

Über den Zusammenhang der Biogenese von Anthocyan und Leukoanthocyan

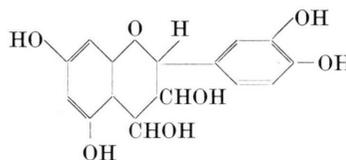
VON MARTIN BOPP und BLANKA MATTHISS

Aus dem Institut für Botanik der Technischen Hochschule Hannover
(Z. Naturforschg. 17 b, 811—818 [1962]; eingegangen am 27. September 1962)

Es wurden Markierungsversuche mit Phenylalanin (Carboxyl-¹⁴C) zur Kennzeichnung des Biosynthesewegs der Leukoanthocyane bei *Impatiens balsamina* vorgenommen. Unter geeigneten Umständen wird Phenylalanin genau so in die Leukoanthocyane wie in Anthocyane und Flavonole eingebaut. Die Einbaureate liegt in der gleichen Größenordnung wie bei diesen Substanzen. Bei einmaliger Versorgung mit Phenylalanin-¹⁴C nimmt die spezifische Aktivität im Leukoanthocyan zunächst zu und nach dem Erscheinen von Anthocyan wieder ab. Der Kurvenverlauf der spezifischen Aktivitäten beider Stoffe spricht dafür, daß Leukoanthocyan in den Keimlingen von *Impatiens* eine Vorstufe auf dem Syntheseweg des Anthocyans ist.

Vorkommen und Verbreitung von Leukoanthocyan wurde in den letzten Jahren sehr gründlich untersucht^{1, 2} und nach dem Bekanntwerden ihrer genauen Konstitutionsformel als Flavan-3,4-diole³ (Formel 1) auch ihre Bedeutung im Zusammenhang mit der Synthese anderer Flavonoide mehrfach diskutiert. Danach treten die Leukoanthocyane bei bestimmten Pflanzen⁴⁻⁷ und unter bestimmten Bedingungen⁸ als Endprodukte der Biosynthese auf, wobei sie bei der Verholzung⁹, als Gerbstoffe^{10, 11} und unter Umständen auch als Wuchsstoffe¹² eine Rolle spielen können. Vielfach wird aber auch auf ihre Bedeutung als Zwischenstufen auf dem Wege der Anthocyan-Synthese hingewiesen. Dieser Zusammenhang mit den Anthocyanen ist bisher aber ausschließlich auf indirektem Wege erschlossen worden, entweder durch genetische Experimente mit farblosen oder flavonolbildenden Mutanten, die aber durchaus verschieden interpretiert werden können¹³ oder aus dem häufigen gemeinsamen Vorkommen sowie aus zeitlich nacheinander erfolgendem Auf-

treten^{14, 15}. In keinem Falle ist aus diesen Beobachtungen jedoch eine absolut eindeutige Aussage möglich, wie überhaupt die Beschreibung statischer Zustände nur schwer das dynamische Geschehen wirklich zu erfassen vermag.



Formel 1.

Eine Entscheidung, ob die natürlicherweise in den Pflanzen anzutreffenden Leukoanthocyane von der Pflanze selbst unmittelbar in Anthocyane umgewandelt werden, wie es im Reagenzglas durch Kochen mit verdünnten Mineralsäuren möglich ist², kann nur auf Grund von Versuchen mit markierten Vorstufen geklärt werden. Auf diese Weise wurde bisher der Biosyntheseweg der meisten anderen Flavonoide (Anthocyane^{16, 17}, Flavone¹⁸, Flavonole^{19, 20},

¹ O. ROSENHEIM, *Biochem. J.* **14**, 178 [1920].
² E. C. BATE-SMITH, *Biochem. J.* **58**, 122 [1954]; E. C. BATE-SMITH u. N. H. LERNER, **58**, 126 [1954].
³ A. K. GANGULY, T. R. SESHADRI u. P. SUBRAMANIAN, *Tetrahedron* **3**, 225 [1958]; F. E. KING u. W. BOTTOMLEY, *J. chem. Soc. [London]* **1954**, 1399; H. H. KEPPLER, **1957**, 2721.
⁴ K. PAECH, *Fortschr. Bot.* **17**, 578 [1955].
⁵ T. ENDO, *Japan. J. Genetics* **33**, 333 [1958].
⁶ R. E. ALSTON u. C. W. HAGEN, *Genetics* **43**, 35 [1958].
⁷ M. BOPP, *Z. Bot.* **47**, 197 [1959].
⁸ M. BOPP, *Naturwissenschaften* **47**, 158 [1960].
⁹ W. E. HILLIS, *Austral. J. exp. Biol. med. Sci.* **9**, 263 [1956].
¹⁰ E. C. BATE-SMITH u. C. R. METCALFE, *J. Linn. Soc. [London]* **55**, 669 [1957]; W. MAYER, *Handb. Pflanzenphysiol.* **10**, 354 [1958].
¹¹ M. BOPP, *Z. Bot.* **48**, 153 [1960].
¹² F. C. STEWART u. E. M. SHANTZ, *Proc. IV. Int. Congr. of Biochem.* Vol. **VI**, 223 [1959]; F. C. STEWART, in: *Synthe-*

sis of Molecular and Cellular Structure. Ronald Press. Comp., 1960.
¹³ S. G. STEPHENS, *Arch. Biochemistry* **18**, 449 [1948]; W. SEYFFERT, *Z. Vererbungslehre* **87**, 311 [1955].
¹⁴ R. E. ALSTON u. C. W. HAGEN, *Nature [London]* **175**, 990 [1955].
¹⁵ N. W. SIMMONDS, *Ann. Botany* **18**, 471 [1954]; *Nature [London]* **173**, 402 [1954].
¹⁶ H. GRISEBACH, *Z. Naturforschg.* **12b**, 227 [1957]; **12b**, 597 [1957].
¹⁷ H. GRISEBACH, *Z. Naturforschg.* **13b**, 335 [1958].
¹⁸ H. REZNIK u. R. URBAN, *Naturwissenschaften* **22**, 13 [1957]; **22**, 592 [1957].
¹⁹ T. A. GEISSMAN u. T. SWAIN, *Chem. and Ind.* **1957**, 984.
²⁰ E. W. UNDERHILL, J. E. WATKIN u. A. C. NEISH, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **35**, 219 [1957]; J. E. WATKIN, E. W. UNDERHILL u. A. C. NEISH, **35**, 229 [1957].

