

SHR was not statistically significant. TH activity in vas deferens of SH rats was also higher than that of Wistar-Kyoto rats. DBH activities in mesenteric vessels and vas deferens and TH activities in mesenteric vessels and brain were not statistically different between Wistar-Kyoto rats and SH rats without NaCl administration.

When NaCl was administered to SH rats, DBH and TH activities in mesenteric vessels were increased significantly about 2–3 fold. In contrast, the increase in both enzyme activities in adrenals and vas deferens was not statistically significant. These results suggest that the elevated serum DBH activity after NaCl may be mainly

<sup>8</sup> We thank Professor K. OKAMOTO and Dr. Y. YAMORI (Kyoto University, Kyoto) for spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats and Miss M. SUZUKI and Miss N. YAMADA for technical assistance. This work was supported by a grant from 'Science and Technology Agency', Japan.

<sup>9</sup> Present address, Department of Oral Biochemistry, Tōhoku Dental College, Kōriyama, Japan.

derived from the blood vessels, and are consistent with the concept that sympathetic nerve activity may be increased in blood vessels during the rapid increase of blood pressure by NaCl administration in SH rats<sup>8</sup>.

**Zusammenfassung.** Nachweis, dass Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität und Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität in Mesenterialgefäßsen spontan hypertoner Ratten nach Kochsalzgaben im Trinkwasser erhöht sind.

T. NAGATSU, T. KATO, Y. NUMATA (SUDO),  
K. IKUTA and H. KUZUYA<sup>9</sup>  
H. UMEZAWA, M. MATSUZAKI and  
T. TAKEUCHI

*Department of Biochemistry, School of Dentistry,  
Aichi-Gakuin University, Chikusa-ku,  
Nagoya 464 (Japan), and Institute of Microbial  
Chemistry, Shinagawa-ku, Tokyo (Japan),  
19 February 1975.*

## Gewebekulturen aus Alkaloidpflanzen IV.<sup>1</sup> *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde

### Tissue Cultures of Alkaloid Plants IV.<sup>1</sup> *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde

Die Papaveracee *Macleaya microcarpa* enthält wie die nahe verwandte *M. cordata* die Hauptalkaloide Protopin und Allokryptopin sowie das gefärbte Sanguinarin<sup>2</sup>. Diese Alkaloide werden auch in isolierten Kalli von *M. cordata*-Explantaten gebildet und sind dort in einzelnen, gelb gefärbten Zellen angereichert<sup>3,4</sup>. Eine Überführung des Kallusgewebes in Dauerkultur erfolgte bisher nicht. Es ist aber wesentlich zu prüfen, ob die Fähigkeit zur Alkaloidbildung bei fortlaufender Subkultivierung erhalten bleibt. Wir berichten daher über Untersuchungen an mehrjährigen Gewebekulturen von *M. microcarpa*.

**Material und Methoden.** Stengel ( $\varnothing$  3–8 mm) von *M. microcarpa*-Pflanzen im Knospenstadium wurden nach Sterilisieren mit gesättigter Chlorkalklösung (30 min) in 1,0–1,5 cm lange Stücke geschnitten und auf den mit Agar (8 g/l) verfestigten Nährmedien 1a, 1b und 2 (Tabelle) bei 25 °C und 12 h/Tag Fluoreszenzlicht (1000–1200 Lux) gehalten. Nach 9 Wochen wurden die gebildeten Kalli vom Explantat getrennt und selbstständig kultiviert. In Abständen von 3 Wochen erfolgte eine Übertragung auf neues Nährmedium.

Die Alkaloidextrakte aus Gewebe- und Pflanzenmaterial wurden in üblicher Weise gewonnen und gereinigt. Zur Erfassung ausgeschiedener Alkaloide wurden die Nährmedien homogenisiert, alkalisiert und erschöpfend mit Chloroform extrahiert. DC der gereinigten Extrakte erfolgte an Kieselgel G (Merck)-Schichten mit Benzol/Methanol (8:2). Zur kombinierten quantitativen Allokryptopin/Protopin-Bestimmung wurden die entsprechenden, unbehandelten DC-Zonen isoliert. Lage und Grösse der Allokryptopin- und Protopin-Flecke wurden

durch Betrachten unter UV-Licht und mit Hilfe angefärbter Vergleichssubstanzen auf demselben DC ermittelt. Die alkaloidhaltigen Kieselgelproben wurden durch Zugabe von Kieselgel G auf ein Gewicht von 500 mg gebracht und mit 0,3 ml Essigsäure (99%ig) versetzt. Nach Auffüllen mit konzentrierter Schwefelsäure zu einem Gesamtvolumen von jeweils 10 ml wurden die Proben 60 min bei 80 °C im Wasserbad gehalten und bei 534 nm gegen eine Nullprobe mit 500 mg alkaloidfreiem Kieselgel G vermessen. Von jedem Material wurden Proben mit unterschiedlichen Alkaloidmengen zur Messung gebracht. Da das Verhältnis von Protopin zu Allokryptopin nicht genau bekannt war, wurden nur Messungen, deren Extinktionen im Schnittbereich der Eichkurven beider Alkaloide lagen, ausgewert.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen erfolgten an Handschnitten von Gewebekulturen, die in erkaltende Agarlösungen (2–5%ig) bei 48 °C eingebettet wurden. Als Fällungsreagenz für Alkaloide diente Jod-Jodkalium (Mandel-Reagenz, 10%ig).

