

ÜBER DEN EINFLUSS VON LICHT AUF DEN UMSATZ VON FLAVONOLEN UND ISOFLAVONEN IN *CICER ARIETINUM**

W. BARZ, W. HÖSEL und CH. ADAMEK

Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Universität Freiburg/Br.,
Germany

(Received 1 April 1970)

Abstract—Continuous far-red irradiation of garbanzo seedlings (*Cicer arietinum* L.) leads to repression of the synthesis of the isoflavones formononetin and biochanin A. The inhibition of isoflavone formation has been shown to occur both in the roots and the aerial parts. In contrast to the two isoflavons, the flavonols kaempferol, quercetin, and isorhamnetin do not significantly accumulate in dark grown seedlings. Tracer experiments, however, have shown that the very small yields of flavonols in etiolated plants are partly due to accelerated turnover. The differences between isoflavones and flavonols regarding their formation and turnover are discussed.

EINLEITUNG

DIE ABHÄNGIGKEIT der Flavonoidbildung vom Licht ist eine wohlbekannte Erscheinung,^{1,2} wobei die Pigmentsynthese zumindest teilweise unter der Kontrolle des Phytochromsystems steht, das wahrscheinlich über eine Induktion von Enzymsynthese,³⁻⁶ beispielsweise der Phenylalanin-Ammoniumlyase, wirkt. Der Einfluß des Phytochromsystems auf die Bildung wie auch auf deutliche Konzentrationsänderungen der Flavonole Quercetin und Kämpferol, bzw. ihre Glykoside, ist bei *Pisum sativum* mehrfach untersucht worden.^{7,8} Nach Bestrahlung der Pflanzen mit Rotlicht wurden für Phenylalanin wesentlich höhere Einbauraten in Flavonole gemessen als in den Dunkelkontrollen,⁸ so daß die Auffassung unterstützt wurde, daß die Synthese in Rot- oder Weißlicht gezogener Pflanzen durch das aktive Phytochrom 730 (P_{fr}) gesteigert wird.

Wir haben bei unseren Untersuchungen über den Einfluß von Licht als Regulationsfaktor auf das Wechselspiel von Biosynthese und Abbau—aus dem sich die stationären Konzentrationen der Phenole im lebenden Gewebe ergeben—festgestellt,^{9,10} daß die Synthese der Isoflavone Formononetin und Biochanin A in *Cicer arietinum* L. vom Phytochromsystem nicht positiv beeinflusst wird. Die höchsten Isoflavonspiegel—bedingt durch

* Part VI in the series "Stoffwechsel aromatischer Pflanzeninhaltsstoffe".

¹ H. W. SIEGELMANN, in *Biochemistry of Phenolic Compounds* (edited by J. B. HARBORNE), S. 437, Academic Press, London (1964).

² H. MOHR, in *The Physiology of Plant Growth and Development* (edited by M. B. WILKINS), S. 509 ff, McGraw-Hill, London (1969).

³ T. A. ATTRIDGE and H. SMITH, *Biochem. Biophys. Acta* **148**, 805 (1967).

⁴ G. ENGELSMA, *Planta* **75**, 207 (1967).

⁵ J. RISSLAND und H. MOHR, *Planta* **77**, 239 (1967).

⁶ H. SCHERF und M. H. ZENK, *Z. Pflanzenphysiol.* **57**, 401 (1967).

⁷ A. W. GALSTON, in *Perspectives in Phytochemistry* (edited by J. B. HARBORNE), S. 193, Academic Press, London und New York (1969).

⁸ D. B. HARPER, H. SMITH, *Biochem. Biophys. Acta* **184**, 230 (1969).

⁹ W. BARZ und CH. ADAMEK, *Planta* **90**, 191 (1970).