Isoflavone²¹) aufgeklärt. Der Biosyntheseweg verläuft bei allen diesen Substanzen in den ersten Abschnitten gleich. Außerdem ließ sich nachweisen, daß er im letzten Abschnitt völlig parallel verläuft, wenn mehrere dieser Substanzen in einer Zelle gefunden werden²², wobei die Gabelung vermutlich auf der Stufe der Chalkone erfolgt²³. Es ist deshalb zu erwarten, daß die Vorstufen der übrigen Flavonoide auch die des Leukoanthocyans sind. Wir wählten daher zur radioaktiven Markierung, wie bei jenen, Phenylalanin-¹⁴C, das irreversibel in Zimtsäure umgewandelt wird²⁴ und damit für die Flavonoidsynthese zur Verfügung steht.

Methode

Als Versuchspflanzen verwendeten wir Keimlinge von *Impatiens balsamina* „gefüllte Prachtmischung“ der Fa. Hambrecht, Freiburg/Breisgau. Diese bilden in ihrem Hypokotyl einige Zeit nach der Keimung sowohl Leukoanthocyan als auch Anthocyan²⁵. Da die Leukoanthocyan-Synthese nur quantitativ lichtabhängig ist, die Anthocyanbildung aber qualitativ⁸, lassen sich im Dunkeln leicht Keimlinge anziehen, die zwar Leukoanthocyan, aber kein Anthocyan ausgebildet haben. Durch Überführung derselben ins Licht (ungefähr 10 000 Lux) bilden dieselben nach kurzer Zeit Anthocyan (vgl. Tab. 2). Allerdings sind die etiolierten Pflanzen sehr empfindlich, weshalb sie nicht sofort in die hohe Lichtintensität überführt wurden, sondern in den endgültigen Versuchen zunächst für 10 Stdn. in 3500 Lux gehalten waren.

Anzucht und Versuchsanstellung

Es wurden jeweils 21 Samen in Petrischalen auf 2 Lagen angefeuchtem Filtrierpapier angekeimt. Die Schalen standen in einer Klimakammer von 25 °C, in der auch später die Versuche stattfanden und waren völlig verdunkelt. Aus jeder Schale entnahmen wir je nach Versuchsserie nach 6 oder mehr Tagen (vgl. experimenteller Teil) die 15 kräftigsten Pflanzen, schnitten unter Grünlicht die Wurzeln ab, und brachten danach die Pflänzchen in die Versuchsanordnung. Jeweils 3 Versuchspflanzen kamen in kleine Gläschen von 10 mm Höhe und 8 mm Durchmesser. Die Versuchsgläschen waren zu je 20 auf einem entsprechenden Brettchen fest eingesteckt, so daß eine möglichst gleichmäßige Beleuchtung der einzelnen Pflanzen einschließlich der Hypokotyle gewährleistet war. In die Gläschen wurde

die Testlösung mit Phenylalanin (Carboxyl-¹⁴C) eingegeben, und nachdem diese aufgenommen war, so oft wie notwendig dest. Wasser nachgegossen. (Weitere Einzelheiten der Markierung s. experimenteller Teil.)

Aufarbeitung von Anthocyan und Leukoanthocyan

A. Extraktion von Anthocyan und Leukoanthocyan

Um Anthocyane und Leukoanthocyane getrennt extrahieren zu können, entwickelten wir eine neue Methode, da bei allem bisher Verwendeten Anthocyan und Leukoanthocyan stets gemeinsam extrahiert werden²⁶. Zwar ist es mit einer früher von uns verwendeten Methode möglich, die beiden Substanzen auf dem Papierchromatogramm zu trennen²⁷, was aber im vorliegenden Fall zu keinem befriedigenden Ergebnis führt, da die Leukoanthocyane dabei am Startpunkt liegen bleiben^{27, 28}, an dem sich gleichzeitig noch eine große Menge anderer markierter Substanzen unbekannter Natur befinden, so daß eine quantitative Auswertung praktisch unmöglich ist. Die Extraktion der rotgefärbten Pflanzen wurde daher in reinem Methanol vorgenommen und sofort nach der Extraktion schwach angesäuert. Bei dieser Extraktionsmethode bleiben die Leukoanthocyane quantitativ im Gewebe zurück, wie Kontrollversuche an farblosen Keimlingen zeigten. Die Leukoanthocyane sind in reinem Methanol nicht löslich.

Nach Bestimmung des Frischgewichts wurden die Pflanzenteile hierzu mit kaltem Methanol übergossen (1 ml/0,1 g Frischgewicht) für 1 Min. auf 60 °C erwärmt, 3 Min. abgekühlt, dekantiert und die Flüssigkeit angesäuert. Mit den Pflanzenteilen wurde solange in derselben Weise verfahren, bis die dekantierte Flüssigkeit farblos blieb. Danach extrahierten wir noch 1 Stde. im Soxhlet-Apparat mit 6 cm³ Methanol, so daß die Hypokotyle sicher kein Anthocyan mehr enthielten. Zur Kontrolle wurden schließlich die Pflanzenteile in kalte 2-n. HCl gelegt, wobei diese Probe keine Rotfärbung mehr ergeben durfte. Danach konnten die Leukoanthocyane extrahiert werden.

Zunächst überführten wir das Leukoanthocyan durch 20 Min. Kochen in 2-n. HCl/Methanol (1 : 1) in Anthocyan. Die Flüssigkeit wurde danach dekantiert, und dieser Vorgang so lange wiederholt, bis die Pflanzenteile wiederum farblos blieben, was bei jungen Pflanzen nach 6- bis 7-mal der Fall war. Wir berücksichtigen in unseren Untersuchungen ausschließlich die auf diese Weise in Cyanidin überführbare und danach zu extrahierende Substanz, die einheitlicher Natur ist. Bei 12 Tage alten Keimlingen und älteren blieb ein nicht extrahierbarer sich rotfärbender Rest zurück, der auch

²¹ H. GRISEBACH, Z. Naturforschg. **14b**, 802 [1959]; H. GRISEBACH u. L. PATSCHKE, Chem. Ber. **93**, 2326 [1960]; H. GRISEBACH u. G. BRANDNER, Z. Naturforschg. **16b**, 2 [1961].

