehalts sind an anderer Stelle bereits beschrieben worden (GREGOR und REINERT 1972). Die Bestimmung des Anthocyan gehalts erfolgte photometrisch bei 546 nm in Extrakten von 1 g Zellmaterial mit 10 ml HCl-Propanolgemisch (HCl 1, Propanol 25, Wasser 74). Zur Bestimmung der spezifischen PAL-Aktivität wurde 1 g Gewebe mit 1,5 ml Boratpuffer (0,2 M; pH 8,8 mit einem Zusatz von 30 mMol Mercaptoäthanol/l) und ca. 1 g Seesand im eisgekühlten Mörser 10 Minuten homogenisiert, bei 5500 g 15 Minuten zentrifugiert (0 °C) und der Überstand als Enzymquelle zur Inkubation verwendet. Das Reaktionsgemisch enthielt 0,1 ml Homogenat, 10 µMol L-Phenylalanin und 0,2 mMol Natriumborat pro ml und hatte einen pH-Wert von 8,8. Während der Inkubation bei 40 °C ($\pm 0,3^\circ$) konnte die PAL-Aktivität an Hand der sich bildenden *trans*-Zimtsäure bei 280 nm direkt bestimmt werden. Die Phenylpropanderivate wurden aus je 1 g Zellmaterial mit 5 ml 80prozentigem Äthanol durch Erhitzen im kochenden Wasserbad extrahiert, nach dem Abkühlen zentrifugiert, der Rückstand mit 80prozentigem Äthanol gewaschen und die Lösung auf 10 ml aufgefüllt. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 330 nm, dem Absorptionsmaximum der Kaffeesäure, wobei 0,2 ml alkoholischer Extrakt mit 2,8 ml 80prozentigem Alkohol verdünnt und gegen 80prozentiges Äthanol gemessen wurde.

Versuche zur Darstellung der Wirkung von Gibberellinsäure (GA₃) auf die PAL-Aktivität, die Anthocyan synthese und die Synthese von Phenylpropanderivaten wurden unter Blaulichtbestrahlung sowie im Dunkeln durchgeführt. Die Gibberellinsäure (10⁻⁶ g/ml) wurde den Zellen nach Überführung von Agar in flüssiges White-Medium steril zugegeben. Die Kulturen kamen während der Inkubationszeit von 48 Stunden auf Horizontalschüttler. Als Kontrollen dienten Kulturen ohne Gibberellin, aber mit sonst gleicher Behandlung. Wie nach den Ergebnissen von LACKMANN (1968) zu erwarten war, hemmte eine Gibberellinkonzentration von 10⁻⁶ g/ml Nährlösung die Anthocyan synthese völlig. Die PAL-Aktivität im Blaulicht wurde durch GA₃ um 60% und die Synthese der Phenylpropanderivate um 40% gehemmt (Abb. 1). Im Dunkeln war bei PAL eine nur 35prozentige Hemmung und bei den Zimtsäurederivaten fast keine Hemmung mehr festzustellen. Gibberellin war in den vorliegenden Versuchen bei der Hemmung der PAL-Aktivität und der

¹ Die Suspensionskulturen wurden von Prof. O. L. GAMBORG, Prairie Laboratories Saskatoon, Canada, zur Verfügung gestellt.

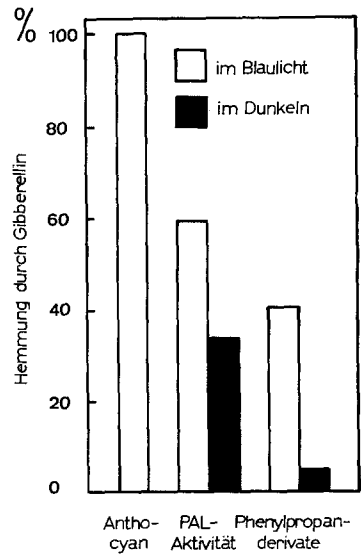


Abb. 1. Hemmung der Anthocyansynthese, der PAL-Aktivität und der Bildung von Phenylpropanderivaten durch Gibberellinsäure in Blaulicht-bestrahlten und dunkel gehaltenen *Haplopappus*-Kulturen bei 23 °C. Hemmstoffkonzentration: 10^{-6} g GA_3 /ml Nährlösung; Kontrollen ohne Gibberellin. Blaulichtbestrahlung erfolgte mit 12 000 erg/cm²sec. Durchführung des Versuchs im Text beschrieben

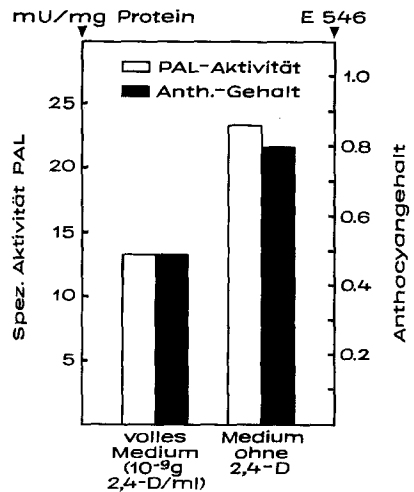


Abb. 2. Einfluß von 2,4-D-Entzug auf PAL-Aktivität und Anthocyanengehalt von *Haplopappus*-Suspensionskulturen. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität und des Anthocyanengehalts erfolgte 10 Tage nach Entzug des Auxins. Der Anthocyanengehalt ist als Extinktion eines Gewebeextraktes in HCl-Propanol-Gemisch angegeben