¹⁰ W. BARZ, CH. ADAMEK und J. BERLIN, *Phytochem.* **9**, 1735 (1970).

starke Synthese und langsamen Abbau finden sich in Dunkelkeimlingen, während niedrige aber praktisch konstante Konzentrationen an P_{fr} ¹¹ zu einer Hemmung sowohl der Bildung wie auch des Abbaus führen. Unter Weißlicht gezogene Pflanzen führen dagegen beide Reaktionswege mit vergleichbarer Geschwindigkeit aus.¹² Dabei scheint uns die Beobachtung wichtig, daß der Umsatz der Isoflavone—besonders von Formononetin—in den oberirdischen Teilen¹³ ebenso beobachtet werden konnte wie im Bereich der Wurzeln und des Hypokotyls.^{14,15} Ueber das Ausmaß der Repression der Isoflavonbildung bei Dauer-Dunkelrotbestrahlung sowie über die Akkumulation und die Lichtabhängigkeit des Umsatzes der in der Kichererbse vorhandenen Flavonole Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin¹⁶ berichten wir in dieser Arbeit. In Weißlicht gezogenen Kichererbsenpflanzen unterliegen diese drei Flavonole einem Umsatz,¹³ der jedoch langsamer verläuft als die Biosynthese, so daß es über längere Zeiträume noch zu einer Steigerung der isolierbaren Flavonolmengen kommt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei unseren früheren Untersuchungen⁹ über den Einfluß von Licht verschiedener Wellenlängen bzw. von Dauerdunkel auf den Isoflavonstoffwechsel waren stets junge Pflanzen von *Cicer arietinum* aufgearbeitet worden. Wir konnten demnach nicht zwischen den einzelnen Organen der Pflanzen unterscheiden, obwohl Formononetin und Biochanin in allen untersuchten Organen angetroffen und umgesetzt werden.^{9,13} Da die bisherigen Untersuchungen¹⁷ über P_{fr} vorwiegend mit Blättern, Stengeln und Hypokotylen ausgeführt worden sind, war ein Vergleich von Wurzeln und oberirdischen Teilen in Bezug auf die Auswirkung von Dauerdunkelrotbestrahlung bzw. Dunkelheit auf die Isoflavonakkumulation von Interesse. In diese Untersuchungen wurden auch die nur in den oberirdischen Teilen vorkommenden Flavonole Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin sowie das von uns ebenfalls in größeren Mengen gefundene Pratensein (3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavon)^{16,18} einbezogen. Jeweils gleiche Anzahl von Kichererbsenpflanzen, die im Dunkeln bzw. unter Dauerdunkelrotbestrahlung ab der 40. Stunde nach Aussaat gewachsen waren, wurden nach 90, 140, 190 und 230 Stunden getrennt nach Wurzeln, Hypokotyl und Kotedonen bzw. Stengeln und Blättern aufgearbeitet. In Abb. 1 sind die Ausbeuten für Formononetin und Biochanin A dargestellt. Aus den Dunkelpflanzen wurden in allen Fällen wesentlich größere Mengen—Abb. 1—isoliert, wobei auch die Dunkelkurven über einen längeren Zeitraum linear ansteigen. Der in der zweiten Hälfte des Versuchs horizontale Verlauf der Dauerdunkelrotkurven bestätigt die früher gemachte Beobachtung, daß bei Dauerdunkelrotbestrahlung die Synthese von Formononetin und Biochanin A reprimiert wird. Diese Hemmung scheint demnach nicht auf ein bestimmtes Organ beschränkt zu sein, sondern findet in allen Geweben statt.

Die Flavonole verhalten sich dagegen völlig anders. In Dunkelpflanzen wurde Isorhamnetin in keinem Fall auch nur in Spuren entdeckt, während von Kämpferol und

¹¹ K. M. HARTMANN, *Naturwiss.* **54**, 544 (1967).

¹² H. GRISEBACH und W. BARZ, *Naturwiss.* **56**, 538 (1969).

¹³ W. BARZ und W. HÖSEL, *Phytochem.* **10**, 335 (1971).