²² H. GRISEBACH u. M. BOPP, Z. Naturforschg. **14b**, 485 [1959].

²³ H. GRISEBACH u. L. PATSCHKE, Z. Naturforschg. **16b**, 645 [1961].

²⁴ O. L. GAMBORG u. A. C. NEISH, Canad. J. Biochem. Physiol.

37, 1277 [1959]; H. GRISEBACH u. W. D. OLLIS, Experientia [Basel] **11**, 1 [1961].

²⁵ R. E. ALSTON, Amer. J. Bot. **45**, 289 [1958].

²⁶ J. M. HAIS u. K. MACECK, Handbuch der Papierchromatographie, Jena 1958.

²⁷ M. BOPP, Planta **48**, 631 [1957].

²⁸ T. SWAIN, Chem. and Ind. **1954**, 1144.

mit verschiedenen anderen Lösungsmitteln bisher nicht extrahiert werden konnte. Es ist daher im Augenblick noch nicht zu entscheiden, ob es sich um Polymerisationsprodukte des Leukoanthocyans oder andere verwandte Substanzen (Phlobaphene) handelt, die sich bei Kochen mit Säuren ebenfalls rot färben²⁹, aber keine Leukoanthocyane sind. Durch die Nichtextrahierbarkeit sind sie eindeutig von dem vorher definierten Leukoanthocyan zu unterscheiden.

Zum Schluß wurde das Trockengewicht der extrahierten Pflanzenteile bestimmt.

B. Aufarbeitung der Extrakte und Chromatographie

Die vereinigten Extrakte des Anthocyans wurden im Rotationsverdampfer auf 2 cm³ eingengt, zur Reinigung von Chlorophyll zweimal mit Benzin ausgeschüttelt und danach die Lösung mit 20% HCl/Methanol 3 : 2 30 Min. vorsichtig erhitzt, wodurch das Anthocyan vollständig hydrolysiert war. Die Hydrolyse war notwendig, da dadurch der quantitative Vergleich mit dem stets als Aglycon vorliegenden Leukoanthocyan unmittelbar möglich war. Nach Eindampfen der Hydrolyselösung zur Trockene wurde mit einer geringen Menge Amylalkohol aufgenommen und in einem Mikroscheidetrichter mit gleicher Menge dest. Wasser ausgeschüttelt. Cyanidin geht dabei quantitativ in die Amylalkoholphase und kann papierchromatographisch aufgearbeitet werden.

Die Verarbeitung des in Cyanidin überführten Leukoanthocyans erfolgte in genau derselben Weise, nur konnte hier die Hydrolyse unterbleiben.

Die Chromatographie führten wir absteigend durch, eindimensionale Chromatogramme mit Forestalgemisch (Eisessig : Wasser : HCl = 30 : 10 : 3², bei zweidimensionalen fand in der zweiten Laufrichtung Kresol Verwendung. Auftrag der Flüssigkeit erfolgte mit Blutzuckerpipette 0,01 ml, Papier Schleicher & Schüll 2043 b.

C. Auswertung der Chromatogramme

1. Bestimmung der Anthocyanmenge und Aktivität auf Streifenchromatogrammen

Eindimensionale Chromatogramme wurden in 25 mm breite Streifen geschnitten, mit Beckmann-Spektralphotometer Modell B, Chromatogramm-Zusatzgerät und Kompensationsschreiber Linekomp. bei 550 m μ gemessen. Die Anthocyanmenge M wird nach der Formel $M = E \cdot a$ bestimmt, wobei E die höchste aufgezeichnete Extinktion sich aus $E = \log 1/D$ ergibt und a den Durchmesser des Anthocyanflecks bzw. die Basisbreite einer Zacke darstellt (vgl. Abb. 1). Nach einigen Vorversuchen und Verwendung verschiedener Meßgrößen (äußere Tangente, innere Tangente) ließ sich diese mit ziemlich großer Genauigkeit auf dem Densitogramm aus den Schnittpunkten der aufgezeichneten Kurve mit der Nulllinie ermitteln. Dies ist auch dann möglich,

wenn, wie mitunter in den radioaktiven Versuchen, die aufgezeichneten Kurven nicht so ideal wie in der Abb. 1 einem gleichschenkligen Dreieck entsprachen. Die Genauigkeit der Messungen wurde dadurch erhöht, daß die Chromatogramme in beiden Richtungen durchliefen und der Mittelwert genommen wurde. Eine Eichkurve mit reinem Cyanidin ergab nur sehr geringe Abweichungen (1,9%) von einer linearen Abhängigkeit der Größe M von den aufgetragenen Cyanidin-Mengen. Da für Anthocyane in reinen Lösungen in diesem Konzentrationsbereich das Lambert-Beer'sche Gesetz bekanntlich recht gut erfüllt ist^{11, 25, 30}, bedeutet das, daß man aus den Densitogrammen die Größe a mit genügender Genauigkeit bestimmen kann. Die Vergleiche ergaben, daß diese Bestimmung in unserem Falle auch einer „Halbwertsfleckenbreite“ vorzuziehen ist, da diese häufig die am Rande auslaufenden Flecken nicht genügend berücksichtigt. Bei gut gelaufenen Chromatogrammen läßt sich eine Differenz von 0,2 γ Cyanidin noch mit großer Sicherheit bestimmen.