<sup>1</sup> III. Mitteilung: A. ROMEIKE und H. KOBELTZ, Kulturpflanze 20, 165 (1972).

<sup>2</sup> R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen* (Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart 1969), vol. 5, p. 276.

<sup>3</sup> D. NEUMANN und E. MÜLLER, Flora, Abt. A 158, 479 (1967).

<sup>4</sup> D. NEUMANN und E. MÜLLER, Biochem. Physiol. Pflanzen 165, 271 (1974).

<sup>5</sup> T. MURASHIGE und F. SKOOG, Physiologia plant. 15, 473 (1962).

<sup>6</sup> R. HELLER, Annls. Sci. nat. Bot. Biol. Végét. 14, 1 (1953).

<sup>7</sup> H. KOBELTZ und I. HAGEN, Flora 152, 447 (1962).

#### Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Mineralstoffe	Vitamine und Aminosäuren nach KOBELTZ und HAGEN <sup>7</sup>	Vitamin B <sub>1</sub> (ppm)	2,4-D (ppm)	IES (ppm)	Kinetin (ppm)	Gibberellinsäure (ppm)	Äpfelsäure (ppm)
1a. MURASHIGE und SKOOG <sup>5</sup>	+	0,3	1,0	—	0,2	0,1	50
1b. MURASHIGE und SKOOG <sup>5</sup>	+	0,3	—	10,0	0,4	0,1	50
2. HELLER <sup>6</sup>	+	0,3	—	2,0	0,2	0,1	50

*Ergebnisse und Diskussion.* Kalli entstanden nur an Explantaten auf dem Medium 1a (Tabelle). Bei der anschliessenden Kultivation des Kallusgewebes auf diesem Nährmedium waren die Zellwände zunächst überwiegend braun gefärbt und stark strukturiert. Erst nach 3 Monaten entstand ohne Veränderung der Kulturbedingungen hellgelber, lockerer, wüchsiger Kallus. Er wurde auch auf die Nährmedien 1b und 2 (Tabelle) übertragen. Dieses Material verzehnfacht sein Frischgewicht während einer Subkultur. Es bildet Alkalioide, die teilweise in das Medium abgegeben werden. Wie bei der als Ausgangsmaterial verwendeten *M. microcarpa* treten vor allem Protopin und Allocryptopin auf. Auch das gegenseitige Verhältnis dieser Alkalioide entspricht im wesentlichen dem in der intakten Pflanze. Sanguinarin ist in der Gewebekultur unregelmässig vorhanden. Während einer Subkultur produzieren die Zellen 0,20 bis 0,25% ihrer Trockensubstanz an Protopin und Allocryptopin. Als Analysenwert für die gesamte *M. microcarpa*-Pflanze fanden wir 0,32% der Trockensubstanz an Protopin und Allocryptopin (Blätter 0,17%, Stengel 0,16%, Wurzel 1,6%). Die Biosyntheseleistung der Gewebekultur ist also vergleichbar mit der Produktivität der Gesamtpflanze.

Die von NEUMANN und MÜLLER<sup>3</sup> beschriebenen gelben Zellen können lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Sie ergeben bei Behandlung der Gewebeschnitte mit Mandel-Reagenz einen Niederschlag, der auf eine Anhäufung von Alkaloiden schliessen lässt. Ihre Färbung wird jedoch nicht, wie früher angenommen<sup>3</sup>, durch Sanguinarin allein verursacht, denn auch Sanguinarin-freie Gewebekulturen enthalten gelbe Zellen. Der verantwortliche gelbe Farbstoff besitzt nach seinem Verhalten bei der Isolierung von Alkaloiden aus der Gewebekultur keinen Alkaloidcharakter. Trotzdem weist sein Vorkommen auf

die Bildung und Speicherung von Alkaloiden hin (Signalfaktor): Die Selektion und Kultivation von intensiv bzw. schwach gefärbten Teilen der *M. microcarpa*-Gewebekulturen führt in der Regel zu alkaloidreichen bzw. alkaloidarmen Gewebekultur-Linien, die beispielsweise 0,40% bzw. 0,10% Protopin und Allocryptopin bezogen auf die Trockensubstanz der Zellen besitzen. Linien mit verschiedenem Alkaloidgehalt unterscheiden sich nicht grundsätzlich in ihrer Wachstumsintensität.

