

herzustellen. Der Kunst des Chemikers wird es gelingen, den Verzweigungsgrad immer mehr zurückzudrängen. Es bedeutet einen großen Fortschritt, daß wir jetzt eine schnell arbeitende Meßmethode besitzen, die uns von der reinen Empirie erlöst. Wir sind der Ansicht, daß der hochmolekulare, unverzweigte Butadien-Kautschuk ein höheres gummitechnisches Niveau hauptsächlich im elastischen Verhalten haben wird.

Die Mischpolymerisation mit Vinyl-Verbindungen kann man vielleicht als Verlegenheitslösung in der angestrebten Richtung betrachten, sofern man nicht durch den Einbau der Vinyl-Verbindungen spezielle Eigenschaften, wie z. B. Ölfestigkeit und dergleichen, anstrebt. Die Verminderung der Menge der Vinyl-Verbindung hebt die elastischen Eigenschaften des Polymerats. Im Sinne dieser Arbeitsrichtung war es uns möglich, Mischpolymerate mit nur 10% Styrol, genannt Buna S 10, herzustellen, welche bei guter Verarbeitbarkeit hohe Elastizität, überlegenes Verhalten in der Kälte und eine überlegene Abreibfestigkeit im Vergleich mit Naturkautschuk besitzt.

Weitere Fortschritte sind auf dem Gebiete der Vulkanisation zu erhoffen, dabei fasse ich den Begriff der Vulkanisation sehr weit, nämlich als eine sinnvolle nachträgliche Vernetzung, die nicht nur mit Schwefel, sondern auch durch andere hier nicht näher zu definierende Reaktionen erreicht werden kann. Gelingt es hier Fortschritte zu machen, dann eröffnet sich nicht nur ein Ausblick auf Vulkanisationszustände, die verbesserte technische Eigenschaften (auch bei Naturkautschuk) ergeben,

es wäre dann auch möglich, das Verarbeitungsproblem zu lösen, indem man hochplastische, leicht verarbeitbare, stark geregelte synthetische Kautschuk-Arten richtig zu vulkanisieren lernt.

Schluß

Durch die Potsdamer Beschlüsse wurde die Erzeugung von künstlichem Kautschuk zu einer Fabrikation erklärt, die in Zukunft in Deutschland verboten ist. Die deutsche Industrie wird in Zukunft auf bestimmte Eigenschaften der synthetischen Kautschuk-Arten nicht verzichten können. Sie ist also jetzt gezwungen, Produkte, die ihre Existenz unserem eigenen Schaffen verdanken, aus Amerika einzuführen. Werden wir auf die Dauer von der Bearbeitung eines Gebietes ausgeschlossen sein, für das wir mit unseren Arbeiten richtungsweisend waren, und dem sich heute andere Länder, nicht weil es wehrwirtschaftlich wichtig ist, sondern weil es der Bereicherung der gesamten Technik dient, mit aller Anstrengung widmen?

Es bleibt mir noch übrig, zweier ehrenwerter Männer unseres früheren Vorstandes zu gedenken, Herrn Dr. *Fritz ter Meers*, der mit großzügigem Verständnis uns die Mittel für unsere Arbeiten sicherte und in den Tagen des Kleinmuts uns anfeuerte, Herrn Dr. *Otto Ambros*, der als großer Techniker und Organisator unsere Ergebnisse durch Bau der Buna-Werke in die Tat umsetzte. Nicht vergessen und gegrüßt seien die vielen hier ungenannten Mitarbeiter, Chemiker und Ingenieure, die sich dem Werke mit Hingabe und großem Können widmeten. Eingeg. am 17. April 1950. [A 267]

Die Bedeutung von Farbstoffen bei den Sexualprozessen der Algen und Blütenpflanzen

Von Dozent Dr. F. MOEWUS, Max Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg

Nach Darstellung der grundsätzlichen Möglichkeiten, Arbeitsmethoden und Schwierigkeiten der Erforschung der Sexualprozesse, insbes. bei Chlamydomonas, werden besonders die in den letzten Jahren erhaltenen neuen Ergebnisse zusammengefaßt.

- I. Einleitung
- II. Die Phasen der Sexualität bei Chlamydomonas
 - 1. Die vegetative Lebensweise
 - 2. Die Geißelwachstumsphase (Phase I)
 - 3. Die Beweglichkeitsphase (Phase II)
 - 4. Die Determinierungsphase (Phase III)
 - 5. Die Kopulationsphase (Phase IV)
 - 6. Die Folgephasen
- III. Nachweis der in den einzelnen Phasen gebildeten Wirkstoffe

- IV. Ersetzen der Wirkstoffe durch chemisch bekannte Verbindungen
- V. Mutationsversuche zur Anreicherung der Wirkstoffe
 - 1. Chemische Aufarbeitung von Filtraten
 - 2. Mikrobiologische Vorversuche
 - 3. Gen-abhängige Fermentprozesse
- VI. Die chemische Isolierung der Sexualstoffe
- VII. Der Sterilitätsstoff Rutin
- VIII. Übersicht über die Sexualstoffe von Chlamydomonas
- IX. Flavonole als Sterilitätsstoffe bei einer Blütenpflanze

