

# Die organspezifische Photodetermination der Entwicklung von Peroxydaseaktivität im Senfkeimling (*Sinapis alba* L.) durch Phytochrom

## I. Kinetische Analyse

### Organ-specific Photodetermination by Phytochrome of the Development of Peroxidase Activity in Mustard Seedlings (*Sinapis alba* L.)

#### I. Kinetic analysis

PETER SCHOPFER und CLAUDIA PLACHY

Institut für Biologie II, Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforsch. **28** c, 296–301 [1973]; eingegangen am 25. Januar/23. Februar 1973)

Phytochrome, peroxidase, photodetermination, enzyme activity, *Sinapis alba*

The development of extractable peroxidase activity in the mustard seedling is controlled by phytochrome ( $P_{fr}$ ; operationally: Continuous far-red light) in an organ specific manner (enhancement in the cotyledons and taproot, inhibition in the hypocotyl; Tables I, II). Detailed kinetics of peroxidase accumulation in the cotyledons (Figs. 2, 3) reveal the existence of a two-step induction mechanism: 1. Formation of a stable transmitter during a period of competence to  $P_{fr}$  ("determination phase"), and 2. development of peroxidase activity mediated by the transmitter during a later period of competence to the transmitter ("realization phase"). These two periods of seedling development are completely separated in time.

Das Phytochromsystem hat eine entscheidende Funktion bei der Entwicklung der Enzymausstattung einer heranwachsenden Keimpflanze<sup>1-3</sup>. Die biochemischen Beziehungen zwischen den durch aktives Phytochrom ( $P_{fr}$ ) bewirkten, spezifischen Eingriffen in das Enzymmuster und der Morphogenese der Pflanze sind noch weitgehend unbekannt. Auch die Aufklärung der molekularen Regulationsvorgänge bei der phytochromabhängigen Induktion bzw. Repression von Enzymaktivitäten steht noch im Anfangsstadium und ist vorwiegend auf deskriptive Untersuchungen angewiesen. Aus den bisherigen kinetischen Arbeiten über die Regulation von Enzymaktivitäten im Senfkeimling<sup>1-3</sup> ergeben sich folgende allgemeine Resultate:

1. Phytochrom reguliert verschiedene Enzyme im selben Organ (wahrscheinlich in der selben Zelle) individuell und nicht durch einen gemeinsamen Kontrollmechanismus. (Das Auftreten koordiniert regulierter Enzyme wird durch diesen Befund nicht ausgeschlossen, konnte aber bisher noch nicht befriedigend nachgewiesen werden).

2. Die Regulierbarkeit der Akkumulation eines Enzyms durch Phytochrom ist eine Funktion des

Keimlingsalters. Die Empfindlichkeit für  $P_{fr}$  (im folgenden „Kompetenz für  $P_{fr}$ “ genannt) steigt zunächst mit der Zeit an und verschwindet später wieder. Diese „Periode der Kompetenz“ des jungen Senfkeimlings ist unter unseren Anzuchtbedingungen normalerweise etwa 72 h nach der Aussaat beendet.

3. Die meßbare Umsteuerung der Enzymakkumulation erfolgt relativ rasch nach der Bildung des Effektormoleküls  $P_{fr}$  durch Licht. Die lag-Phase beträgt je nach Enzym und experimentellen Bedingungen zwischen 0 und ca. 120 min. Nach dem Entfernen des  $P_{fr}$  geht der Effekt relativ rasch (spätestens nach wenigen Stunden) wieder zurück. Diese labile Festlegung einer Umsteuerung durch Phytochrom wird als Modulation bezeichnet<sup>4, 5</sup>.

Die hier dargestellte kinetische Analyse der Peroxydase (PO) führt zu prinzipiell neuen Gesichtspunkten: Bei diesem Enzym kann die Induktion einer Aktivitätssteigerung und die Realisation dieser Induktion zeitlich voneinander getrennt werden. Die Induktion wird durch Phytochrom kontrolliert, während die Realisation nur von endogenen Faktoren abhängt. Im Gegensatz zu den Modulationen ist die durch Phytochrom ausgelöste Umsteuerung auch ohne

Sonderdruckanforderungen an Doz. Dr. P. SCHOPFER, Institut für Biologie II der Univ., D-7800 Freiburg i. Br. Schänzlestraße 9-11 (Germany).

\* Zur ausführlichen Definition dieses Begriffes vgl. Ref. 2, S. 48 ff.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Anwesenheit von  $P_{fr}$  langfristig stabil und wird daher als Determination<sup>5</sup> charakterisiert.