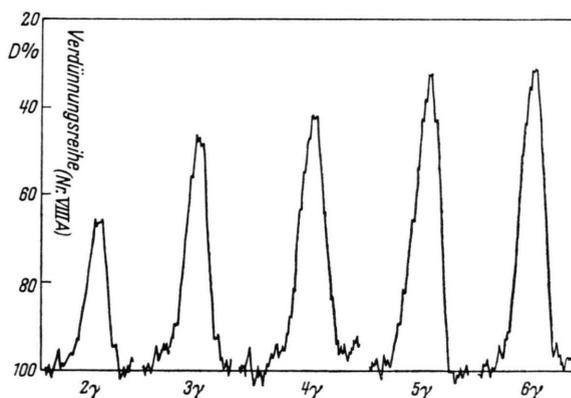


Abb. 1. Densitogramm einer Verdünnungsreihe einer reinen Cyanidinprobe von 2–6 γ . Die Gesamtmenge des Anthocyans ergibt sich aus der Extinktion ($E = \log 1/D$) mal dem Abstand a der beiden Schnittpunkte jedes Dreiecks mit der Abszisse.

Nach der Bestimmung der Anthocyanmenge wurden die Chromatogramme mit dem Endfensterzählrohr gemessen und die spezifische Aktivität als Impulse/Min./ γ Cyanidin festgestellt.

2. Bestimmung der Anthocyanmenge nach Elution

Bei größeren Anthocyanmengen war sowohl die Substanzmenge als auch die Aktivität mit mehr Genauigkeit bestimmbar, wenn der Farbstoff aus den Chromatogrammen eluiert wurde. Dazu chromatographierten wir in waagerechten Streifen über die ganze Bogenbreite in Forestalgemisch, schnitten die cyanidinhaltige Zone aus und eluierten zwischen 2 Objektträgern³¹ wiederum mit Forestalgemisch, das allen anderen Elutionsmitteln vorzuziehen ist. Durch andere Lösungsmittel

²⁹ K. FREUDENBERG u. K. WEINGES, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] **16**, 1 [1958].

³⁰ E. BAYER u. K. WEGMANN, Z. Naturforsch. **12b**, 37 [1957].

³¹ F. CRAMER, Papierchromatographie, Weinheim 1953.

läßt sich Anthocyan nicht quantitativ aus dem Papier entfernen. Das Eluat wurde mit Amylalkohol ausgeschüttelt, auf eine konstante Menge gebracht und die Extinktion im Zeiss-Spektrophotometer DU bei 530 m μ gemessen und mit einer zuvor aufgestellten Eichkurve verglichen. Die Aktivität der Lösung maßen wir nach dem Eindampfen des Lösungsmittels mit einem Methan-Durchflußzählrohr mit aufgeschraubtem dünnem Fenster (0,79 mg/cm²)*. Auch hieraus wurde wieder die spezifische Aktivität in ipm/ γ Cyanidin berechnet. Diese 2. Methode war allerdings nur zur Kontrolle bei größeren Cyanidmengen anwendbar (vgl. Abb. 3).

Experimenteller Teil

Keimlingsentwicklung und Auftreten der Farbstoffe

In Dauerlicht und Dauerdunkel beginnt die Keimung mit dem Aufreißen der Samenschale am 3. Tag nach der Aussaat. Bis zum 6. Tag erfolgt die Ausbildung eines aus 5 Wurzeln bestehenden Wurzelsystems und die Streckung des Hypokotyls. Im Licht werden dann die Kotyledonen entfaltet, gleichzeitig ergrünen sie, und das Hypokotyl färbt sich in der darauffolgenden Zeit rot. Im Dunkeln unterbleibt die Aufkrümmung des Hypokotyls, die Entfaltung der Kotyledonen und die Hypokotyl-Rotfärbung³². Auffallend ist, daß die äußersten Wurzelspitzen auch bei im Dunkeln gezogenen Keimlingen stets durch Anthocyan tief rot gefärbt sind.

Eine genaue Prüfung auf Leukoanthocyan und Anthocyan durch Extraktion der Farbstoffe zeigt bis zum 3. Tage weder den einen noch den andern der beiden Farbstoffe. Am 5. Tage tritt in Dauerlicht und im Dauerdunkel Leukoanthocyan in Wurzel und Hypokotyl auf, nicht aber in den Kotyledonen. Die Menge des gebildeten Leukoanthocyans ist im Licht größer als im Dunkeln (vgl. Tab. 1)^{33, 34}. Diese Lichtabhängigkeit ist aber nicht auf eine direkte Lichtwirkung, sondern auf eine Abhängigkeit von der Photosynthese in den Kotyledonen zurückzuführen^{8, 11}.

	im Licht [%]	im Dunkeln [%]
Hypokotyl	100	45
Wurzel	100	100

Tab. 1. Maximale Leukoanthocyanbildung in den Keimlingen von *Impatiens balsamina*.

Im Gegensatz dazu entsteht das Anthocyan des Hypokotyls nur bei Belichtung. Es tritt im Dauerlicht zum erstenmal am 6. Tage nach der Aussaat sichtbar

* Für die Hilfe bei den radioaktiven Messungen, für die Cyanidinproben und einige Hinweise danken wir Herrn Doz. Dr. H. GRISEBACH, Chem. Lab., Freiburg/Breisgau.

³² H. MOHR, Annu. Rev. Plant Physiol. **13**, 465 [1962], bes. Seite 472.

³³ W. E. HILLIS u. T. SWAIN, Nature [London] **179**, 586 [1957].

Keimlingsalter Tage	Dauerdunkel		Dauerlicht	
	Leukoanthocyan	Anthocyan	Leukoanthocyan	Anthocyan
1	—	—	—	—
3	—	—	—	—
5	+	—	+	—
6	+	—	+	+

Tab. 2. Leukoanthocyan- und Anthocyan synthese in Abhängigkeit vom Keimlingsalter.

auf (Tab. 2). Durch die unterschiedliche Lichtabhängigkeit ist es möglich, den Beginn der Anthocyan- und der Leukoanthocyan-Synthese zeitlich gut voneinander zu trennen. Dies ist für die Markierungsversuche von großer Bedeutung. Für das in Tab. 3 dargestellte Experiment wurden die Pflanzen bis zum 8. Tag nach der Aussaat im Dunkeln gehalten und dann belichtet. Die Gesamtmenge des extrahierbaren Leukoanthocyans nimmt zunächst stark zu, vom 12. Tag nach der Aussaat an aber wieder ab. Da die Ausbeute an Anthocyan bei der Umwandlung unter unseren Bedingungen in wäßriger Lösung wahrscheinlich nicht 100% beträgt^{35, 36}, so ergibt der quantitative Vergleich von Anthocyan und Leukoanthocyan (als gebildetes Cyanidin) wohl nicht das ganz richtige Bild²⁵. Die Veränderung der Stoffmenge in der Zeit dagegen wird richtig dargestellt, da der Prozentsatz der Ausbeute auch, wenn er weniger als 100% beträgt, konstant bleibt.