I. Einleitung

Die geschlechtliche Fortpflanzung ist die Voraussetzung für die Erhaltung der meisten Lebewesen. Seit mehr als 100 Jahren wird an der Aufklärung dieses Vorganges gearbeitet. Die morphologischen Fragen, wie die Geschlechtszellen gebildet werden, wie sie sich vereinigen und wie sich das Verschmelzungsprodukt (Zygote) zum neuen Organismus entwickelt, sind weitgehend geklärt. Die genetischen Fragen, nach welchen Gesetzen bei der Vereinigung von väterlicher und mütterlicher Substanz deren Eigenschaften auf die Nachkommen weitergegeben werden, sind ebenfalls erforscht. Nur die physiologischen Vorgänge, die während der geschlechtlichen Fortpflanzung in den Organismen ablaufen oder sie überhaupt auslösen, sind noch weitgehend unbekannt. Trotz der Mannigfaltigkeit des Organismenreiches ist der Befruchtungsvorgang jedoch überall prinzipiell gleichartig: Es verschmelzen 2 Geschlechtszellen (Gameten), wobei die in den Gameten vorhandenen ♀ und ♂ Zellkerne fusionieren, welche die Träger des Erbgutes sind. Wenn der Sexualakt bei allen Organismen nach dieser Gesetzmäßigkeit verläuft, so kann wohl mit Recht gefolgt werden, daß für die physiologischen Vorgänge, die den Sexualakt auslösen und begleiten, ebenfalls gewisse Prinzipien für das gesamte Organismenreich Geltung haben müssen. Will man die physiologische Seite des Sexualitätsproblems erforschen, dann stößt man sofort auf methodische Schwierigkeiten. Wel-

ches Untersuchungsobjekt soll gewählt werden, damit folgende Forderungen erfüllt sind? 1. Der Organismus soll jederzeit (nicht nur in gewissen Altersstufen oder Jahreszeiten) zur Gametenbildung bereit sein. 2. Der Befruchtungsvorgang darf nicht innerhalb des ♀ Organismus erfolgen, sondern muß außerhalb desselben mikroskopisch verfolgbar sein. 3. Die Gameten müssen längere Zeit kopulationsfähig sein, denn nur dann kann man mit ihnen Experimente ausführen. Unter den unzähligen Organismen-Arten erfüllen nur wenige diese 3 methodischen Voraussetzungen. Will man jedoch außerdem die Untersuchungsergebnisse jederzeit reproduzieren, dann ergibt sich als 4. methodische Vorbedingung, daß der Organismus unter konstanten Bedingungen kultiviert werden kann. Damit engt sich der Kreis der Untersuchungsobjekte noch mehr ein. Bis heute gibt es eigentlich nur einen Organismus, der diese methodischen Voraussetzungen erfüllt. Es ist die einzellige Grünalge *Chlamydomonas eugametos*. Mit dieser primitiven Pflanze sind seit 20 Jahren eingehende Untersuchungen angestellt worden. Heute sind wir in der Lage, einen Überblick über die Sexualität, ihre morphologischen, genetischen, physiologischen Bedingtheiten zu geben. Bestimmte Teilprozesse sind auch an anderen pflanzlichen und tierischen Organismen genau untersucht worden. Sie bilden eine wichtige Ergänzung und Bestätigung der an *Chlamydomonas* gefundenen Ergebnisse, insofern als auch sie zeigen, daß für die Auslösung und den Ablauf des Sexualaktes bestimmte Wirk-

stoffe im Organismus verantwortlich sind. Dabei handelt es sich meist um Farbstoffe: Carotinoide, Flavonole, Anthocyane, Naphthochinone. Ihre Entstehung ist erblich bedingt. So war es erst durch Zusammenarbeit von Genetik und Biochemie möglich, ihre physiologische Bedeutung für den Sexualprozeß sicherzustellen.

II. Die Phasen der Sexualität bei *Chlamydomonas*

1. Die vegetative Lebensweise

Die einzellige *Chlamydomonas* ist etwa 15μ groß. Sie läßt sich auf Agar kultivieren wie Bakterien und Hefen. Nur muß der Grünalge Licht geboten werden, damit die Photosynthese vor sich gehen kann. Sie vermehrt sich durch Teilung: der Zellinhalt zerfällt in 4 kleinere Zellen, die frei werden, heranwachsen und sich dann erneut teilen. Unter konstanten Kulturbedingungen¹⁾ teilt sich jede Zelle alle 24 Stunden in 4 Tochterzellen auf. Von einer isolierten Zelle hat man dann nach 10 Tagen bereits 4^{10} Nachkommen. Diese Zellen sind unter sich alle gleich. Man nennt eine solche Kultur Klon-Kultur. Man kann auf diese Weise *Chlamydomonas* unbegrenzt kultivieren. In diesem vegetativen Zustand zeigt die Alge keine Sexualität. Sobald man jedoch solche Agar-Zellen in Wasser überträgt, geht eine Veränderung vor sich: sie werden zu Gameten²⁾. Jede bisher unbewegliche vegetative Zelle wird direkt zu einer frei beweglichen Geschlechtszelle, die mit einer anderen kopuliert. Dieser Vorgang ist immer lichtabhängig³⁾. Er läßt sich in einzelne Phasen zerlegen.