¹⁴ W. BARZ und B. ROTH-LAUTERBACH, *Z. Naturforsch.* **24**, 638 (1969).

¹⁵ W. BARZ, *Naturforsch.* **24b**, 234 (1969).

¹⁶ W. HÖSEL und W. BARZ, *Phytochem.* **9**, 2053 (1970).

¹⁷ H. MOHR, *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*, S. 143 ff, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg und New York (1969).

¹⁸ E. WONG, P. J. MORTIMER und T. A. GEISSMAN, *Phytochem.* **4**, 89 (1965).

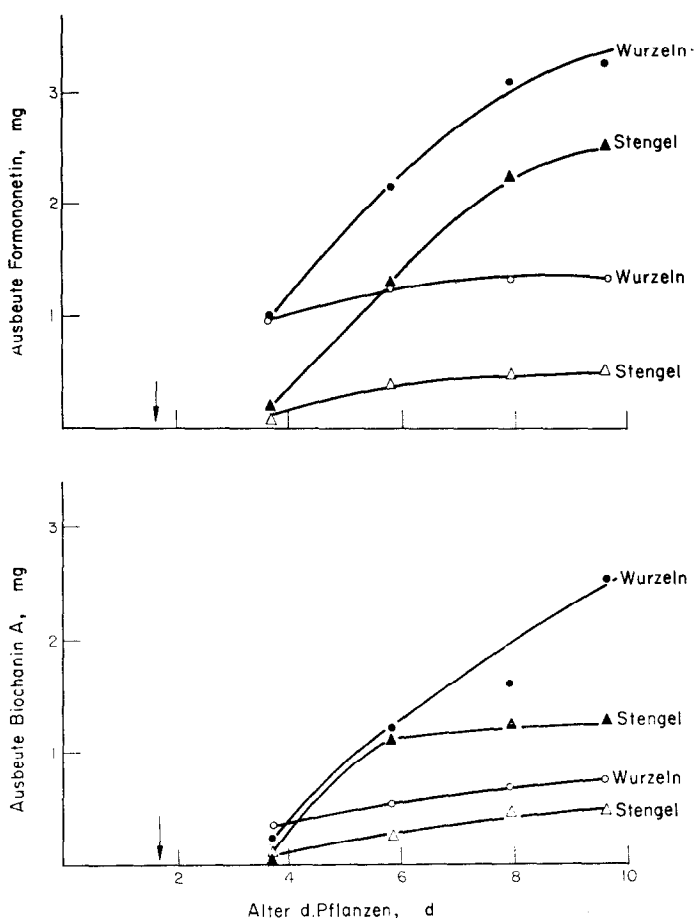


ABB. 1. VERGLEICH DER AUSBEUTEN AN FORMONONETIN UND BIOCHANIN A AUS DUNKELKEIMLINGEN (●, ▲) UND DAUERDUNKELROT (○, △)-BESTRAHLTEN PFLANZEN. DIE BESTRAHLUNG (↓) BEGANN NACH 40-STÜNDIGER KEIMUNG IM DUNKELN.

Quercetin nur unbedeutende Mengen isoliert werden konnten. Im Vergleich zu Weißlicht-gezogenen Pflanzen¹³ enthalten die Dunkelpflanzen *ca.* 30- bis 200-mal weniger von beiden Flavonolen. In den unter Dunkelrotlicht gewachsenen Kichererbsenpflanzen waren die isolierbaren Mengen ebenfalls so gering, daß auf eine Angabe der Werte verzichtet wurde; Isorhamnetin wurde jedoch, wenn auch nur in Spuren, gebildet.

Ähnliche Verhältnisse wie für Isorhamnetin wurden für Pratensein gefunden, das weder aus Dunkel-, noch aus Dunkelrotpflanzen isoliert werden konnte. Anstelle von Pratensein wurde die Akkumulation eines chromatographisch und spektrometrisch sehr ähnlichen Produktes beobachtet, mit dessen Strukturaufklärung wir beschäftigt sind.