## Material und Methoden

*a. Material:* Das verwendete Samenmaterial von *Sinapis alba* L. wurde 1968 von der Fa. Becker (Heilbronn) bezogen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Selektion (Samendurchmesser 1,7–2,0 mm) und Anzucht erfolgte nach einem Standardverfahren<sup>6</sup>. Standard-Hellrot (HR)- und Dunkelrot (DR)-Bestrahlungsfelder<sup>6</sup> zur Erzeugung von  $P_{fr}$  wurden bei einer Intensität von  $67,5 \mu W \cdot cm^{-2} \pm 10 \%$  (HR) bzw.  $350 \mu W \cdot cm^{-2} \pm 10 \%$  (DR) verwendet. Die Temperatur betrug stets  $25,0 \pm 0,3$  °C. Für jeden Meßpunkt wurden 6–8 unabhängige Parallelansätze ausgewertet. Der einfache mittlere Fehler der in den Abbildungen angegebenen Mittelwerte lag stets unter  $\pm 5 \%$ .

*b. Bestimmung der Peroxydase-Aktivität:* Nach der Auftrennung in die zwei Fraktionen „Kotyledonenlaminae“ und „Restkeimling“ (bzw. in die drei Fraktionen „Kotyledonenlaminae“, „Hypokotyl + Petioli“ und „Radicula“) bei 46 Keimlingen wurden die Proben mit 1 g Quarzsand, 50 mg nachgereinigtem Polyvinylpyrrolidon (Divergan SZ 9012 P; BASF, Ludwigshafen) und 2 ml Extraktionsmedium (0,1 M Kaliumphosphatpuffer,  $154 g \cdot l^{-1}$  Ammoniumsulfat; pH 6,3) im Eisbad homogenisiert.

Das auf 26 g mit Extraktionsmedium aufgefüllte Homogenat wurde 30 min bei  $16000 \times g$  (0 °C) zentrifugiert. In einer 20 ml-Portion des Überstandes, der die gesamte lösliche PO-Aktivität enthält, wurde die PO enthaltende Proteinfraction durch Zusatz von 6,5 g Ammoniumsulfat quantitativ ausgefällt und nach 20 min abzentrifugiert. Dieser Rückstand wurde in 3 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,2; mit 0,1 M 3-Amino-1,3,4-Triazol (Fluka, Buchs) und  $20 g \cdot l^{-1}$  Saccharose\*) aufgelöst und nach 1 h Stehen bei Zimmertemperatur durch Zentrifugieren von den Spuren nichtgelösten Rückstandes befreit. — Die Messung der PO-Aktivität dieses gereinigten Enzymextraktes erfolgte nach der (leicht veränderten) Methode von CHANCE and MAEHLY<sup>7</sup>, wobei die Oxydation des sekundären Substrates Guajakol (Reaktionskonstante  $k_4$ ) als geschwindigkeitsbestimmende Reaktion gewählt wurde: 6,0 ml Reaktionsgemisch enthielten 44–48 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0),  $330 \mu M$  Guajakol (Merck, Darmstadt; Nr. 4212),  $130 \mu M$   $H_2O_2$  und 0,01–0,5 ml Enzymextrakt. Die Synthese von Tetraguajakol ( $\epsilon_{436} = 25500 l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )<sup>8</sup> wurde bei 436 nm photometrisch registriert (2 cm-Küvetten, 25,0 °C). Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde die Anfangssteigung der mit  $2 inch \cdot min^{-1}$  aufgezeichneten, leicht gekrümmten Reaktionskinetik verwendet.

\* Saccharose wurde zugesetzt, um ein Aliquot des Extraktes direkt zur Elektrophorese verwenden zu können.