Gewebekulturen aus *M. microcarpa* gehören damit nicht nur zu den wenigen Gewebekulturen von Alkaloidpflanzen, die Alkalioide in messbaren Mengen bilden, sondern gestatten im Zusammenhang mit dieser Fähigkeit kontinuierliche Untersuchungen über Differenzierungsvorgänge. Sie weisen zugleich auf die Bedeutung von Signalfaktoren für die Selektion<sup>8</sup> auch bei einem von der intakten Pflanze abgeleiteten System hin.

*Summary.* Tissue cultures of the Papaveracee *Macleaya microcarpa* retained the capability of synthesizing alkaloids (protopine, allocryptopine, sanguinarine) for 3 years after initiation. The alkaloids are accumulated in single, yellow-coloured cells scattered in the tissue. The colour of these cells is continuously produced by a yellow pigment without alkaloidal properties. The orange alkaloid sanguinarine occurs only irregularly. Nevertheless, selection of deep and weak coloured pieces of tissue cultures led to lines with a high and a low content of alkaloids, respectively.

H. KOBLITZ, U. SCHUMANN, H. BÖHM<sup>9</sup>  
und J. FRANKE<sup>9</sup>

Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung  
der AdW, DDR-4235 Gatersleben (Deutsche  
Demokratische Republik), und  
Institut für Biochemie der Pflanzen der AdW,  
Postfach 250, DDR-401 Halle/Saale,  
(Deutsche Demokratische Republik), 10. Februar 1975.

<sup>8</sup> H.-J. TROLL, Züchter 31, 225 (1961).

<sup>9</sup> Institut für Biochemie der Pflanzen der AdW, 401 Halle (Saale),  
DDR.

## Glutathione Peroxidase Activity of Inorganic Selenium and Seleno-DL-Cysteine

In the course of evolution, biological systems have seized upon the relatively meager catalytic activity of certain metals, and have greatly amplified their activity by incorporation into a complex organic matrix. For example, inorganic iron has the capacity to decompose hydrogen peroxide with a catalytic coefficient of  $10^{-5}$ . This 'catalase' activity is amplified 1000-fold by incorporation of the iron into a porphyrin ring, and is brought to its ultimate efficiency, an activity  $10^8$  to  $10^{10}$  times as great as that of iron alone by the addition of the protein moiety of the enzyme, catalase<sup>1</sup>.

It has recently been demonstrated that selenium forms an integral part of the glutathione peroxidase molecule, in rats<sup>2</sup>, sheep<sup>3</sup>, cattle<sup>4</sup>, and man<sup>5</sup>. We now demonstrate that inorganic selenium also has well-defined glutathione peroxidase activity, albeit at a level considerably lower than that of the enzyme, glutathione peroxidase.

Sodium selenite was obtained from J.T. Baker, and seleno-DL-cystine and seleno-DL-methionine were purchased from Sigma Chemical Corporation. The hemolysate and all selenium compounds were dissolved in a solution containing 0.7 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 2.7 mM EDTA, pH 7.0. Presumably, the seleno-DL-cystine was reduced to seleno-DL-cysteine by the  $\beta$ -mercaptoethanol and GSH. Assays of glutathione peroxidase

activity were carried out by linking the formation of oxidized glutathione (GSSG) to the oxidation of NADPH through glutathione reductase, according to the principle originally described by PAGLIA and VALENTINE<sup>6</sup>. The complete assay system for GSH-Px contained Tris-HCl, 0.1 M, pH 8.0 (25°); EDTA, 0.5 mM; GSH, 2.0 mM; glutathione reductase, 1 U/ml; NADPH, 0.2 mM; t-butyl hydroperoxide, 0.7 mM. The 'GSH-Px activity' of each preparation was determined by measuring at 37°C the decrease in optical density at 340 nm of the complete system against a blank from which only the source of 'enzyme' (hemolysate, sodium selenite, seleno-DL-cysteine or other test substance) has been omitted. An additional

<sup>1</sup> M. CALVIN, *Chemical Evolution* (Oxford University Press, New York and Oxford 1969), p. 141-161.

<sup>2</sup> J. T. ROTRUCK, A. L. POPE, H. E. GANTHER, A. B. SWANSON, D. G. HAFEMAN and W. G. HOEKSTRA, Science 179, 588 (1973).

<sup>3</sup> S. H. OH, H. E. GANTHER and W. G. HOEKSTRA, Biochemistry 13, 1825 (1974).

<sup>4</sup> L. FLOHE, W. A. GUENZLER and H. H. SCHOCK, FEBS Lett. 32, 132 (1973).

<sup>5</sup> Y. C. AWASTHI, E. BEUTLER and S. K. SRIVASTAVA, J. biol. Chem., in press (1975).

<sup>6</sup> D. E. PAGLIA and W. N. VALENTINE, J. Lab. clin. Med. 70, 158 (1967).