In Abb. 2 sind die Ausbeuten von Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin aus jeweils 15 Cicerpflanzen angegeben, die nach 48-stündiger Keimung im Dunkeln bis zur 20. Stunde unter Weißlicht, Dauerhellrot, Dauerdunkelrot bzw. im Dunkeln gewachsen sind. Das Haupt-Flavonol der Kichererbse ist Kämpferol, und die Ergebnisse zeigen, daß

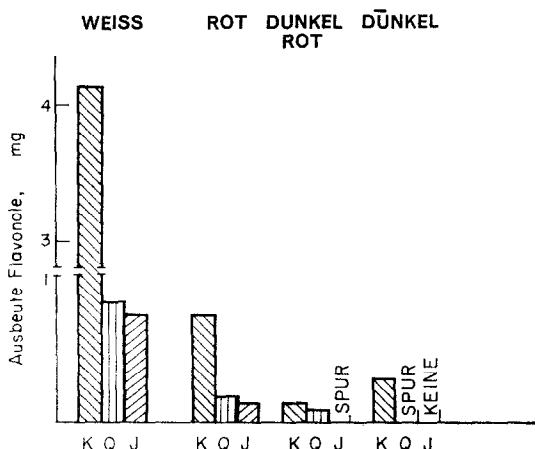


ABB. 2. VERGLEICH DER AUSBEUTEN VON KÄMPFEROL (K), QUERCETIN (Q) UND ISORHAMNETIN (I) IN ABHÄNGIGKEIT VON LICHT BZW. DUNKELHEIT.

Quercetin und Isorhamnetin nur in Weißlicht- und mit Einschränkungen auch in Rotlicht-gezogenen Pflanzen in solchen Mengen gebildet werden, die eine exakte quantitative Bearbeitung erlauben.

Die in Abb. 1 dargestellten Versuche sowie unsere früheren Ergebnisse⁹ über die Hemmung der Isoflavonsynthese führten zu der Vermutung, daß die Höhe des Isoflavonspiegels in Dauerdunkelrot-gezogenen Pflanzen im Vergleich zu Dunkelkeimlingen stark vom Zeitpunkt des Bestrahlungsbeginns abhängt. Eine Bestätigung hierfür zeigt das Ergebnis eines Versuches, der in Abb. 3 dargestellt ist. Dunkelkeimlinge wurden 15, 30, 45 bzw. 60 Stunden nach Beginn der Aussaat—Abb. 3—in ein Dunkelrotlichtfeld überführt und nach insgesamt 120, 180 bzw. 240 Stunden auf ihren Gehalt an Formononetin und Biochanin A analysiert.

Die Kurven A bis D in den Darstellungen B und C zeigen deutlich das Ausmaß der Repression der Isoflavonbildung. Je früher die Dauerdunkelrotbestrahlung einsetzt, umso geringer ist die Isoflavonbildung. In der Darstellung A von Abb. 3 sind die jeweiligen Frischgewichte der Dunkelrotpflanzen im Vergleich zu den Dunkelkontrollen dargestellt. Der Verlauf der Kurven läßt die bekannte Hemmung des Streckungswachstums unter dem Einfluß von Pfr sowie die damit verbundene starke Abnahme des relativen Wassergehaltes der Keimlinge im Vergleich zu den Dunkelpflanzen erkennen.¹⁹ Der Unterschied der jeweiligen Frischgewichte der Pflanzen ist wesentlich weniger ausgeprägt als der der Isoflavonkurven. Diese Tatsache und unsere früheren Ergebnisse mit radioaktiver Markierung⁹ beweisen, daß es sich hier um eine selektive Hemmung der Isoflavonbiosynthese handelt. Wir können über die reprimierten Enzyme keine Aussage machen; möglicherweise ist die von Engelsma²⁰ in Gurkenkeimlingen beobachtete Inaktivierung der Phenylalanin-ammonium-Lyase bei langzeitiger Dunkelrotbestrahlung eine Erklärung für unsere Befunde.