*c. Begründung der Methode:* Die Bestimmung der PO-Aktivität im Rohextrakt ergab keine brauchbaren Resultate (lag-Phase und starke sigmoide Krümmung der Reaktionskinetik). Es erwies sich als notwendig, reduzierende Substanzen (z. B. Ascorbat) aus dem Extrakt zu entfernen (Ammoniumsulfat-Fällung) und außerdem die hohe Katalase-Aktivität durch Amino-triazol irreversibel zu hemmen. Dieser spezifische Katalase-Inhibitor<sup>9</sup> hat keine Wirkung auf die Aktivität gereinigter PO, verhindert jedoch den Abbau des  $H_2O_2$  im Reaktionsgemisch durch Katalase. Die nach dieser Methode hergestellten Enzymextrakte ergaben für beide Keimlingsfraktionen eine lineare Beziehung zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit im verwendeten Bereich der Kinetik. Im Test trat keine Phenoloxydase-Aktivität auf. Mischung von Enzymextrakten aus Dunkel- und DR-Keimlingen (Kotyledonen oder Restkeimlinge) mit reiner PO (Boehringer, Mannheim) ergaben im Rahmen der Meßgenauigkeit ( $\pm 3 \%$ ) stets additive Verrechnung der Einzelaktivitäten. Die gemessene Enzymaktivität kann daher als Maß für die Enzymkonzentration verwendet werden. Es muß jedoch beachtet werden, daß die Aktivitätsmessung eine heterogene Gruppe von PO-Formen erfaßt, wobei unterschiedliche Reaktionskonstanten zu erwarten sind<sup>10</sup>. Ein kleiner Teil der gesamten PO-Aktivität war mit der verwendeten Methode nicht aus dem Homogenat extrahierbar und wurde daher nicht erfaßt.

## Ergebnisse

*a. Die Entwicklung des Peroxydasegehaltes im Achsensystem (Abb. 1, Tabn. I, II).*

Die aus dem Achsensystem des Keimlings („Restkeimling“ = Radicula, Hypokotyl, Kotyledonarpetiolen und rudimentäre Plumula) extrahierbare PO-Aktivität steigt von ca. 24 h bis mindestens 144 h nach der Aussaat mit konstanter Geschwindigkeit an. Nach diesem Zeitpunkt zeigen die Keimlinge unter unseren Anzuchtbedingungen deutliche Zeichen von Seneszenz, so daß der Verlauf der Kinetik nicht weiter verfolgt werden kann. — Eine kontinuierliche Bestrahlung mit dunkelrotem Licht führt zu keiner signifikanten Beeinflussung des PO-Gehaltes im Gesamt-Achsensystem (Abb. 1). Tab. I zeigt, daß auch Bestrahlung mit hellrotem Licht zum selben Ergebnis führt. Der naheliegende Schluß, die Entwicklung von PO-Aktivität in den Achsenorganen erfolge unabhängig vom Phytochromsystem, ist jedoch nicht berechtigt. Tab. II zeigt vielmehr, daß die Dunkelrotbestrahlung in der Hypokotylfraktion zu einer Hemmung und in der Radicula zu einer Förderung der PO-Akkumulation führt, wobei sich beide Effekte quantitativ kompensieren.

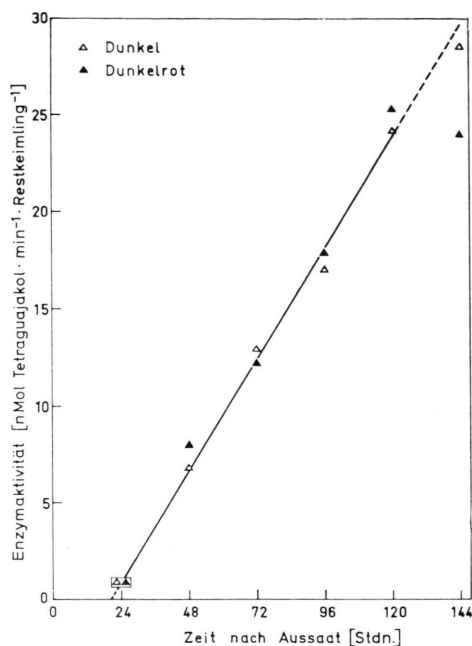


Abb. 1. Die Entwicklung von Peroxydaseaktivität im Restkeimling (Hypokotyl+Radicula) im Dunkeln und unter dunkelroter Bestrahlung. Bestrahlungsbeginn bei der Aussaat. Nach 120 h treten an manchen Keimlingen altersbedingte Schäden auf.

Tab. I. Die Wirkung von dunkelroter und hellroter Dauerbestrahlung auf den Peroxydasegehalt von Restkeimling (Hypokotyl+Radicula) und Kotyledonen.

Bestrahlungsprogramm	Peroxydase-Aktivität [ $\frac{\text{nMol Tetraguajakol}}{\text{min} \cdot \text{Keimling}}$ ]	
	Restkeimling	Kotyledonen
Kontrolle (120 h Dunkel)	25,4 ± 1,7	3,8 ± 0,5
24 h Dunkel+96 h Dunkelrot	25,4 ± 0,9	7,6 ± 0,5
24 h Dunkel+96 h Hellrot	25,7 ± 2,0	5,2 ± 0,1

Tab. II. Die Wirkung von dunkelroter Dauerbestrahlung auf den Peroxydasegehalt von Kotyledonen, Hypokotyl und Radicula. Bestrahlungsbeginn bei der Aussaat. Auswertung 120 h nach der Aussaat.