Extraktion Tage nach Aussaat	Gesamtmenge in γ Cyanidin/ 60 Keimlingen	
	Leukocyanidin	Cyanidin
8 = Belichtungsbeginn	3,8	0
10	33,7	100
12	88	280
14	51	468
16	0	700

Tab. 3. Quantitative Beziehungen zwischen Leukoanthocyan- und Anthocyanbildung während der Keimlingsentwicklung.

Das Anthocyan tritt erstmals einige Stdn. nach Belichtungsbeginn auf, hat nach 2 Tagen die erfassbare Menge des Leukoanthocyans schon weit übertroffen und steigt im Verlauf der Versuchszeit ungefähr linear an. Bei länger dauernden Versuchen nimmt der absolute Anthocyan gehalt im Hypokotyl schließlich nicht mehr zu.

³⁴ R. E. ALSTON, Bot. Gazette **120**, 99 [1958].

³⁵ F. E. KING u. J. W. CLARK-LEVIS, J. chem. Soc. [London] **1955**, 3384; W. E. HILLIS u. G. URBACH, Nature [London] **182**, 657 [1958].

³⁶ D. G. ROUX u. M. C. BILL, Nature [London] **183**, 42 [1959].

Qualitative Versuche zur Markierung des Leukoanthocyans

In früheren Untersuchungen¹¹ war es uns nicht gelungen, an Wundrändern entstehendes Leukoanthocyan mit Acetat¹⁶ zu markieren, obwohl die Radioaktivität sich am Wundrand akkumulierte. Bei den Versuchen mit *Impatiens* gelang dies mit Acetat ebenfalls nicht. Zunächst hatten wir allerdings auch mit Phenylalanin-¹⁴C keinen eindeutigen Erfolg. Wir führten eine Reihe von verschiedenen Versuchsanstellungen durch, die in der folgenden Tabelle zusammengefaßt sind (Tab. 4).

In jedem Versuch war stets genug Leukoanthocyan und – außer in den Versuchen 2 und 3 – auch genügend Anthocyan vorhanden, um die Cyanidinflecken auf dem Papierchromatogramm einwandfrei zu identifizieren. Die Ergebnisse der Ausmessung mit dem Endfensterzählrohr konnten außerdem mit Hilfe von Autoradiogrammen (Transparent-Röntgenfilm, Adox 18×24, Doneo, 14 Tage belichtet) eindeutig bestätigt werden (vgl. Abb. 2).

Betrachtet man die Versuche im einzelnen, so zeigt zunächst der unter Nr. 1 aufgeführte eine deutlich sichtbare Markierung des Anthocyans. Wesentlich stärker waren 2 Flavonole markiert, die 532 bzw. 521 ipm aufwiesen (es handelt sich hier nicht um die spezifische Aktivität, da die Substanzmengen nicht bestimmt wurden). Abb. 2 gibt ein Autoradiogramm dieses Versuches. Das Leukoanthocyan (nicht auf demselben Chromatogramm) blieb praktisch unmarkiert. Da in diesem Versuch die Anthocyan-Synthese bei Fütterungsbeginn schon eingesetzt hatte, ist dies möglicherweise eine der Ursachen für das Ausbleiben der Markierung im Leukoanthocyan. Daraus kann man den Schluß ziehen, daß zum Zeitpunkt des Versuchsendes möglicherweise das turn-over des Leukoanthocyans schon so hoch ist,

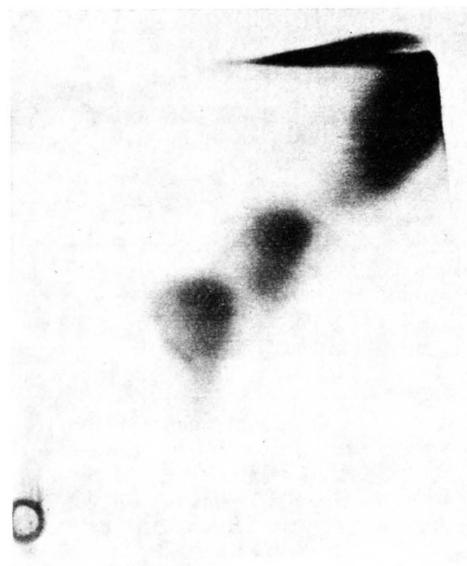


Abb. 2. Autoradiogramm eines zweidimensionalen Chromatogramms. Fütterung der Pflanzen mit Phenylalanin-¹⁴C. Die stark markierten Stellen in der Mitte des Chromatogramms sind 2 Flavonole. Dazwischen weniger geschwärzt das (in geringerer Konzentration vorliegende) Cyanidin. Startpunkt links unten.

daß sich eine Markierung nicht mehr erfassen läßt, weil alle neu synthetisierten und dabei neu markierten Moleküle sehr rasch wieder in weitere Produkte umgewandelt werden. Zu erwähnen ist allerdings auch, daß durch die unmittelbare Überführung der Pflanzen vom Dunkeln in 10 000 Lux diese stark geschädigt wurden, so daß es nicht zu einer normalen Ausbildung des

Lfd. Nr.	Versuchs-anordnung	Anzahl der Pflanzen	Markierung ¹ m. Phenylalanin- ¹⁴ C	Belichtung Lux	Fütterungsbeginn ² Tag	Versuchsdauer ³ Belichtungsdauer (Tage)	Anthocyan [ipm] ⁴	Leukoanthocyan [ipm] ⁴
1	Wurzellose Pflanzen	20	0,0025 m C	10000	7.	7–10	+ 58	+ 8
2	Bewurzelte Pflanzen	80	0,0012 m C	3500	1.	1–5	–	– 2
3	Bewurzelte Pflanzen	20	0,006 m C	dunkel	1.	1–5	–	– 4
4	Bewurzelte Pflanzen	20	0,006 m C	3500 } 10000 }	1.	1– 6 } 6–10 }	± 0	– 3
5	Bewurzelte Pflanzen	40	0,0012 m C	10000	5.	5–8	± 0	+ 11
6	Wurzellose Pflanzen	30	0,0025 m C	3500 } 10000 }	5.	5–6 } 7–8 }	+ 44	+ 70

¹ Jeweils Gesamtmenge der in einem Versuch gegebenen Aktivität; diese wurde gleichmäßig auf alle Pflanzen verteilt. ² Die zunächst gegebene Lösung wurde innerhalb kurzer Zeit (~12 Stdn.) aufgenommen, es wurde dann stets mit dest. Wasser nachgefüllt. ³ Auswertung erfolgte jeweils am Tage des Versuchsendes. ⁴ ipm (Impulse/Min.) jeweils über Nulleffekt.

