

## DER EINFLUSS EINES CHALKONS AUF ENZYMAKTIVITÄTEN IM BIOSYNTHESEWEG DER ANTHOCYANE VON *PETUNIA HYBRIDA*

R. ENDRESS

Lehrstuhl für botanische Entwicklungsphysiologie der Universität Hohenheim,  
B.R.D. 7-Stuttgart-Hohenheim, Emil Wolfstraße 25

(Eingegangen 2 August 1973. Angenommen 10 September 1973)

**Key Word Index**—*Petunia hybrida*; Solanaceae; flavonoid biosynthesis; 3,4,2',4',6'-pentahydroxychalcone; enzyme activity.

**Abstract**—3,4,2',4',6'-Pentahydroxychalcone 4'-glucoside, which is specific for B-ring substitution, triggers an incorporation of [ $1-^{14}\text{C}$ ]acetate into cyanidin 3-monoglucoside in *Petunia hybrida*, at a stage when anthocyanin accumulation is linear and intensive. This incorporation could not be specifically prevented by adding either transcriptive or translational antimetabolites. Sodium diethyldithiocarbamate, which specifically complexes with  $\text{Cu}^{2+}$  ions, produces the same effect. This similarity in action suggests that both reagents affect those enzymes of the anthocyanin pathway which require bivalent metal ions as co-factors.

**Zusammenfassung**—Das 3,4,2',4',6'-Pentahydroxychalkon-4'-glukosid löst in *Petunia hybrida* im Stadium intensiver und linearer Anthocyanakkumulation einen substitutionsspezifischen Einbau des Acetat-[ $1-^{14}\text{C}$ ] in das Cyanidin-3-monoglukosid aus. Dieser Einbau konnte weder durch Antimetaboliten der Transkription noch durch solche der Translation spezifisch unterbunden werden. Die gleiche Wirkung wie das Chalkon löst auch der für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen spezifische Komplexbildner, das Natriumdiäthylthiocarbaminat (SDDC), aus. Es erscheint als wahrscheinlich, daß dieser übereinstimmende Wirkungsmechanismus auf einer Beeinflussung der Aktivitäten von Enzymen beruht, die im Biosyntheseweg der Anthocyane tätig sind und 2-wertige Ionen als Co-Faktoren besitzen.

### EINLEITUNG

WIE EINE Reihe von Befunden zeigt konnte bei *Petunia*,<sup>1-3</sup> aber auch bei anderen Pflanzen,<sup>4</sup> Zimtsäuren substitutionsspezifisch in den B-Ring der Anthocyane eingebaut werden, die ihr Substitutionsmuster tragen.<sup>5</sup> Dieser Eibau ließ sich durch Antimetaboliten der Transcription und Translation unterbinden.<sup>5</sup> Bei der Fütterung von 3,4,2',4',6'-Pentahydroxy- und 4,2',4',6'-Tetrahydroxy-3-methoxychalkon-4'-glukosid zusammen mit D-Glukose-[ $1-^{14}\text{C}$ ] an Petalen von *Petunia hybrida* im Stadium intensiver und linearer Anthocyanakkumulation wurden die Chalkone ebenfalls substitutionsspezifisch eingebaut.<sup>6</sup>

Bei der gleichzeitigen Fütterung dieser Chalkone und Acetat-[ $1-^{14}\text{C}$ ] bewirkt das 3,4,2',4',6'-Pentahydroxychalkon-4'-glukosid dagegen einen spezifischen Einbau des Acetats-[ $1-^{14}\text{C}$ ] in das Cyanidin-3-monoglukosid.<sup>6</sup> Dieser spezifische Einbau des Acetats in

<sup>1</sup> HESS, D. (1964) *Planta* **60**, 568.

<sup>2</sup> HESS, D. (1966) *Z. Pflanzenphysiol.* **55**, 374.

<sup>3</sup> HESS, D. (1967) *Z. Pflanzenphysiol.* **56**, 12.

<sup>4</sup> MEIER, H. und ZENK, M. H. (1965) *Z. Pflanzenphysiol.* **53**, 415.

<sup>5</sup> HESS, D. (1967) *Naturwissenschaften* **11**, 289.

<sup>6</sup> ENDRESS, R. (1974) *Phytochemistry* im Druck.