Die in Abb. 2 gezeigten geringen Ausbeuten an Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin in Kichererbsenpflanzen, die im Dunkeln bzw. unter Dunkelrotlicht gewachsen waren, verhinderten sinnvolle Experimente mit radioaktiven Vorstufen. Um jedoch eine

¹⁹ B. HOCK und H. MOHR, *Planta* **65**, 1 (1965).

²⁰ G. ENGELSMA, *Planta* **77**, 49 (1967).

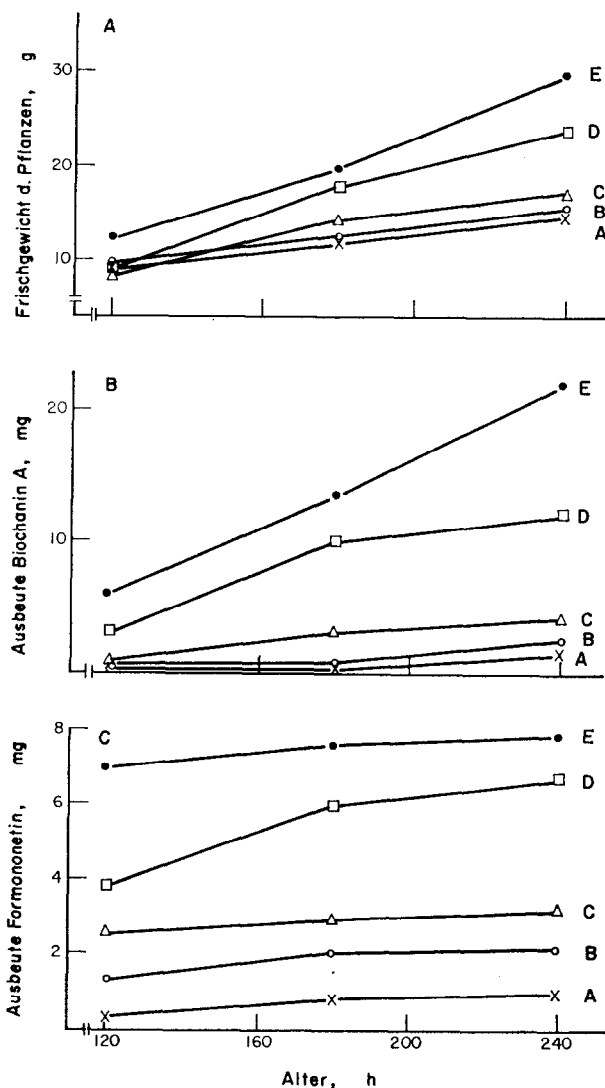


ABB. 3. VERGLEICH DER AUSBEUTEN AN FORMONONETIN UND BIOCHANIN A SOWIE PFLANZENFRISCHGEWICHTE.

Dunkelkeimlinge wurden 15 Stunden (Kurve A), 30 Stunden (B), 45 Stunden (C) und 60 Stunden (D) nach Aussaat in Dauerdunkelrot überführt. Kurve E: Dunkelkontrolle.

Aussage über das Verhältnis von Synthese und Umsatz auch in Dunkelpflanzen zu erhalten, haben wir eine andere Art von Experiment durchgeführt, das in Abb. 4 dargestellt ist.