	Peroxydase-Aktivität [ $\frac{\text{nMol Tetraguajakol}}{\text{min} \cdot \text{Keimling}}$ ]	
	Dunkelkontrolle	Dunkelrot
Kotyledonen	3,5 ± 0,8	12,2 ± 0,8
Hypokotyl	14,7 ± 0,8	4,2 ± 0,3
Radicula	12,8 ± 0,8	20,0 ± 0,2
(Hypokotyl+Radicula)	(27,5 ± 1,6)	(24,2 ± 0,5)

### b. Die Steigerung des Peroxydasegehaltes in den Kotyledonen durch Phytochrom (Abb. 2, Tab. III).

Ähnlich wie in der Radicula kann der PO-Gehalt in den Kotyledonen durch Phytochrom gesteigert werden: Bestrahlung mit Dauer-DR führt zu einem starken Anstieg in der Akkumulationsgeschwindigkeit des Enzyms. Dauer-HR hat, wie zu erwarten<sup>11</sup>, bei der verwendeten Quantenstromdichte eine wesentlich geringere Wirksamkeit. Das Muster der PO-Isoenzyme in den Kotyledonen wird durch Phytochrom in komplexer Weise verändert: Im Dunkelrot tritt neben einem starken Anstieg der Aktivität einiger Isoenzyme eine relative Verminderung der Aktivität anderer Isoenzyme auf (unveröffentlichte Daten). Ein Anstieg des PO-Gehaltes kann auch durch Bestrahlung mit kurzen HR-Stößen ausgelöst werden und ist dann, wie zu erwarten, durch unmittelbar nachfolgende DR-Stöße revertierbar (Tab. III). Damit ist gezeigt,

Tab. III. Induktions- und Revertierungsexperimente mit Hellrot- und Dunkelrot-Stoßbestrahlung zum Nachweis der Niederintensitätsreaktion des Phytochroms. Experiment 1: 6 unabhängige Parallelbestimmungen. Zum Vergleich ist die Wirksamkeit der Hochintensitätsreaktion des Phytochroms (Dauerbestrahlung mit Hellrot bzw. Dunkelrot der entsprechenden Quantenstromdichte) angeführt. Experiment 2: 11 unabhängige Parallelbestimmungen. (D = Dunkel).

Bestrahlungsprogramm	Peroxydase-Aktivität [ $\frac{\text{nMol Tetraguajakol}}{\text{min} \cdot \text{Kotyledonenpaar}}$ ]
<i>Experiment 1:</i>	
24 h D	nicht nachweisbar
144 h D	0,5 ± 0,1
12 h D+5 x (12 h D+5 min HR)+72 h D	7,8 ± 0,5
12 h D+5 x (12 h D+5 min DR)+72 h D	5,3 ± 0,3
12 h D+5 x (12 h D+5 min HR+5 min DR)+72 h D	6,4 ± 0,4
24 h D+48 h HR+72 h D	8,7 ± 0,2
24 h D+48 h DR+72 h D	11,9 ± 0,5
<i>Experiment 2:</i>	
12 h D+5 x (12 h D+3 min HR)+48 h D	3,86 ± 0,02
12 h D+5 x (12 h D+10 min DR)+48 h D	3,34 ± 0,01
12 h D+5 x (12 h D+3 min HR+10 min DR)+48 h D	3,47 ± 0,02

daß das Phytochrom bei der Entwicklung von PO-Aktivität auch durch Stoßbestrahlung in der üblichen Weise reversibel aktiviert werden kann, wenn auch mit relativ geringer Wirksamkeit. Durch Variation des Stoßprogramms konnte der Induktionseffekt nicht wesentlich gesteigert werden (vgl. z. B. Experiment 2 in Tab. II). Aus der Abb. 2 geht hervor, daß die