2. Die Geißelwachstumsphase (Phase I)

Die erste Veränderung läßt sich mikroskopisch an den vegetativen Zellen nach einer Belichtung von 3 min wahrnehmen. An 2 vorgebildeten Stellen der Zellmembran sind 2 Geißeln hervorgewachsen. Sie sind starr, die Zellen sind also noch unbeweglich. Wird zu diesem Zeitpunkt die Belichtung abgebrochen, verharren die Zellen im unbeweglichen, begeißelten Zustand. Wird die Belichtung fortgeführt, so tritt die 2. Phase der Umbildung zum Gameten ein.

3. Die Beweglichkeitsphase (Phase II)

Bereits nach einer Belichtung von 4 min ist die erste langsame Geißelbewegung erkennbar. Nach einer weiteren Minute schwimmen die Zellen lebhaft umher. Kopulationen sind noch nicht zu beobachten. Nach insgesamt 5 min Belichtung sind die Agarzellen also beweglich, aber noch nicht zu kopulationsfähigen Gameten geworden. Auch wenn die Belichtung an diesem Zeitpunkt abgebrochen wird, bleiben die Zellen im beweglichen Zustand, kopulieren aber nicht.

4. Die Determinierungsphase (Phase III)

Kopulationen werden nach 15 min Belichtung gefunden. Jetzt erst hat die eigentliche Determinierung der vegetativen Zelle zu einer ♀ oder ♂ Geschlechtszelle stattgefunden. Nur bei Zwitterkulturen kommt es innerhalb der Zellen eines Klones zu paarweisen Zellverschmelzungen. Bei getrenntgeschlechtlichen Rassen von *Chlamydomonas* sind auch nach einer Belichtung von 15 min keine Kopulationen zu beobachten.

Ebenso wie bei höheren Pflanzen gibt es nämlich bei *Chlamydomonas* zwittrige Formen (monözische) und getrenntgeschlechtliche Formen (diözische). Im ersten Fall enthält jede Zelle 2 Geschlechtsgene, das Gen für die Ausbildung des ♀ und das Gen für die Ausbildung des ♂ Geschlechts⁴⁾. Der Zufall oder Außenbedingungen entscheiden dann, ob eine Zelle ♀ oder ♂ Verhalten annimmt. Eine Zwitterkultur wird also unter Standardbedingungen stets etwa zur Hälfte ♀, zur Hälfte ♂ Gameten haben. Deshalb treten eben die erkennbaren Kopulationen nach 15 min Belichtung auf. Bei Getrenntgeschlechtlichkeit hat jede

Zelle nur 1 Geschlechtsgen, entweder das ♀ oder das ♂. In einer Klonkultur, deren Zellen sich alle von einer einzigen Ausgangszelle ableiten, müssen diese daher immer das Geschlecht der Ausgangszelle haben. Es gibt dann nur ♀ Gameten innerhalb einer Kultur bzw. nur ♂ Gameten. Nach 15 min Belichtung ist deshalb innerhalb eines Klones keine Kopulation wahrnehmbar.

5. Die Kopulationsphase (Phase IV)

Die Determinierung, die sich in der Zeit von der 5. bis zur 15. Minute der Belichtung abspielt, wird erst sichtbar, wenn sich die Zellen zur Kopulation anschicken. Man beobachtet jetzt in einer Zwitterkultur an den lebhaft umherschwimmenden Zellen eine Veränderung: es bilden sich Gruppen von 3–4 Zellen, deren Zahl zusehends größer wird, bis 100 und mehr Zellen in dichten

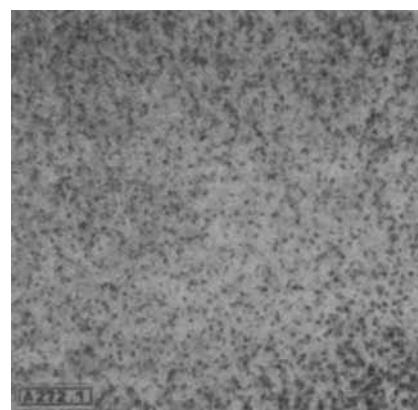


Bild 1
Regellos umherschwimmende *Chlamydomonas*-Zellen in der Determinierungsphase (Phase III)

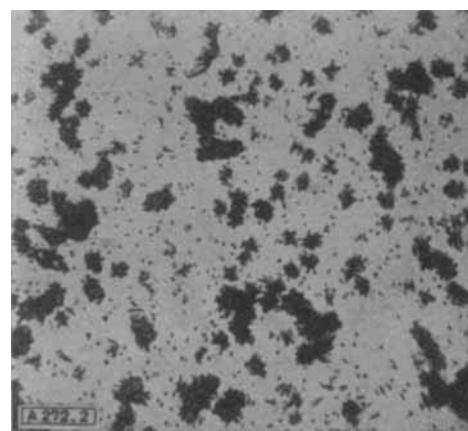


Bild 2
Gruppenbildung der *Chlamydomonas*-Gameten in der Kopulationsphase (Phase IV)