TABELLE 1. DIE BEEINFLUSSUNG DER CHALKONWIRKUNG (1) MIT CHLORAMPHENICOL (2), ACTINOMYCIN C<sub>1</sub> (3) UND ACTIDION (4) UNTERSCHIEDLICHER KONZENTRATION (10, 25, 50, 100  $\gamma$ /ml)

Antho- cyane	Konzen- tration	Einbaurate (%) <sup>*</sup>		Änderung der Einbaurate (%)	Einbaurate (%)		Änderung der Einbaurate (%)
		ohne	mit		ohne	mit	
(1) Chalkon							
Päo-3-G	10 <sup>-3</sup> Mol	0,01497	0,00535	— 64			
Cya-3-G		0,0545	0,1472	+ 170			
Pet-3-G		0,04572	0,02092	— 54			
(2) Chloramphenicol							
Päo-3-G	10 γ/ml	0,0269	0,0114	— 58	0,02297	0,00255	— 89
Cya-3-G		0,299	0,109	— 64	0,15520	0,05812	— 63
Pet-3-G		0,033	0,0069	— 79	0,02074	0,02252	+ 9
Päo-3-G	25 γ/ml	0,139	0,073	— 47	0,02304	0,01018	— 56
Cya-3-G		0,174	0,175	± 0	0,17286	0,0937	— 46
Pet-3-G		0,038	0,029	— 24	0,08478	0,027	— 68
Päo-3-G	50 γ/ml	0,051	0,063	+ 24	0,02155	0,02109	± 0
Cya-3-G		0,259	0,058	— 78	0,0833	0,11887	+ 43
Pet-3-G		0,137	0,0045	— 97	0,01561	0,01849	+ 18
Päo-3-G	100 γ/ml	0,016	0,0054	— 66	0,0123	0,02928	+ 138
Cya-3-G		0,094	0,14	+ 49	0,05248	0,08895	+ 69
Pet-3-G		0,0124	0,0159	+ 28	0,02497	0,01486	— 40
(3) Actinomycin C <sub>1</sub>							
Päo-3-G	10 γ/ml	0,0143	0,00535	— 63	0,0062	0,0093	+ 50
Cya-3-G		0,095	0,0523	— 45	0,035	0,0769	+ 119
Pet-3-G		0,15	0,012	— 92	0,0099	0,0128	+ 29
Päo-3-G	25 γ/ml	0,0246	0,01186	— 52	0,0485	0,0066	— 86
Cya-3-G		0,081	0,071	— 13	0,1487	0,0465	— 69
Pet-3-G		0,068	0,00327	— 95	0,025	0,00365	— 85
Päo-3-G	50 γ/ml	0,00798	0,1255	+ 1472	0,0084	0,02	+ 138
Cya-3-G		0,071	0,074	+ 4	0,0568	0,00038	— 99
Pet-3-G		0,022	0,23	+ 945	0,0074	0,0129	+ 74
Päo-3-G	100 γ/ml	0,0093	0,032	+ 242	0,0076	0,017	+ 123
Cya-3-G		0,058	0,066	+ 14	0,0455	0,033	— 28
Pet-3-G		0,0132	0,0237	+ 79	0,014	0,012	— 14
(4) Actidion							
Päo-3-G	10 γ/ml	0,013	0,00517	— 60			
Cya-3-G		0,049	0,01873	— 62			
Pet-3-G		0,0193	0,00075	— 96			
Päo-3-G	25 γ/ml	0,0121	0,00277	— 77	0,0247	0,00512	— 79
Cya-3-G		0,0735	0,0309	— 58	0,0844	0,09457	+ 12
Pet-3-G		0,02234	0,0096	— 57	0,0153	0,0077	— 49
Päo-3-G	50 γ/ml	0,01038	0,00183	— 91	0,0129	0,0242	— 47
Cya-3-G		0,0314	0,02609	— 17	0,0535	0,12176	— 56
Pet-3-G		0,0418	0,00526	— 88	0,0185	0,00927	+ 100
Päo-3-G	100 γ/ml	0,00159	0,0105	+ 561	0,00336	0,004	— 17
Cya-3-G		0,025	0,00909	— 64	0,0579	0,695	— 17
Pet-3-G		0,01112	0,03762	+ 238	0,0184	0,00479	— 74