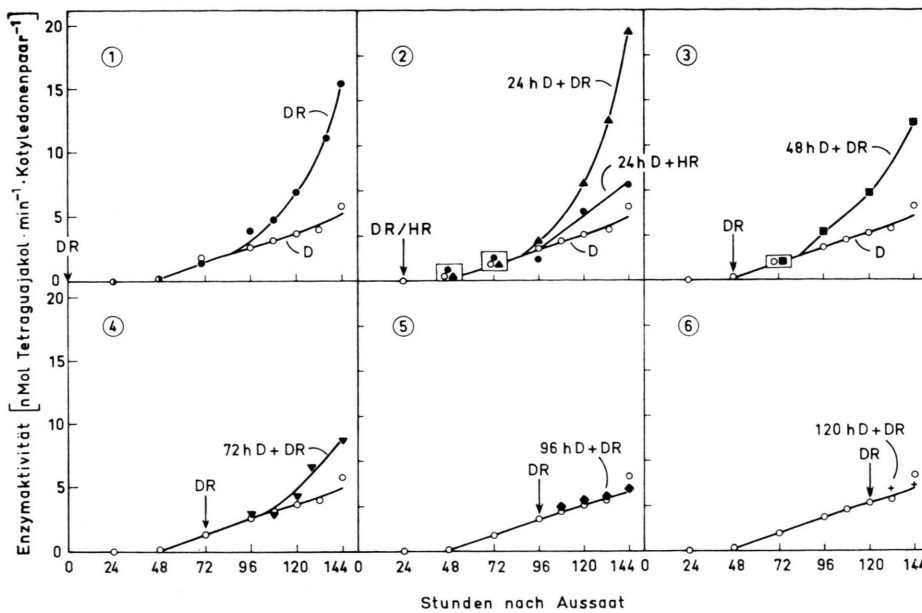


Abb. 2. Die Entwicklung von Peroxydaseaktivität in den Kotyledonen im Dunkeln (D), unter dunkelroter (DR) und hellroter (HR) Bestrahlung. Der Bestrahlungsbeginn ist durch Pfeile markiert. Nach 120 h treten an manchen Keimlingen altersbedingte Schäden auf. Die Symbole sind eingrahmt, wenn sie sich zeichnerisch nicht getrennt darstellen lassen.

Fähigkeit der Kotyledonen auf die Anwesenheit von  $P_{fr}^*$  mit einer Erhöhung des PO-Gehaltes zu reagieren, vom Entwicklungszustand der Keimlinge abhängt: Unabhängig vom Bestrahlungsbeginn setzt der PO-Anstieg nicht vor 72–96 h nach der Aussaat ein. Andererseits hat eine Bestrahlung im Zeitraum 96–144 h nach der Aussaat keine Wirkung mehr. Dies bedeutet offenbar, daß die Kotyledonen in diesem späteren Zeitraum trotz ihrer hohen Potenz zur PO-Akkumulation nicht mehr in der Lage sind, auf  $P_{fr}$  mit einem Anstieg der PO-Aktivität zu reagieren (= fehlende Kompetenz für  $P_{fr}$ ). Andererseits könnten die Kinetiken 5 und 6 der Abb. 2 theoretisch auch mit einer extrem langen lag-Phase ( $\geq 36$  h) zwischen Bestrahlungsbeginn und meßbarem Anstieg des PO-Gehaltes erklärt werden. Da eine Ausdehnung des Untersuchungszeitraumes wegen des fortgeschrittenen Alters der Keimlinge nicht möglich war, konnte zwischen diesen beiden Alternativen hier nicht eindeutig unterschieden werden (vgl. jedoch nächsten Abschnitt). Auf jeden Fall geht aus der Abb. 2 hervor, daß die

Kompetenz auch dieser photomorphogenetischen Reaktion für  $P_{fr}$  innerhalb der Keimlingsentwicklung auf einen festgelegten Zeitraum beschränkt ist.

*c. Die lang anhaltende Nachwirkung des Phytochroms auf den Anstieg des Peroxydase-Gehaltes in den Kotyledonen (Abb. 3).*

Man kann davon ausgehen, daß die physiologische Wirksamkeit der nach der DR-Bestrahlung im Gewebe verbleibenden  $P_{fr}$ -Moleküle sehr rasch absinkt („Hochintensitätsreaktion“, vgl. z. B.<sup>13</sup>) bzw. daß das im Dunkeln wirksame  $P_{fr}$  („Niederintensitätsreaktion“) spätestens nach wenigen Stunden destruiert ist<sup>14</sup>. Die zeitliche Unabhängigkeit der Steigerung des PO-Gehaltes von der molekularen Primärreaktion des  $P_{fr}$  ( $P_{fr} + X \rightarrow P_{fr}X$ ) kann daher nachgeprüft werden, indem man DR-bestrahlte Keimlinge vor dem Einsetzen der physiologischen Reaktion (d. h. vor 72–96 h nach der Aussaat; vgl. Abb. 2) ins Dunkle überführt.