Klumpen beisammen sind (Bild 1 und 2). Es läßt sich beobachten, daß in diesen Ansammlungen die Zellen paarweise verschmelzen (Bild 3). Die gleiche Erscheinung der Gruppenbildung zeigt sich bei Kombination von ♀ und ♂ Gameten getrenntgeschlechtlicher, 15 min lang belichteter Kulturen. Die Gruppenbildung tritt mit der Schnelligkeit einer chemischen Reaktion ein. Dieses Verhalten geschlechtsverschiedener Gameten bei der Kombination hat es möglich gemacht, sehr große Zahlen von Kulturen in kürzester Zeit und eindeutig daraufhin zu prüfen, ob der Sexualakt zustande kommt oder nicht. Das ist der fundamentale Test der gesamten *Chlamydomonas*-Forschung. Zu seiner Ausführung werden jeweils nur wenig Zellen benötigt. Das bedeutet aber, daß bereits 2–3 Wochen alte Klonkulturen auf ihr geschlechtliches Verhalten geprüft werden können. Solche Kulturen sind auf der Agaroberfläche grüne Flecken von 3–5 mm Durchmesser. Auf einer einzigen Petrischale von 9 cm Durchmesser können bis zu 200 Klone – sauber getrennt – gleichzeitig

¹⁾ F. Moewus, Z. Sexualforsch. 1, 17 [1950], Ergbn. d. Enzymforsch. 12 (im Druck).

²⁾ F. Moewus, Arch. Protistenkunde 80, 469 [1933].

³⁾ Anmerk. b. d. Korr.: Auch bei anderen *Chlamydomonas*-Arten ist die Lichtabhängigkeit des Kopulationsprozesses festgestellt worden (G. M. Smith, Abstracts VIII. Internat. Bot. Congress Stockholm 1950).

⁴⁾ F. Moewus, Biolog. Zbl. 58, 516 [1938].

kultiviert werden (Bild 4). Auf diese Weise können allein auf einer Etage des beleuchteten Kulturschranks („künstliche Sonne“, Bild 5) 56 Petrischalen untergebracht werden! Das bedeutet eine ungeheure Raum- und Zeittersparnis.

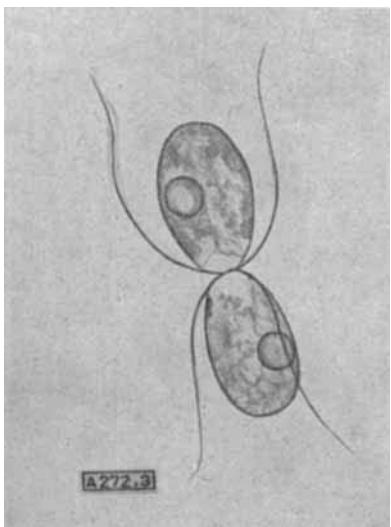


Bild 3. Ein Kopulationspaar von *Chlamydomonas eugametos*

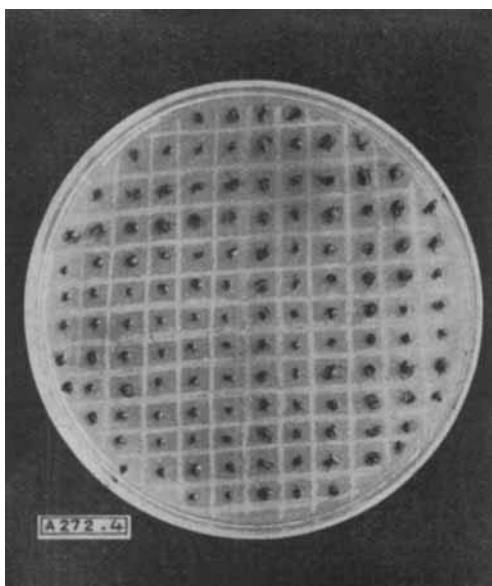


Bild 4. Eine Petrischale mit 128 Klonkulturen



Bild 5
Teil einer „künstlichen Sonne“ mit Petrischalen und Erlenmeyerkolben

6. Die Folgephasen

Haben sich die Gameten gefunden, so schwimmt die entstandene, 4-geißige Planozygote noch eine Zeitlang umher (Planozygotenphase). Erst wenn sie sich zur Ruhe gesetzt hat, fusionieren endlich die Zellkerne (Verschmelzungsphase). Jetzt wird eine derbe, warzige Membran ausgeschieden, welche die Zygote umhüllt. Die Zygote ist als eine Ruhezelle anzusehen, was in ihrer höheren Resistenz gegen Temperatureinflüsse, Trockenheit usw. zum Ausdruck kommt (Ruhephase). Unter geeigneten Bedingungen tritt die Keimung ein. Bei der Aufteilung in 4 Keimzellen wird die Zahl der Chromosomen, die bei der Befruchtung sich verdoppelt hatte, auf die einfache Zahl reduziert. Mit dem Freiwerden dieser 4 Keimzellen beginnt wieder die vegetative Phase; der Entwicklungscyclus ist somit geschlossen. Sein Ablauf dauert 3-4 Wochen, ist aber von Rasse zu Rasse – je nach der Länge der Zygotenuhephase – verschieden. Der hier beschriebene Fall ist bei der Rasse *Chlamydomonas eugametos f. phlegmatika* verwirklicht. Bei dieser laufen alle Vorgänge des Sexualaktes gewissermaßen im Zeitlupentempo ab, so daß es mit Hilfe dieser Rasse überhaupt erst möglich war, die einzelnen Phasen zu unterscheiden. So klar treten diese bei anderen Rassen nicht zutage. Dort können einzelne Phasen sehr kurz sein oder ganz zusammenfallen¹⁾.