Tab. 4. Zusammenfassende Darstellung der Versuche zur Markierung des Leukoanthocyans mit Phenylalanin ¹⁴C in *Impatiens*keimlingen.

Anthocyane in allen Hypokotylen kam, woraus auf eine Störung des Flavonoidstoffwechsels geschlossen werden kann.

Im folgenden wurde darum die Versuchsanstellung in der verschiedensten Weise abgewandelt. Zunächst legten wir die Samen von Anfang an in die radioaktive Lösung ein. Da in diesem Falle auch die Keimwurzeln in der Lösung erst gebildet wurden, war es natürlich nicht möglich, mit unbewurzelten Pflanzen zu arbeiten (Versuch 2 und 3). Diese Methode hatte ebenfalls keine Markierung zur Folge. In weiteren Experimenten wurden deshalb bewurzelte Pflanzen längere Zeit (Versuch 4) und außerdem (Versuch 5) in einem Zeitraum, der zwischen dem frühen und dem späteren von Versuch 1 liegt, der radioaktiven Lösung ausgesetzt. In keinem Falle war eine Markierung des Leukoanthocyans zu erreichen. Jedesmal blieb aber auch (soweit vorhanden) die Markierung des Anthocyans aus! Das bedeutet, daß bei der Aufnahme der markierten Aminosäure (des Phenylalanins) durch die Wurzel diese Aminosäure offenbar nicht an den Ort der Biosynthese der Flavonoide, d. h. in die Zellen des Hypokotyls gelangt. Es ist nicht anzunehmen, daß das Phenylalanin überhaupt nicht aufgenommen wird, sondern wahrscheinlicher, daß es in den Zellen der Wurzeln bereits festgelegt wird. Man muß deshalb das Phenylalanin direkt den Leitungsbahnen der Keimlinge zuführen, also abgeschnittene Pflanzen verwenden.

Ein befriedigendes Ergebnis wurde schließlich in Versuch 6 erzielt, in dem alle bisher ermittelten negativen Faktoren ausgeschaltet waren.

In Versuch 6 erfolgte die Zugabe des Phenylalanins zu einem Zeitpunkt, in dem die Keimlinge noch kein Anthocyan synthetisieren. Den Pflanzen wurden bei Versuchsbeginn die Wurzeln entfernt, sie kamen dann in 3500 Lux und nach 2 Tagen in 10 000 Lux. Die Markierung von Anthocyan und Leukoanthocyan (die Anthocyan-Synthese begann nach dem 6. Tag) war eindeutig, sie lag bei beiden Substanzen in der gleichen Größenordnung der ipm, wobei allerdings keine Mengenbestimmung des Cyanidins erfolgte.

Es kann aber nach diesem Experiment gesagt werden, daß es möglich ist, die Leukoanthocyane in derselben Weise zu markieren wie alle übrigen Flavonoide. Demnach dürfte also auch der anfängliche Syntheseweg übereinstimmen, wobei das Phenylalanin als Phenylpropankörper Vorstufe des Ringes B des Flavonoidmoleküls ist. Wir haben zwar keine Bestimmung der markierten C-Atome im Flavonoidgerüst vorgenommen, es ist aber auf Grund des Molekülbaus desselben gar keine andere Einbauweise denkbar, als sie bisher z. B. bei Anthocyanen¹⁷ und Flavonolen^{19, 20} nachgewiesen ist. Für die weiteren Versuche ergibt sich nun aus diesen Experimenten, daß man zunächst im Dunkeln die radioaktiven Vorstufen geben muß, so daß die Leukoanthocyan-Synthese ohne Konkurrenz einer gleichzeitig verlaufenden Anthocyan-Synthese stattfinden kann, danach die Pflanzen ins Licht überführt, wo die Anthocyanbildung nun einsetzen kann. Auf dieser Basis führten die folgenden quantitativen Experimente zu einer weitgehenden Klärung der Verhältnisse.

Quantitative Versuche über die Beziehung der Leukoanthocyan- zur Anthocyan-Synthese

Die Pflanzen wurden zunächst für 6 Tage in Petrischalen angekeimt, dann das Wurzelsystem in schwachem Grünlicht abgeschnitten und anschließend, wie unter Methoden beschrieben, jeweils 3 Pflanzen in kleinen Gläsern im Dunkeln weitergezogen. Gleichzeitig wurde die radioaktive Lösung (0,00025 mC/Gläschen) zugegeben. Diese Lösung ist nach 12 Stdn. völlig aufgesogen, danach wird nur dest. Wasser nachgefüllt. 2 Tage nach Fütterungsbeginn erfolgte die erste Auswertung. Zur gleichen Zeit kamen alle übrigen Pflanzen zunächst für 10 Stdn. in 3500 Lux, dann bei 10 000 Lux in Dauerlicht. Die weiteren Auswertungen wurden alle 48 Stdn. vorgenommen, und zwar bis zum 10. Tage nach der radioaktiven Fütterung (= 5 Auswertungen). Der Versuch wurde dreimal mit jeweils 30 bzw. 60 Pflanzen pro Auswertungszeit wiederholt. Die Ergebnisse stimmen in allen 3 Versuchen nach Auswertung der eindimensionalen Papierchromatogramme mit Beckmann-Spektrophotometer und Endfensterzählrohr vollständig überein, wie ein Vergleich der Werte in der folgenden Tab. 5 für die ersten beiden Auswertungszeiten dartut.