Wie Abb. 3 zeigt, folgt der PO-Anstieg im Dunkeln nach einer zeitlich optimal platzierten DR-Bestrahlung (24–72 h nach der Aussaat, vgl. Abb. 2) für mindestens 2 Tage exakt der Dauer-DR-Kinetik. Ein ähnliches Ergebnis erhält man, wenn die Bestrahlung nicht vor dem Einsetzen des PO-Anstieges, son-

\* Wir verwenden hier das Symbol „ $P_{fr}$ “ allgemein für das wirksame Effektormolekül des Phytochromsystems, ohne zwischen Hochintensitätsreaktion und Niederintensitätsreaktion zu unterscheiden (vgl. dazu<sup>12</sup>).



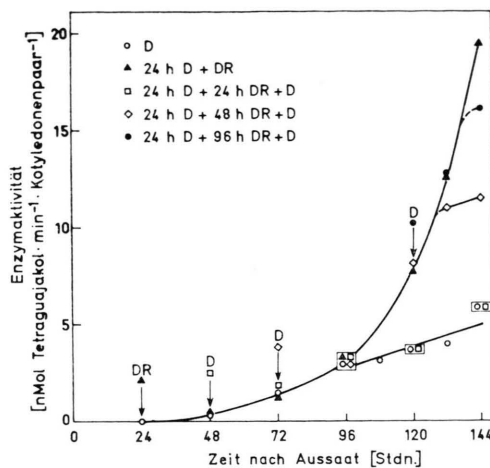


Abb. 3. Die Entwicklung von Peroxydaseaktivität in den Kotyledonen nach Abschalten der dunkelroten Bestrahlung bei 48, 72 und 120 h nach der Aussaat. Bestrahlungsbeginn: 24 h nach der Aussaat. Nach 120 h treten an manchen (besonders stark an reetiolierten) Keimlingen altersbedingte Schäden auf. Die Symbole sind eingerahmt, wenn sie sich zeichnerisch nicht getrennt darstellen lassen.

dern während dieses Anstieges (bei 120 h nach der Aussaat) abgebrochen wird. Wird dagegen die Bestrahlung bereits bei 48 h nach der Aussaat (= 24 h nach Bestrahlungsbeginn) beendet, so unterbleibt der  $P_{fr}$ -abhängige PO-Anstieg vollständig.

Diese Daten zeigen zunächst, daß sich die Erzeugung von  $P_{fr}$  nicht vor dem Zeitpunkt 48 h nach der Aussaat auf die spätere PO-Akkumulation auswirken kann. Ähnliche Befunde sind auch für andere photomorphogenetische Reaktionen gemacht worden. Sie können als Folge fehlender Kompetenz der jeweiligen Reaktion für  $P_{fr}$  während der frühen Keimlingsentwicklung aufgefaßt werden<sup>3, 4</sup>.

Neu und zunächst unerwartet ist jedoch das Ergebnis, daß im Fall der PO-Akkumulation die Erzeugung von  $P_{fr}$  während der Kompetenzphase der Keimlingsentwicklung eine extrem stabile Nachwirkung besitzt, auch wenn schon lange kein wirksames  $P_{fr}$  mehr im Keimling vorhanden ist. Dieser Sachverhalt kann durch den Begriff „Determination“ charakterisiert werden<sup>5</sup>. Der identische Verlauf des PO-Anstieges im Dauer-DR bzw. nach der Beendigung der Bestrahlung bei 72 h oder 120 h nach der Aussaat spricht dafür, daß nach dem Beginn des  $P_{fr}$ -abhängigen PO-Anstieges (ca. 96 h nach der Aussaat) auch bei fortdauernder Bestrahlung keine meßbare  $P_{fr}$ -Wirksamkeit mehr vorhanden ist. Der Anstieg der PO-Aktivität ist vielmehr bereits vor Beginn einer meßbaren Zunahme der Enzymaktivität vollständig determiniert. Dieses

Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem Fehlen von Kompetenz für  $P_{fr}$  im Dunkelkeimling nach dem Zeitpunkt 96 h nach der Aussaat (vgl. Abb. 2).