III. Nachweis der in den einzelnen Phasen gebildeten Wirkstoffe

Von den beschriebenen Phasen des Entwicklungsganges sind diejenigen, welche den Sexualakt herbeiführen, besonders untersucht worden. Je nachdem, zu welchem Zeitpunkt man die Belichtung abstoppt, kann auch der Vorgang an bestimmter Stelle abgebrochen werden. Aus Kulturen, die in wäßriger Suspension 3, 5, 10 oder 15 min dem Licht ausgesetzt werden, lassen sich zellfreie Filtrate oder Zentrifugate erhalten. Nimmt man an, daß die Zellen in jeder Phase einen bestimmten Wirkstoff bilden, so müßte sich dieser in dem wäßrigen Medium nachweisen lassen. Als Testzellen können geißellose Zellen verwendet werden, die zwar in Wasser übertragen worden waren, die aber kein Licht erhalten haben. In ihnen kann noch keinerlei Wirkstoff vorhanden sein. Jede Veränderung, die ein Filtrat an ihnen – wiederum im Dunkeln! – hervorruft, muß zwangsläufig auf einen Wirkstoff zurückzuführen sein, der im Filtrat enthalten ist. Die Proben, die im Dunkeln entnommen werden, zeigen nun tatsächlich an, daß im 3-Minuten-Filtrat an den Dunkelzellen Geißeln entstanden sind! In gleicher Weise läßt sich im Filtrat der II. Phase an Dunkelzellen Beweglichkeit nachweisen. Hier muß also außer dem Geißelwuchsstoff noch ein Beweglichkeitsstoff im Filtrat vorhanden sein⁴⁾.

Als Testzellen für die Determinierungsprozesse, die sich in der Phase III vollziehen, dienen Zwittekulturen. Die Filtrate werden aus ♀ und aus ♂ Kulturen der Phase III hergestellt. In wäßrigen Suspensionen von Zwittekulturen finden – wie zu erwarten – im Dunkeln keine Kopulationen statt. Werden die Zwittekellen in ♀ oder ♂ Filtraten suspendiert, so sind ebenfalls im Dunkeln keine Kopulationen wahrzunehmen. Während in den wäßrigen Suspensionen bei erneuter Belichtung sofort Kopulationen einsetzen, unterbleibt auch bei Lichtzutritt in filtratbehandelten Zwittekellen jede Kopulation. Die Zellen schwimmen zwar umher, ohne Paare oder Gruppen zu bilden. Gibt man diese Zellen jedoch mit Gameten aus einer getrenntgeschlechtlichen ♀ oder ♂ Kultur zusammen, so zeigt es sich, daß durch die Filtratbehandlung doch die Determinierung stattgefunden hat: Alle Zwittekellen sind im ♀ Filtrat zu ♀ Gameten geworden, sie kopulieren mit den Gameten aus der ♂ Kultur. Alle Zwittekellen sind im ♂ Filtrat zu ♂ Gameten geworden, welche mit den Gameten der ♀ Kultur kopulieren. In den Filtraten sind somit ♀ bzw. ♂ Determinierungsstoffe oder Terrene enthalten und nachgewiesen⁵⁾. Der ♀ bestimmende Stoff wird Gynoteron, der ♂ bestimmende Stoff Androtermon genannt.

Auch in der Kopulationsphase können Wirkstoffe nachgewiesen werden. Von 15 min lang belichteten ♀ und ♂ Kulturen werden Filtrate hergestellt. In dem ♀ Filtrat werden

¹⁾ F. Moewus, Naturwiss. 31, 420 [1943].

²⁾ F. Moewus, Biolog. Zbl. 60, 143 [1940].

Agarzellen der ♀ Kultur, in dem ♂ Filtrat Agarzellen der ♂ Kultur suspendiert. Im Dunkeln werden die Zellen begeißelt und beweglich. Kopulationen treten natürlich nicht auf, weil es sich ja um Zellen aus getrenntgeschlechtlichen Kulturen handelt. Nach einer Filtratbehandlung von 30 min gibt man die beiden Zellsorten im Dunkeln zusammen. Entnimmt man kurz darauf eine Probe, so beobachtet man zahlreiche Kopulationspaare. Der Sexualakt ist also völlig im Dunkeln, nur durch die in den Filtraten enthaltenen Wirkstoffe zustande gekommen! Die Kopulationsstoffe²⁾ sind geschlechtsspezifisch: ♀ Agarzellen werden in einem ♂ Filtrat der Phase IV nicht kopulationsfähig, sondern nur begeißelt und beweglich. Dasselbe gilt für ♂ Agarzellen in einem ♀ Filtrat. Der ♀ Kopulationsstoff wird als Gynogamon, der ♂ als Androgamon bezeichnet⁶⁾ (Gamon = Gametenhormon). Damit sind für alle 4 Phasen spezifische Wirkstoffe nachgewiesen worden. Die Wirkstoffe der Folgephasen sind bisher nicht untersucht worden.