Versuchs-Nr.	spez. Aktivität ipm/ γ Cyanidin					
	Leukoanthocyan			Anthocyan		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Extraktion ¹						
nach 2 Tagen	18	27	19	—	—	—
nach 4 Tagen	40	50	44.5	21	24	21.5

Tab. 5. Vergleich der spezifischen Aktivität in 3 unabhängigen Experimenten. ¹ 2 Tage nach Zugabe von Phenylalanin-¹⁴C, das ist bei Belichtungsbeginn.

Die Zahlenverhältnisse nach 4 Tagen decken sich auch sehr gut mit den Ergebnissen von Versuch 6, wo ebenfalls 4 Tage nach Fütterungsbeginn ausgewertet worden war. Das Verhältnis der Aktivität von Anthocyan zu Leukoanthocyan betrug dort 1 : 1,6, bei den in der Tabelle dargestellten 3 Versuchen 1 : 1,9; 1 : 2,0 und 1 : 2,0.

Der genaue Verlauf der Aktivität in Leukoanthocyan und Anthocyan ergibt sich aus den Kurven Abb. 3. Im einzelnen ist daraus zu ersehen, daß die spezifische Aktivität in Leukoanthocyan zunächst sehr stark zunimmt, nach 4 Tagen ein Maximum erreicht und danach wieder genau so rasch abnimmt. Verglichen mit der Menge des extrahierbaren Leukoanthocyans (Tab. 3) ist das Maximum der Aktivität weiter nach Versuchsbeginn hin verschoben. Es wird demnach 10 Tage nach Aussaat zwar noch Leukoanthocyan synthetisiert, dafür stehen aber keine radioaktiven Vorstufen mehr zur Verfügung, so daß die spezifische Aktivität wieder abnimmt.

Anders ist es beim Anthocyan, dessen Synthese unmittelbar mit der Überführung ins Licht beginnt, was während des überprüften Zeitraums zu einem etwa linearen Anstieg des Gesamtanthocyan gehaltes führt

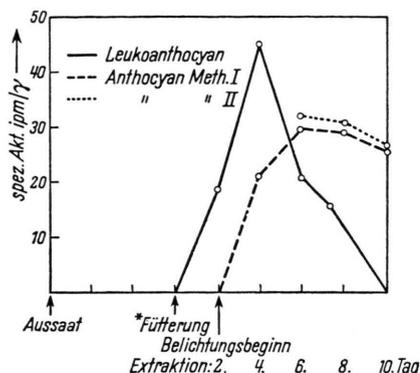


Abb. 3. Verteilung der spezifischen Aktivität im Leukoanthocyan und Anthocyan im Hypokotyl von *Impatiens balsamina* nach Fütterung mit Phenylalanin- ^{14}C , 6 Tage nach Aussaat und Belichtung vom 8. Tage an. Ordinate: spez. Aktivität pro γ . Abszisse: Tage nach Aussaat bzw. Fütterung. Beide Kurven sind als Cyanidin gemessen. Methode I = Auswertung auf dem Papierchromatogramm mit Beckmannspektrophotometer und Endfensterzählrohr. Methode II = Auswertung der Eluate des Papierchromatogramms mit Zeisspektrophotometer und Methandurchflußzählrohr.

(Tab. 3). Parallel zu diesem Anstieg steigt zunächst auch die spezifische Aktivität in den ersten 4 Tagen an. Da zu diesem Zeitpunkt keine radioaktiven Vorstufen mehr gefüttert werden, muß die Anthocyan synthese auf bereits im Stoffwechsel einbezogene markierte Vorstufen zurückgreifen. 4 Tage nach Belichtungsbeginn hat die spezifische Aktivität ein Maximum erreicht. In der Folgezeit sinkt sie wenigstens während des übersehbaren Zeitintervalls von weiteren 4 Tagen nur unwesentlich ab. Es stehen also trotz starker Synthese immer noch genügend markierte Vorstufen zur Verfügung, was beim Leukoanthocyan nicht mehr der Fall war. Das heißt, daß diese Vorstufen nicht in der Form von Phenylpropan-Molekülen vorliegen, sondern unmittelbare Vorgänger des fertigen Anthocyan-Moleküls sind.

Der zweite Abschnitt des Kurvenverlaufs wurde durch die 2. Auswertungsmethode gesichert, da zu diesem Zeitpunkt genügend Anthocyane dafür zur Verfügung standen. Die Bestimmung der Anthocyanmenge erfolgte in diesem Falle in Lösung im Zeiss-Spektrophotometer, die der Aktivität nach Eindampfen der Lösung mit dem Methandurchflußzählrohr. Die erhaltenen Werte sind in der Abb. 3 ebenfalls eingetragen. Da es sich bei den ipm nicht um Absolutwerte handelt, sondern deren Zahl von der jeweiligen Meßmethode der Aktivität abhängt (innerhalb dieser aber vergleichbar ist), brauchen die beiden Kurvenabschnitte natürlich nur im Verlauf übereinzustimmen. Dieses ist hier sehr exakt der Fall.

Diskussion

Unsere Untersuchungen sind in der Lage, auf die Beziehung zwischen der Biosynthese der Anthocyane und Leukoanthocyane ein entscheidendes Licht zu

werfen. Die wichtigsten Gesichtspunkte sind in diesem Zusammenhang folgende:

Ein wesentlicher Faktor als Voraussetzung für die Markierung von Leukoanthocyan ist, daß die Zugabe der markierten Vorstufe erfolgen muß, ehe in den Zellen des Hypokotyls Anthocyan synthetisiert wird. Dieses Resultat unterscheidet sich grundsätzlich von den Versuchen über den Zusammenhang zwischen Flavonolen und Anthocyan^{22, 23}, wo bei Zugabe zu jedem beliebigen Zeitpunkt beide Substanzen stets gleich stark markiert waren. Nun kann unsere Versuchsauswertung zwar nicht mit Sicherheit ausschließen, daß bei später Zugabe des Phenylalanins nicht wenigstens vorübergehend markiertes Leukoanthocyan auftritt, dies geschieht aber dann in solchen geringen Mengen, daß es sich dem Nachweis entzieht. Leukoanthocyan findet sich also nur dann markiert vor, wenn diesem Gelegenheit gegeben wird, einen „Pool“ zu bilden. Ein solcher entsteht nicht, wenn gleichzeitig Anthocyan synthetisiert wird. Damit haben wir ein wichtiges Glied in unserer Beweiskette gewonnen, daß Leukoanthocyan in den Hypokotylen von *Impatiens* als Zwischenstufe bei der Anthocyan synthese fungiert. Der vollständige Beweis wird durch den Langzeit-Versuch mit mehreren Auswertungen erbracht. Dieser ergab, daß die spezifische Aktivität im Laufe des Versuchs stark schwankt. Und zwar ist der Kurvenverlauf in den beiden Versuchen so, daß der absteigende Ast der Aktivitätskurve des Leukoanthocyan ungefähr das Maximum der Aktivitätskurve des Anthocyan trifft. Nach ZILVERSMIT und Mitarbb.³⁷ (vgl. dazu auch GRISEBACH und BOPP²²) ist ein solcher Kurvenverlauf zu erwarten, wenn eine Substanz A in eine Substanz B unmittelbar umgewandelt wird. Diese theoretische Forderung ist in unserem Falle sehr gut erfüllt, und zwar ist das Resultat deshalb besonders stichhaltig, weil die spezifische Aktivität der beiden Substanzen in genau der gleichen Größenordnung liegt (da es sich in beiden Fällen um Cyanidin handelt, sind keine Meßfehler möglich), obwohl die Anthocyanmenge in den Hypokotylen den vielfachen Wert der höchsten Leukoanthocyanmenge erreicht. Nach dem vorher Gesagten, nämlich, daß Leukoanthocyan markiert wird, wenn ein „Pool“ auftritt, ist der daraus resultierende rasche Anthocyanumsatz auch zu erwarten.

³⁷ D. B. ZILVERSMIT, C. ENTENMANN u. M. C. FISHLER, J. gen. Physiol. **26**, 325 [1943]; H. NETTER, Theoretische Biochemie, Heidelberg 1959.

Weiterhin können wir den Kurven direkt entnehmen, daß Anthocyan nicht auf frühere Vorstufen der Biosynthese der Flavonoide zurückgreift, von denen aus auch noch die Bildung von Leukoanthocyan möglich wäre, sonst dürfte nicht am 6. Tage nach der Markierung die spezifische Aktivität des Leukoanthocyan so stark absinken, zu einem Zeitpunkt, zu dem noch neues Leukoanthocyan synthetisiert wird und gleichzeitig auch die Aktivität des Anthocyan noch ansteigt.

Eine notwendige Konsequenz aller dieser Beobachtungen ist, daß Leukoanthocyan in den Hypokotylen von Impatiens unmittelbare Vorstufe des Anthocyan ist.

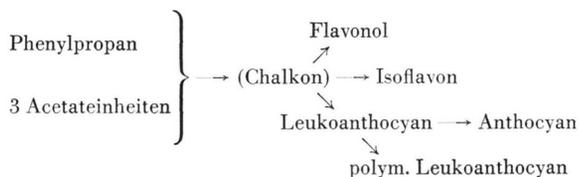
Damit werden frühere Versuche von ALSTON^{25, 34} verständlich, nach denen im Dunkeln der Leukoanthocyan Gehalt kontinuierlich zunimmt, während bei Belichtung in unseren Experimenten am 12. Tage ein Maximum erreicht wird, und der Gehalt danach sehr rasch abnimmt. Diese Beobachtung ist auch für die Interpretation der lichtabhängigen^{32, 38} Schritte der Anthocyan- und sonstigen Flavonoidsynthese von größter Bedeutung.

Da wir in älteren belichteten Keimlingen kein lösliches Leukoanthocyan mehr gefunden haben, wird im Licht entweder *alles* in Anthocyan umgewandelt oder aber ein Teil zu Polymeren vereinigt und übernimmt dann Gerbstofffunktion. Dadurch würde es der Anthocyan synthese entzogen, denn vermutlich liegen die als Vorstufe dienenden Leukoanthocyan in der Form von Monomeren vor.

Es ist nämlich höchstwahrscheinlich, daß zwei Wege für das Leukoanthocyan existieren, da es an

vielen Stellen auch in ausdifferenzierten Organen auftritt, in denen der Flavonoidstoffwechsel ein steady-state erreicht hat. Und zwar kommt es dort sowohl allein als auch mit Anthocyan zusammen vor. In solchen Fällen verschwindet es z. B. nicht bei der Neusynthese von Wundanthocyan, vielmehr kann es unabhängig von der Anthocyan synthese, selbständig an Wundrändern gebildet werden⁷. Auf der anderen Seite wird im steady-state-Zustand und nicht nur in diesem sehr häufig kein Leukoanthocyan neben dem Anthocyan gefunden. Dies alles spricht dafür, daß Leukoanthocyan in 2 verschiedenen Funktionen in der Pflanze vorkommt, einmal als Intermediärprodukt des Anthocyanstoffwechsels und zum anderen als selbständige Endstufe der Flavonoidsynthese (wahrscheinlich in Form von Polymeren; z. B. l. c.²⁸) auch in solchen Zellen, die Anthocyan synthetisieren können!

In neueren Untersuchungen haben GRISEBACH und Mitarb.^{21, 23} gezeigt, daß Chalkon entweder eine biogenetische Zwischenstufe auf dem Wege der Flavonoide ist oder zumindest leicht in diese umgewandelt werden kann. Wir kommen damit, wenn wir die Ergebnisse durch unsere Beobachtungen über den biogenetischen Zusammenhang zwischen Leukoanthocyan und Anthocyan ergänzen, zu folgendem Schema:



Ein ähnliches Schema haben wir früher auf Grund rein beschreibender Untersuchungen schon einmal entwickelt²⁷, es wird durch die neuen den Stoffwechsel berücksichtigenden Experimente gesichert.

³⁸ Zum Beispiel M. FURUYA u. R. G. THOMAS, Plant Physiol. 37, (Supplement) XXVIII [1962].