Wiedergegeben wird die Einbaurate des Acetat-[1-<sup>14</sup>C] in die 3-Monoglukoside des Päonidins (Päo-3-G), Cyanidins (Cya-3-G) und Petunidins (Pet-3-G), sowie deren Änderung in %. Hierbei wurden die Werte der Kontrollversuche ohne Chalkon bzw. Antimetabolit gleich 100% gesetzt. Die unter 1.1. wiedergegebenen Werte zeigen den Chalkoneinfluß<sup>6</sup> und sind die Mittelwerte aus vier getrennten Versuchen. Bei den Antimetabolitenversuchen wurden jeweils die Werte zweier unabhängiger Versuche wiedergegeben.

$$* \text{Einbaurate} = \frac{\text{Gesamtaktivität der Anthocyane} \times 100}{\text{Gesamtaktivität des Acetats}} (\%)$$

das Cyanidin-3-monoglukosid kann sowohl auf der Ebene der Enzymsynthese als auch auf der Ebene der Regulation von Enzymaktivitäten ausgelöst werden. Die Enzymsynthese kann hierbei einerseits indirekt über die Regulierung der Genaktivität (Transkription) andererseits direkt über die Translation beeinflusst werden. In Versuchen mit DNS- und RNS-Antimetaboliten sollte eine Klärung dieser Frage herbeigeführt werden. Einem etwaigen aktivitätssteigernden Einfluß des Chalkons auf die Enzyme der Flavonoidbiosynthese über deren Co-Faktoren wurde mit Hilfe des Natriumdiäthylthiocarbaminats nachgegangen. Dieser für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen spezifische Komplexbildner wurde deshalb gewählt, da Enzyme, die auf die Biosynthese der Flavonoide direkt oder indirekt Einfluß nehmen, vielfach  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen als Co-Faktoren besitzen.

#### ERGEBNISSE

Bei der gleichzeitigen Fütterung von 3,4,2',4',6'-Pentahydroxy-bzw. 4,2',4',6'-Tetrahydroxy-3-methoxychalkon-4'-glukosid und Acetat-[1- $^{14}\text{C}$ ] zeigte das Pentahydroxychalkon-4'-glukosid einen substitutionsspezifischen Einfluß auf die Einbaurate ins Cyanidin-3-monoglukosid. Hierbei wird die Einbaurate ins Cyanidin-3-monoglukosid gesteigert, während der Einbau in das Päonidin- und Petunidin-3-monoglukosid gehemmt wird (Tabelle 1(1)).<sup>6</sup>

#### Der Einfluß der Antimetaboliten

Sowohl unter dem Einfluß des Actinomycin  $\text{C}_1$  als auch des Chloramphenicols und Actidions ist das Verhalten der Einbauraten von Acetat-[1- $^{14}\text{C}$ ] in die einzelnen Anthocyan-3-monoglukoside uneinheitlich (Tabelle 1(2-4)). Während einige Befunde sowohl bei Chloramphenicol als auch bei Actidion eine Aufhebung des spezifischen Cyanidin-Effektes des Chalkons andeuten, sprechen andere Ergebnisse für eine allgemeine Hebung oder Senkung der Einbauraten des Acetats in alle Anthocyane. Da der substitutionsspezifische Cyanidin-Effekt durch keinen der verwendeten Antimetaboliten spezifisch egalisiert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß die spezifische Wirkung des 3,4,2',4',6'-Pentahydroxychalkon-4'-glukosids weder auf der Stufe der Transkription noch auf der Stufe der Translation erfolgt.