IV. Ersetzen der Wirkstoffe durch chemisch bekannte Verbindungen

Für die chemische Isolierung der in den Filtraten nachgewiesenen Wirkstoffe waren zunächst nur 2 Anhaltspunkte gegeben: 1) Die auffallend starke Photolabilität der Gamone war bereits 1933 erkannt worden. 2) 1934 wurde festgestellt, daß Carotin-Mutterlaugen aus Mohrrüben Spuren von Stoffen enthielten, die den Sexualakt bei vegetativen Dunkelzellen herbeiführten⁸⁾. Es lag nahe, die Wirkstoffe in der Gruppe der Carotinoide bzw. deren Derivate zu suchen. Bei Richard Kuhn standen mir Carotinoide zur Verfügung, die daraufhin geprüft wurden, ob sie einen Einfluß auf die Sexualität von *Chlamydomonas* hatten. Der Test bestand darin, daß die Testzellen statt in Filtrate nun in wäßrige Lösungen dieser wohldefinierten Verbindungen gebracht wurden, deren Konzentration abgestuft wurde, so daß zugleich die Wirksamkeitsgrenze bestimmt werden konnte. Es ergab sich, daß nur ein einziges der geprüften Carotinoide Geißelwuchsstoff-Wirkung besaß, nämlich Crocin, der Digentiobiosester des Crocetins. D. h. nur durch eine Crocin-Lösung ließ sich die Wirkung des Filtrates der Phase I ersetzen⁷⁾. In Tabelle 1 ist die Wirksamkeitsgrenze angegeben und die Zahl der Crocin-Moleküle, die erforderlich sind, um unter Standardbedingungen⁸⁾ eine Zelle zur Geißelbildung zu veranlassen. Crocin ist nicht nur hoch wirksam, sondern auch hoch spezifisch. Crocetin und Crocetin-dimethylester haben keinen Einfluß auf das Geißelwachstum.

Von gyno- und androgamon-haltigen Filtraten der Phase IV war bereits bekannt, daß sie bei längerer Bestrahlung mit Licht der Wellenlängen 435,8 und 496,1 μ inaktiv werden. Weiter zeigte sich, daß gynogamonhaltige Filtrate bei 50 min Bestrahlung plötzlich Androgamon-Wirkung erhalten, welche jedoch nur von kurzer Dauer ist. Aus diesem Verhalten konnte geschlossen werden, daß Gyno- und Androgamon in einer bestimmten chemischen Beziehung zueinander stehen müssen. In dem photolabilen cis-Crocetin-dimethylester und seiner stabileren trans-Form standen 2 Verbindungen zur Verfügung, die ähnliche Eigenschaften hatten wie die Filtrate^{9a)}. Es zeigte sich, daß sowohl die reine cis-Form als auch die reine trans-Form keinen Einfluß auf die Kopulation haben. Nun wurde eine wäßrige Lösung von cis-Crocetindimethylester bestrahlt, so daß in dieser in steigendem Maße trans-Ester entstand, bis zuletzt nur noch dieser vorhanden war. Aus dieser sich ständig ändernden Lösung wurden in kurzen Zeitabständen Proben entnommen. Zu einem bestimmten Zeitpunkt (25 min) besaß sie Gynogamon-Wirkung, während sie nach insgesamt 75 min Bestrahlung Androgamon-Wirkung aufwies. Daraus war zu schließen, daß sich die Gamone aus ganz bestimmten Gemischen von cis- und trans-Crocetindimethylester ersetzen lassen sollten. Das war tatsächlich der Fall: eine 3:1-Mischung von cis- und trans-Ester hatte Gynogamon-Wirkung, eine 1:3-Mischung Androgamon-Wirkung^{6, 7)} (bei der Rasse *f. simplex*). Jetzt wird auch verständlich, warum das natürliche gynogamon-haltige Filtrat bei Bestrahlung plötzlich

Androgamon-Charakter erhält und warum es schließlich unwirksam wird. Auch hier hat das Licht die Umsetzung bis zur inaktiven trans-Form bewerkstelligt. Bei den verschiedenen Rassen von *Chlamydomonas* sind die wirksamen Mischungen von cis- und trans-Crocetin-dimethylester nicht immer 3:1 bzw. 1:3. Es wurden 2:1- bzw. 1:2-Verhältnisse gefunden, ebenso 6:1 bzw. 1:6⁹). Die Spezifität dieser Wirkstoffe kommt darin zum Ausdruck, daß sich in den Testlösungen der trans-Crocetin-dimethylester z. B. nicht durch den trans-Crocetin-diäthylester ersetzen läßt. Außerdem liegt wieder die hohe Wirksamkeit vor (Tabelle 1).

Wirkstoff	Wirksamkeitsgrenze	Zahl der Wirkstoff-Moleküle je Zelle
Crocin	1: 25 000 000 000	10000 (Algen)
Crocetin-dimethylester ..	1: 33 000 000 000	10000 (Algen)
Rutin	1: 10 000 000 000	50000 (Algen)
Isorhamnetin	1: 10 000 000 000	100000 (Algen)
4-Oxy- β -cyclocitral	1: 20 000 000 000	100000 (Algen)
Safranal	1: 2 000 000 000	1000000 (Algen)
Biotin	1: 400 000 000 000	100000 (Hefen)
Aneurin	1: 200 000 000	2000000 (Phycomyc.)
Heteroauxin	1: 10 000 000 000 000	10000 (Wurzeln)

Tabelle 1

Die Wirksamkeitsgrenzen der Sexualstoffe von *Chlamydomonas eugametos* und einiger Wirkstoffe bei anderen Organismen