## Diskussion

Während der Entwicklung des Senfkeimlings kann der Anstieg des PO-Gehaltes in den drei Organen Kotyledonen, Hypokotyl und Radicula durch Phytochrom reguliert werden. Die physiologische Funktion dieses Enzyms ist noch unklar. Einige Befunde deuten darauf hin, daß Peroxydasen eine Rolle bei der Infektionsabwehr<sup>15, 16</sup> und bei der Ligninsynthese<sup>17, 18</sup> besitzen. Mit diesen Vorstellungen im Einklang steht die bevorzugte Lokalisierung dieser Enzyme in den Zellwänden<sup>17, 18</sup>. Peroxydasen können in vitro Auxinoxidase-Aktivität aufweisen<sup>19</sup>. Für eine sinnvolle Diskussion der biologischen Bedeutung der  $P_{fr}$ -induzierten Steigerung bzw. Hemmung des PO-Anstieges bei der Keimlingsentwicklung muß eine Klärung der physiologischen Funktion dieser Enzyme abgewartet werden. Wir beschränken uns daher hier auf die Diskussion der Regulationsvorgänge.

Die Entwicklung der PO-Aktivität wird durch Phytochrom in den Kotyledonen und der Radicula gefördert und im Hypokotyl gehemmt. Die PO zeigt also im Gegensatz zu den bisher beim Senfkeimling untersuchten Enzymaktivitäten<sup>13, 20</sup> eine deutliche Organspezifität bezüglich ihrer Regulation durch  $P_{fr}$ . Unabhängig von der gleichzeitig durch  $P_{fr}$  bewirkten Hemmung des Zellwachstums wird im Hypokotyl die Akkumulation der Enzyme Phenylalaninammonium-lyase<sup>13</sup> und Ascorbatoxydase<sup>20</sup> durch Dauer-DR gesteigert, während die PO-Akkumulation durch die Bestrahlung vermindert wird (vgl. Tab. II). Die Phytochromwirkung auf den Enzymgehalt pro Organ — dem hier gewählten Bezugssystem — kann daher nicht einfach als indirekte Konsequenz der veränderten Wachstumsbedingungen aufgefaßt werden. Während sich die Wahl des Bezugssystems „biologische Einheit“ für die Organe Kotyledonen und Hypokotyl gut begründen läßt (weitgehend konstante Zellzahl und konstanter DNS-Gehalt<sup>21</sup>) ist dies für die Radicula wegen der kontinuierlichen Bildung neuer Zellen nicht in gleicher Weise der Fall. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß die Radicula nach unseren Beobachtungen PO an das Substrat abgibt. Die hier beschriebene „Induktion“ der PO durch  $P_{fr}$  in diesem Organ bedarf daher noch sorgfältiger Untersuchung.

Unbeschadet dieser Einschränkung können wir aus den vorliegenden Daten den allgemeinen Schluß ziehen, daß die Regulation von Enzymaktivitäten durch Phytochrom vom unterschiedlichen „primären Differenzierungsmuster“<sup>1-3, 22</sup> der reagierenden Organe geprägt werden kann. Die Spezifität auf der Ebene der Gewebe ist bislang aus methodischen Gründen nur für die Anthocyansynthese nachgewiesen<sup>22</sup>, dürfte aber auch im Fall der Enzyme im Prinzip vorhanden sein.

Die Kinetik der  $P_{fr}$ -induzierten PO-Akkumulation in den Kotyledonen (vgl. Abb. 2) zeigt, daß auch der zeitliche Ablauf des Induktionsvorganges spezifisch für ein bestimmtes Enzym sein kann: Die PO-Aktivität steigt nach einer induktiven Bestrahlung frühestens zu einem Zeitpunkt an, wo andere Enzyme praktisch nicht mehr unter der Kontrolle des Phytochroms stehen. Eine genaue kinetische Analyse der

PO-Induktion zeigt indessen, daß die zeitliche Spezifität in diesem Fall nicht durch eine Verschiebung der Kompetenz für  $P_{fr}$  in eine spätere Entwicklungsperiode, sondern auf einer *hinausgeschobenen Realisation* des induzierten Anstieges der Enzymaktivität beruht. Die Phase der optimalen Induzierbarkeit (= Kompetenz für  $P_{fr}$ ) liegt auch im Fall der PO in dem üblichen Zeitraum von 24–72 h nach der Aussaat. Während jedoch bei allen anderen bisher untersuchten photomorphogenetischen Reaktionen die Induktion ohne wesentliche Verzögerung realisiert wird<sup>2</sup>, erfolgt dies bei der PO erst nach dem Ablauf