TABELLE 2. DER EINFLUß DES NATRIUM-DIÄTHYLTHIOCARBAMINAT IN DER KONZENTRATION  $10^{-3}$  Mol AUF DIE EINBAURATE DES ACETAT-[1- $^{14}\text{C}$ ] IN DIE ANTHOCYANE PÄO-, CYA- UND PET-3-G, DEN 3-MONOGLUKOSIDEN DES PÄONIDINS, CYANIDINS UND PETUNIDINS

Anthocyane	Einbaurate*		Änderung* der Einbaurate (%)	Einbaurate		Änderung der Einbaurate (%)
	ohne Chalkon	mit		ohne Komplexbildner	mit	
Päo-3-G	0,01497	0,00535	- 64	0,0233	0,0142	- 39
Cya-3-G	0,0545	0,1472	+ 170	0,0505	0,0616	+ 21
Pet-3-G	0,04572	0,0209	- 54	0,0291	0,0206	- 29

Zum Vergleich sind die Mittelwerte aus vier getrennten Versuchen über den Einfluß des 3,4,2',4',6'-Pentahydroxychalkons der Konzentration  $10^{-3}$  Mol auf die Einbaurate des Acetats wiedergegeben. Die Werte der Einbauraten und ihre Änderungen sind in % angegeben.

#### Der Einfluß des Natrium-diäthylthiocarbaminats (SDDC)

Unter dem Einfluß des für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen spezifischen Komplexbildners der Konzentration  $10^{-3}$  Mol tritt eine Hemmung der Einbaurate des Acetat-[1- $^{14}\text{C}$ ] ins Päoni-

din- und Petunidin-3-monoglukosid auf. Die Einbaurate ins Cyanidin-3-monoglukosid dagegen wird gesteigert (Tabelle 2).

#### DISKUSSION

In keiner der untersuchten Konzentrationen von Actinomycin C<sub>1</sub>, Chloramphenicol und Actidion konnte eine eindeutige, reproduzierbare Hemmung des substitutionsspezifischen Chalkoneffekts auf die Einbaurate erzielt werden. Die bei einzelnen Konzentrationen auftretende geringfügige Hemmung des Effekts dürfte auf einer allgemein hemmenden Beeinflussung von Transkription bzw. Translation durch die Antimetaboliten beruhen. So könnte dadurch etwa die Synthese eines Enzymes gehemmt werden, dessen Aktivität möglicherweise durch das Chalkon beeinflusst werden kann.

Unter dem Einfluß des für Cu<sup>2+</sup>-Ionen spezifischen Komplexbildners, dem Natrium-diäthyl-dithio-carbaminat, kann in der Konzentration von 10<sup>-3</sup> Mol dieselbe Wirkung auf die Einbaurate des Acetats in die Anthocyane Päonidin-, Cyanidin- und Petunidin-3-monoglukosid erzielt werden wie unter dem Einfluß des Chalkons in derselben Konzentration. In beiden Fällen wird der Einbau ins Cyanidin-3-monoglukosid gefördert, der Einbau in die beiden anderen Anthocyane gehemmt. Es liegt nahe, für die Wirkungsweise des Penta-hydroxy-Chalkons denselben Wirkungsmechanismus wie für den Komplexbildner anzunehmen. Demnach darf angenommen werden, daß das Chalkon 2-wertige Ionen, möglicherweise ebenfalls Cu<sup>2+</sup>-Ionen, festlegt. Auf Grund der hohen Affinität von *o*-Dihydroxygruppen der Flavonoide für Cu<sup>2+</sup>-Ionen<sup>9</sup> und der bekannten hemmenden Wirkung von Flavonoiden auf Methyltransferasen<sup>10,11</sup> kann angenommen werden, daß die Überführung der Hydroxylgruppe in 3-Stellung des B-Rings des gefütterten Chalkons in eine Methoxylgruppe dadurch unterbunden wird, daß das Chalkon die Aktivität der zuständigen Methyltransferase über ihren Co-Faktor hemmt. Außerdem kann angenommen werden, daß die wahrscheinlich durch Phenolasen oder Peroxydasen ausgelöste, früher aufgezeigte Hydroxylierung<sup>6</sup> in 5-Stellung des Chalkons, unterbunden wird. Dadurch unterbleibt eine Überführung des B-Ring-Substitutionsmusters des Penta-hydroxychalkon-4'-glukosids in das der anderen Chalkone. Hierdurch werden die Relationen unter den einzelnen Anthocyanen verändert. Dies kommt in einer gesteigerten Einbaurate des Acetats ins Cyanidin-3-monoglukosid zum Ausdruck.