Die bisher gefundenen Wirkstoffe Crocin sowie cis- und trans-Crocetin-dimethylester sind aus Safran (*Crocus*-Narben) isoliert worden. Im Safran ist auch Pikrococin enthalten, aus dem leicht sein Aglukan, Safranal, hervorgeht. Diese beiden vermöchten die Wirkung termon-haltiger Filtrate zu ersetzen, und zwar Pikrococin ♀ determinierend, Safranal ♂ determinierend^{5, 10)}. Es fiel die verhältnismäßig geringe Wirksamkeit des Pikrococins auf; Safranal war 1000 mal wirksamer. Als später 4-Oxy- β -cyclocitral¹¹⁾ zur Verfügung stand, zeigte es sich, daß dieses Aglukan 10 mal wirksamer als Safranal war (Tabelle 1). Bemerkenswert war seine Spezifität: Citral, α - und β -Cyclocitral hatten keine Termonwirkung. Eine weitere Klärung wurde erzielt, als *Crocus*-Pollen chemisch aufgearbeitet wurde. Zunächst wurde ein Flavonolglykosid isoliert¹²⁾ (Quercetin-3'-methyl-äther-diglukosid-3,4'). Dieses übt zwar auf den Ablauf des Sexualaktes bei *Chlamydomonas* keine Wirkung aus. Jedoch veranlaßt es bewegliche Zellen zum Abwerfen ihrer Geißeln¹³⁾. Das Aglukan dieser Verbindung, das Isorhamnetin, stellte sich als hochwirksames Gynotermomon heraus (Tabelle 1). Da mir 45 verschiedene Flavonole zum Austesten zur Verfügung standen, konnte die äußerst auffallende Spezifität des Isorhamnetins bewiesen werden¹⁴⁾. Der 7,3'-Methyläther des Quercetins ist z. B. wirkungslos. Es mußte jetzt vermutet werden, daß nicht Pikrococin, sondern Isorhamnetin das natürliche Gynotermomon von *Chlamydomonas* ist. Für die nachgewiesene Wirkung des Pikrococin-Präparates könnte als Erklärung dienen, daß die damals aufgearbeiteten *Crocus*-Narben mit Pollen besetzt waren, wie eine mikroskopische Prüfung auch bestätigte. Vielleicht war die Gynotermomon-Wirkung des Pikrococins also nur vorgetäuscht.

Bei der Austestung der Anthocyan-Fraktion einer Aufarbeitung von Sanddornbeeren¹⁵⁾ ergab sich überraschenderweise, daß sie auf Zwitterzellen ♂ determinierend wirkte. Daraufhin wurden verschiedene bekannte Anthocyane und Anthocyanidine in ihrer Wirkung auf Zwitterzellen untersucht. Dabei wurde gefunden, daß nur das Päonin die Wirkung der Anthocyan-Fraktion von Sanddornbeeren ersetzen konnte. Da auch hier eine ausgesprochene Spezifität und starke Wirksamkeit vorliegt – die von der gleichen Größenordnung wie die des Isorhamnetins und 4-Oxy- β -cyclocitral ist –, so kann wohl mit Recht geschlossen werden, daß das Päonin ein von den Algen gebildeter ♂ determinierender Stoff ist. Das 4-Oxy- β -cyclocitral wird als Androtermon I, Päonin als Androtermon II bezeichnet.

⁶⁾ F. Moewus, Biolog. Zbl. 59, 40 [1939], Arch. Protistenkunde 92, 485 [1939]. R. Kuhn, F. Moewus, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 559 [1940].

⁷⁾ R. Kuhn, F. Moewus, G. Wendt, Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 1702 [1939].

⁸⁾ R. Kuhn, I. Löw, ebenda 74, 219 [1941].

^{9a)} Dieselben, ebenda 77, 196 [1944].

^{9b)} R. Kuhn, I. Löw, F. Moewus, Naturwiss. 30, 373, 407 [1942].

¹⁰⁾ R. Kuhn, F. Moewus, I. Löw, Ber. dtsch. chem. Ges. 77, 219 [1944].

¹¹⁾ H. J. Bielig, Fiat Review, Biochemistry I, 67 [1947], Ber. dtsch. chem. Ges. 77, 748 [1944].

V. Mutationsversuche zur Anreicherung der Wirkstoffe

1. Chemische Aufarbeitung von Filtraten

Das Ziel war nun, die natürlichen Wirkstoffe, die in den Zellen bzw. den zellfreien Filtraten vorhanden sind, chemisch zu isolieren. In einem Versuch wurden 117 l Filtrat der Phase II (Beweglichkeitsphase) auf wenige cm³ eingeengt, wobei eine orangefarbene Flüssigkeit erhalten wurde. Nach Umesterung mit Methanol konnten die Absorptionsbanden bestimmt werden¹⁶). Sie erwiesen sich als identisch mit denjenigen des trans-Crocetindimethylesters. Zur Isolierung dieses Farbstoffes wären über 1000 l Filtrat nötig gewesen. Eine solche Aufarbeitung war jedoch unmöglich, schon deshalb, weil diese Carotinoide in wäßrigen Lösungen nicht lange beständig sind. Es mußte also ein anderer Weg beschritten werden, um die Wirkstoffe fassen zu können.