Weißlicht-gezogene Kichererbsenpflanzen, in denen noch ein linearer Anstieg der Flavonolmengen, verbunden mit deutlichem, jedoch vergleichsweise langsamerem Umsatz, zu beobachten ist, zeigen bei Ueberführung in Dunkel einen sofortigen starken Abfall der Flavonolmengen. Durch Injektion von DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C) ließ sich zeigen, daß die Weißlicht- und die Dunkelpflanzen, gemessen an der spezifischen Radioaktivität, die

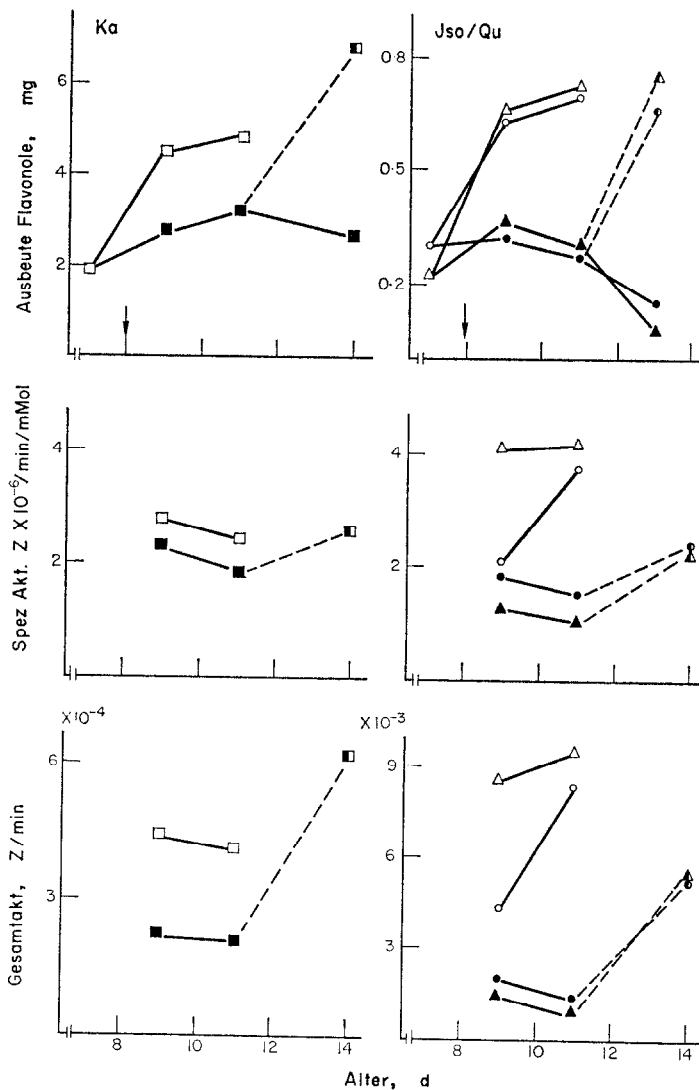


ABB. 4. ISOLIERTE MENGEN AN KÄMPFEROL (Ka), QUERCETIN (Qu, o) UND ISORHAMNETIN (Iso, Δ) SOWIE SPEZIFISCHE UND GESAMTRADIOAKTIVITÄT NACH INJEKTION (\downarrow) VON DL-PHENYLALANIN-(1-¹⁴C) BEI WEISSLICHT- UND DUNKELPFLANZEN (\blacksquare , \bullet , \blacktriangle).

Flavonole, besonders Kämpferol, noch mit vergleichbarer Geschwindigkeit synthetisieren. Die in Dunkel überführten Cicerpflanzen führen jedoch den Umsatz der Flavonole mit wesentlich größerer Geschwindigkeit aus als die Weißlichtpflanzen; dadurch ergibt sich der große Abfall der Ausbeuten. Wir können demnach folgern, daß in den Weißlichtpflanzen die Synthese den Umsatz überwiegt, während bei den in Dunkel überführten Pflanzen zunächst ein umgekehrtes Verhältnis vorliegt.