#### EXPERIMENTELLES

**Biologisches material.** Zur Verwendung kamen 25 mm lange Knospen des Cya-Typs von *Petunia hybrida*. In ihnen befinden sich alle Anthocyane in der Phase linearer Akkumulation. Hierbei handelt es sich in erster Linie um Cyanidin-, Päonidin-, Delphinidin- und Petunidin-3-monoglukosid.<sup>7</sup> Die Knospenhälften verhalten sich innerhalb des Versuchszeitraums hinsichtlich der Anthocyan-synthese annähernd wie in situ belassene Knospen.<sup>8</sup>

**Inkubation.** Die Inkubation der Knospen erfolgte nach der Knospenhälfentechnik<sup>8</sup> in jeweils 10 ml eines modifizierten Mediums nach White,<sup>5</sup> jedoch ohne Glukose. Das Medium enthielt entweder das Chalkon in der Konzentration von 10<sup>-3</sup> Mol, das Acetat-[1-<sup>14</sup>C] und je einen der Antimetaboliten Actinomycin C<sub>1</sub>, Chloramphenicol und Actidion in den Konzentrationen 10, 25, 50 und 100 µg/ml oder das Natrium-diäthyl-dithiocarbaminat (SDDC), ebenfalls in der Konzentration 10<sup>-3</sup> Mol zusammen mit dem Acetat. Jede Petrischale enthielt 100 Knospenhälften. Sie wurden 24 hr bei 25° im Lichtthermostaten (Rumeo, Rubarth und Co, Hannover) bei Dauerlicht (Osram L 40 W 30-1, Lichtintensität 5000 Lx) belassen. Im Anschluß daran wurden die Knospenhälften 3 mal mit aqua dest. gewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

<sup>7</sup> HESS, D. (1963) *Planta* **59**, 567.

<sup>8</sup> HESS, D. (1965) *Z. Pflanzenphysiol.* **53**, 1.

<sup>9</sup> REZNIK, H. und EGGER, K. (1961) *Z. Anal. Chem.* **183**, 196.

<sup>10</sup> SCHWABE, K. P. und FLOHE, L. (1972) *Z. Physiol. Chem.* **353**, 476.

<sup>11</sup> GUGLER, R. und DENGLER, H. J. (1973) *Naunyn-Schmiedbergs Arch. Pharmacol.* **276**, 223.

*Markierung.* Zur radioaktiven Markierung wurde Acetat-[1-<sup>14</sup>C] (sp. Akt.: 52,9 mCi/mMol, Radiochemical Centre/Amersham) mit der Gesamtaktivität von 50  $\mu$ Ci verwendet. Die zur Inkubation verwendeten 10 ml des Mediums enthielten 10  $\mu$ Ci. Innerhalb des Versuchszeitraumes nahmen die Petalenhälften 73–74% der zugeführten Radioaktivität auf.

*Synthese.* Das verwendete Chalkon wurde über Tetraacetyl-phloracetophenon-glukosid<sup>12</sup> und Protocatechualdehyd synthetisiert.<sup>13</sup>

*Aufarbeitung.* Die Aufarbeitung der Anthocyane erfolgte nach Hess und Meyer<sup>14</sup> sowie Hess.<sup>1</sup>

*Messungen.* Als Maßstab für den Einfluß der Antimetaboliten bzw. des Komplexbildners diente die Veränderung der Einbauraten des Acetats in die einzelnen Anthocyane. Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten am Tri-carb-Liquid-Scintillation-Counter (Tri-Carb 3320) der Firma Packard. Die Extinktionswerte zur Ermittlung des jeweiligen Anthocyangehaltes wurden am ZEISS-Spektralphotometer (Modell PMQ II) bei 546 nm bestimmt.

*Anmerkungen.*—Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. D. Hess danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie die ständig fördernde Diskussion. Für technische Assistenz danke ich Frau B. Pfrommer sowie Herrn Gartenmeister Bleich für die Aufzucht der Pflanzen. Die Untersuchung erfolgte mit Unterstützung durch den Bundesminister für Bildung und Wissenschaft.

<sup>12</sup> ZEMPLEN, G. und BOGNAR, R. (1942) *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **75**, 645.

<sup>13</sup> KYMIYA, S., ESAKI, S. and HAMA, M. (1967) *Agric. Biol. Chem.* **31**, 4.

<sup>14</sup> HESS, D. und MEYER, C. (1962) *Z. Naturforsch.* **17b**, 853.