Anthocyan synthese wesentlich stärker wirksam, als von STAFFORD (1965) für die Lignifizierung bei *Phleum* beschrieben, für die PAL einen der limitierenden Faktoren darstellt (CHENG und MARSH 1968). Durch Zugabe von 10^{-3} bis 10^{-1} g/ml Medium wurde die Lignifizierung bei *Phleum* nur leicht gehemmt. Seine und die vorliegenden Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Befunden von REID und MARSH (1969) sowie CHENG und MARSH (1968), die eine durch Licht nicht beeinflussbare Förderung der PAL-Aktivität und der Lignifizierung durch Gibberellin bei verschiedenen Spezies erzielten. Auch eine antagonistische Funktion von Licht und Gibberellin, wie etwa von FURUYA und THIMANN (1964) für *Spirodela* beschrieben, konnte bei *Haplopappus* unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht gefunden werden.

Eine vollständige Deutung der gibberellinabhängigen Hemmung bei den vorliegenden Untersuchungen wird allerdings dadurch erschwert, daß Auxin (2,4-D) im Kulturmedium ebenfalls PAL und die Pigmentsynthese hemmt. Versuche in dieser Richtung an Suspensionskulturen von *Haplopappus gracilis* ergaben, daß Entzug von 2,4-D innerhalb von 10 Tagen im Dauer-Weißlicht (2000 Lux) zu einer 73% höheren PAL-Aktivität und einer Förderung der Anthocyan synthese um 60% führten (Abb. 2). Ein ähnliches Ergebnis wurde von SUGANO und HAYASHI (1967) bei Karotten erreicht. Die Versuche mit 2,4-D können allerdings nicht direkt mit den erzielten Gibberellineffekten in Beziehung gebracht werden, da die übrigen Versuchs- und Kulturbedingungen sehr stark divergieren. Das Medium der Suspensionskulturen (GAMBORG 1966) hatte einen wesentlich höheren Gehalt an Salzen, und die Wuchsstoffkonzentration (10^{-6} g/ml) lag erheblich über der des Agarmediums (5×10^{-9} g/ml). Daß Gibberellin nicht direkt auf PAL wirkt, konnte dadurch gezeigt werden, daß nach Zugabe dieses Wirkstoffs zu Kartoffelhomogenat (REID und MARSH 1969) die PAL-Aktivität unverändert hoch blieb. Gegen eine direkte Wirkung spricht bei den vorliegenden Versuchen mit *Haplopappus* auch die verschieden starke Hemmung im Licht und im Dunkeln. Die relativ geringe Hemmung der PAL und der Synthese der Phenylpropanderivate im Dunkeln zeigt, daß die Gibberellinwirkung in diesem Fall lichtabhängig ist. Bei *Haplopappus* zerfällt die Anthocyan synthese in zwei Phasen, deren erste auch im Dunkeln ablaufen kann, während die zweite lichtabhängig ist (GREGOR 1973). Da im Blaulicht, bei 60prozentiger Hemmung der PAL-Aktivität, die Anthocyan synthese vollständig unterdrückt wird, ist der hauptsächliche Wirkungsort für Gibberellin im zweiten, lichtabhängigen Teil des Anthocyan syntheseweges zu erwarten.

Literatur

- CHENG, C. K. G., and H. V. MARSH, 1968: Gibberellic acid-promoted lignification and phenylalanine ammonia-lyase activity in a dwarf-pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* **43**, 1755—1759.
- FURUYA, M., and K. V. THIMANN, 1964: The biosynthesis of anthocyanins. XI. Effects of gibberellic acid in two species of *Spirodela*. *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 109—116.
- GAMBORG, O. L., 1966: Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. *Canad. J. Biochem.* **44**, 791—799.
- GREGOR, H. D., 1973: Beziehungen zwischen PAL-Aktivität in Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis* und der Synthese von Phenylpropanderivaten (in Vorbereitung).
- und J. REINERT, 1972: Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Gewebekulturen von *Haplopappus gracilis*. *Protoplasma* **74**, 307—319.
- LACKMANN, I., 1968: Anthocyanbildung in Gewebekulturen und Keimlingen von *Haplopappus gracilis* und ihre Abhängigkeit vom Licht. Dissertation Math.-Nat. Fak. Freie Universität Berlin.
- REID, P. D., and H. V. MARSH, 1969: Gibberellic acid promoted activity of L-phenylalanine ammonia lyase in several plant species. *Z. Pflanzenphys.* **61**, 170—172.
- REINERT, J., H. CLAUSS und R. v. ARDENNE, 1964: Anthocyanbildung von *Haplopappus gracilis* im Licht verschiedener Qualität. *Naturwiss.* **51**, 87.
- und A. TORREY, 1961: Über die Kultur von Geweben aus *Haplopappus gracilis*. *Naturwiss.* **48**, 132—133.
- STAFFORD, H. A., 1965: Factors controlling the synthesis of natural and induced lignins in *Phleum* and *Elodea*. *Plant Physiol.* **40**, 844—851.
- SUGANO, N., and K. HAYASHI, 1967: Dynamic interrelation of cellular ingredients relevant to the biosynthesis of anthocyanin during tissue culture of carrot aggregen. *Studies on anthocyanin LVII. Bot. Mag. Tokyo* **80**, 440—449.
- WHITE, P. R., 1954: *The cultivation of animal and plant cells*. New York: Ronald Press.

Anschrift des Verfassers: Dr. H. D. GREGOR, Institut für Pflanzenphysiologie der Freien Universität Berlin, Königin Luise-Straße 12—16 a, D-1000 Berlin 33, Deutschland.