Werden die Dunkelpflanzen nach insgesamt viertägiger Dunkelheit wieder in Weißlicht überführt, wird ein sofortiger neuer Anstieg der Flavonolmengen beobachtet, bei dem auf Grund der ansteigenden Radioaktivitätswerte wieder radioaktive Vorstufen in die Flavonole

eintreten. Da wir ähnliche Beobachtungen schon früher bei den Isoflavonen gemacht haben,⁹ müssen wir für die Flavonole schließen, daß im Dunkeln die Flavonolsynthese langsam gehemmt wird, zumindest im Vergleich zur Umsatzgeschwindigkeit erniedrigt wird. Der von Harper und Smith⁸ in Dunkelpflanzen beobachtete wesentlich niedrigere Einbau von Phenylalanin in die Flavonole der Erbse könnte teilweise auf einen gesteigerten Umsatz der Flavonole zurückgeführt werden. Da die Autoren keine Ausbeuten an Flavonolen angegeben haben, kann nicht entschieden werden, inwieweit der im Dunkeln gesteigerte Umsatz hieran beteiligt ist.

Insgesamt zeigen diese und unsere früheren Versuche^{9, 13} einen ausgeprägten Unterschied zwischen Isoflavonen und Flavonolen. Das wird besonders durch die nicht in Abb. 4 gehaltenen Ergebnisse mit Formononetin und Biochanin A aus dem Weißlicht-Dunkelent-Versuch deutlich. Während die Flavonole auf Grund eines gesteigerten Umsatzes mengenmäßig abnehmen, wird der Isoflavonspiegel in den Dunkelpflanzen (nach den Ergebnissen der Abb. 1 und 3) erwartungsgemäß wegen Steigerung der Synthese erhöht. Beide Substanz-Klassen unterliegen demnach in der Kichererbse, wenn auch in gegenläufiger Richtung, bei einem normalen Hell-Dunkel-Wechsel beachtlichen rhythmischen Schwankungen,²¹ die durch wechselseitige Stimulierung von Aufbau und Abbau erklärt werden können.

Innerhalb der Klassen der Isoflavone und Flavonole scheint es jedoch ebenfalls Unterschiede zu geben. So wird das Isoflavon Pratensein im Gegensatz zu Formononetin und Biochanin in Dunkelpflanzen gar nicht gebildet, und auch Isorhamnetin scheint nur unter dem Einfluß von Licht gebildet werden zu können. Wir möchten vermuten, daß in beiden Fällen eine lichtabhängige Enzymsynthese beteiligt ist. Bemerkenswerterweise handelt es sich bei Pratensein und Isorhamnetin um Verbindungen mit einer—wenn auch nicht identischen—Hydroxy-methoxy-Gruppierung im Ring B.

EXPERIMENTELLER TEIL

Chemikalien. D,L-Phenylalanin-(1-¹⁴C) (spez. Akt. 25 mc/mmole) stammte vom Radiochemical Center Amersham.

Anzucht der Pflanzen. Die Anzucht der Kichererbsenpflanzen erfolgte in einer Phytokammer des Instituts wie beschrieben.^{9,14} Das Weißlichtfeld¹³ sowie die Standard-Dunkelrot- und Standard-Hellrotfelder⁹ sind bereits beschrieben worden.

Isolierung der Flavonole und Isoflavone. Die Aufarbeitung der Isoflavone^{9,15} und der Flavonole¹³ wurde nach Standardmethoden ausgeführt. Bei alleiniger Aufarbeitung von Isoflavonen wurde eine enzymatische Hydrolyse mit endogenen Glykosidasen durchgeführt,⁹ während bei gleichzeitiger Isolierung von Flavonolen mit Schwefelsäure hydrolysiert wurde.¹³

Die Applikation der radioaktiven Vorstufe erfolgte durch Injektion mit Mikroinjektionsspritzen in das Hypokotyl.¹³ Die Messung der Radioaktivität erfolgte wie früher beschrieben.¹⁵

Anerkennung—Wir danken Herrn Dr. P. Schopfer für anregende Diskussionen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen.

²¹ B. G. CUMMING und E. WAGNER, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **19**, 381 (1968).