der Kompetenz für  $P_{fr}$ . Der während der Kompetenz für  $P_{fr}$  induzierte (latente) Effekt kann anschließend durch das Entfernen von wirksamem  $P_{fr}$  nicht mehr rückgängig gemacht werden (vgl. Abb. 3).  $P_{fr}$  bewirkt also eine langfristig stabile, bezüglich  $P_{fr}$  irreversible *Determination* des späteren PO-Anstieges. Daraus folgt, daß der messbare Anstieg der Enzymaktivität — die Realisation der Determination — nicht durch  $P_{fr}$  kontrolliert wird. In der molekularen „Kausalkette“ zwischen  $P_{fr}$  und dem enzymatisch aktiven PO-Molekül muß aber mindestens ein stabiles Glied („Transmitter“) vorhanden sein, das nur in der *Determinationsphase* (Kompetenz für  $P_{fr}$ ; vor 96 h nach der Aussaat) unter dem Einfluß von  $P_{fr}$  gebildet wird, aber erst später (in der *Realisationsphase*; ab 96 h nach der Aussaat) ohne Mitwirkung von  $P_{fr}$  eine Steigerung der PO-Aktivität bewirken kann. Man muß also zwei verschiedene, zeitlich getrennte Kompetenzen auseinanderhalten: 1. Die Kompetenz für  $P_{fr}$ , die im bestrahlten Keimling zur Bildung eines Transmitters führt und 2. die Kompetenz für den Transmitter, welche in Gegenwart des Transmitters zur Ausbildung von PO-Aktivität führt. In einer folgenden Arbeit werden wir versuchen, diesen hier postulierten Transmitter zu identifizieren.

Anmerkungen: Das Projekt wurde weitgehend aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 46) finanziert. Herrn Prof. MOHR danken wir für Diskussionsbeiträge.

<sup>1</sup> P. SCHOPFER, *Phytochrome* (K. MITRAKOS u. W. SHROPSHIRE, eds.), 485, Academic Press, New York 1972.

<sup>2</sup> H. MOHR, *Lectures on photomorphogenesis*, Springer, Berlin 1972.

<sup>3</sup> H. MOHR, *MTP International Review of Science. Biochemistry Series*, Vol. 9 (J. PAUL, ed.) MTP Medical & Publishing Co. Ltd., in press.

<sup>4</sup> I. BIENGER u. P. SCHOPFER, *Planta* **93**, 152 [1970].

<sup>5</sup> P. SCHOPFER, *Ber. dtsh. bot. Ges.* [1973], im Druck.

<sup>6</sup> H. MOHR, *Z. Pflanzenphys.* **54**, 63 [1966].

<sup>7</sup> B. CHANCE u. A. C. MAEHLY, *Meth. of Enzymol.* (S. P. COLOWICK u. N. O. KAPLAN, eds.) Vol. **II**, 764, Academic Press, New York 1955.

<sup>8</sup> J. PÜTTER, *Meth. der enzymat. Anal.* (H. U. BERGMAYER, Hrsgb.) 2. Aufl., Bnd. **I**, 649, Verlag Chemie, Weinheim 1970.

<sup>9</sup> E. MARGOLIASH, E. NOVOGRADSKY u. A. SCHEJTER, *Biochem. J.* **74**, 339 [1960].

<sup>10</sup> J. CHMIELNICKA, P. I. OHLSSON, K. G. PAUL u. T. STIGBRAND, *FEBS-Letters* **17**, 181 [1971].

<sup>11</sup> E. WAGNER u. H. MOHR, *Photochem. Photobiol.* **5**, 397 [1966].

<sup>12</sup> P. SCHOPFER u. H. MOHR, *Plant Physiol.* **49**, 8 [1972].

<sup>13</sup> L. DITTES, I. RISSLAND u. H. MOHR, *Z. Naturforsch.* **26b**, 1175 [1971].

<sup>14</sup> P. SCHOPFER u. H. OELZE-KAROW, *Planta* **100**, 167 [1971].

<sup>15</sup> T. KOSUGE, *Annu. Rev. Phytopathol.* **7**, 222 [1969].

<sup>16</sup> F. A. MOUSTAFA u. R. WHITTENBURY, *Phytopathol. Z.* **67**, 214 [1970].

<sup>17</sup> P. K. HEPLER, R. M. RICE u. W. A. TERRANOVA, *Canad. J. Bot.* **50**, 977 [1972].

<sup>18</sup> J. L. HALL u. R. SEXTON, *Planta* **108**, 103 [1972].

<sup>19</sup> T. ENDO, *Plant Cell Physiol.* **9**, 333 [1968].

<sup>20</sup> H. DRUMM, K. BRÜNNING u. H. MOHR, *Planta* **106**, 259 [1972].

<sup>21</sup> M. WEIDNER, *Planta* **75**, 94 [1967].

<sup>22</sup> E. WAGNER u. H. MOHR, *Planta* **71**, 204 [1966].