2. Mikrobiologische Vorversuche

Kuhn und Winterstein¹⁶) vermuteten, daß die Carotinoide des Safrans sich von einem Protocrocetin (Protocrocin) ableiten. Durch Zerfall könnte einmal Crocin entstehen und aus diesem durch Umesterung Crocetin-dimethylester. Ferner könnte Pikrocrocin entstehen und daraus das Aglukon. Durch mikrobiologische Versuche ließ sich diese Vermutung bestätigen. Wurden Zellextrakte von ♂ *Chlamydomonas*-Zellen einer wäßr. Pikrocrocin-Lösung zugefügt, so ließ sich in dieser nach einiger Zeit das Aglukon (4-Oxy-β-cyclocitral) nachweisen¹⁷). Durch enzymatische Vorgänge war Androtermon entstanden! Ferner konnte gezeigt werden, daß aus Crocetin in Gegenwart von Zellbrei und d-Glukose der Geißelwuchsstoff, d. h. Crocin, enzymatisch entsteht. Wird Crocin als Substrat geboten, dann geht aus diesem enzymatisch cis- und trans-Crocetindimethylester hervor. Auf diese Weise gelang es, Einblicke in die enzymatischen Prozesse zu gewinnen, welche in der Zelle ablaufen und zur Entstehung der einzelnen Wirkstoffe führen.

3. Gen-abhängige Fermentprozesse

Man weiß also jetzt, daß die Sexualstoffe durch Fermente aus einer hypothetischen Vorstufe entstehen. Andererseits weiß man aus den Filtratversuchen, daß diese Stoffe nur in kleinsten Mengen gebildet werden. Jeder Stoff wird bei seiner Entstehung sofort in die nächste Wirkungsstufe umgewandelt, so daß es zu keiner Anreicherung der Substanzen in den Zellen kommen kann. Es muß also eine Methode gefunden werden, diese gleitenden Prozesse derart abzustoppen, daß sich die Wirkstoffe in den Zellen anreichern können. Eine solche Methode wurde angewandt, indem Mutationsversuche angestellt wurden. Mit Hilfe von Radium- und Röntgenbestrahlung oder mit Temperaturschocks wurden neue Zelltypen geschaffen, die sich durch erbliche Veränderung folgender Eigenschaften auszeichneten:

- 1) Eine Gruppe von Mutanten bildete am Licht keine Geißeln mehr* (Ausfall der Produktion des Geißelwuchsstoffes!). 2 verschiedene Gene konnten hierfür verantwortlich gemacht werden. Das Gen *cro⁰* verhindert die enzymatische Glykosidierung des Crocetins zu Crocin; das Gen *mot⁰* offenbar die Spaltung des Protocrocetins in Pikrocrocin und Crocetin, das zur Crocin-Synthese dann fehlt. Die normalen Zellen haben die Gene *cro⁺* und *mot⁺*¹⁷).
- 2) Bei einer zweiten Gruppe von Mutanten können bewegliche Zellen verschiedenen Geschlechts am Licht nicht mehr koppeln (Ausfall der Gamon-Produktion). Bei ihnen mutierte das Gen *gathe⁺* – welches normalerweise die enzymatische Umesterung des Crocins zum Crocetindimethylester steuert – zu *gathe⁰*.
- 3) Es entstanden aus ♂ Zellen Mutanten, die geschlechtslos waren (Ausfall der Produktion von Androtermon I). Hier ist die enzymatische Spaltung des Pikrococins unterbunden, da das Gen *M⁺* zu *M⁰* mutiert ist.
- 4) Ebenso wurden Mutanten aus ♂ Zellen erhalten, die geschlechtslos waren, bei denen aber die Päonin-Produktion (Androtermon II) verlorengegangen war. Das Gen *pae⁺* war zu *pae⁰* mutiert.

¹⁶) R. Kuhn, A. Winterstein, Ber. dtsh. chem. Ges. 67, 344 [1934].

* Anmerk. b. d. Korr.: Ähnliche Mutanten sind neuerdings auch von R. A. Lewin, an *Chlamydomonas Moewusii* erhalten worden (Abstracts. VIII Internat. Bot. Congress Stockholm 1950).

¹⁷) F. Moewus, Biolog. Zbl. 60, 597; R. Kuhn, F. Moewus, Ber. dtsh. chem. Ges. 73, 547 [1940].

5) Weiterhin traten Mutanten aus ♀ Zellen auf, die keine ♀ Eigenschaften mehr hatten (Ausfall des Gynotermens Isohamnetin). Bei diesen ist das Gen *irha⁺* zu *irha⁰* mutiert.

Die Zellen aller dieser Mutanten erhalten ihr normales Verhalten erst dann, wenn der oder die fehlenden Wirkstoffe zugesetzt werden. So sind z. B. die *cro⁰*-Zellen Crocin-bedürftig, die *gathe⁰*-Zellen benötigen cis- und trans-Crocetindimethylester, die *M⁰*-Zellen 4-Oxy-β-cyclocitral, die *pae⁰*-Zellen Päonin, die *irha⁰*-Zellen Isohamnetin. Sie sind demnach hochempfindliche und ganz spezifische Testobjekte für diese Verbindungen.

Durch die Mutationsversuche ist der stufenweise ablaufende Prozeß der Bildung von verschiedenen Wirkstoffen an allen den Stellen abgebrochen, die jeweils einer der beschriebenen Phasen des Sexualaktes entsprechen. Die Mutanten wurden auf Agar vermehrt und im Filtratversuch geprüft. Diese Filtrate waren bedeutend wirksamer als die Filtrate normaler Zellen der entsprechenden Phasen, d. h. die mutierten Zellen bildeten und sezernierten mehr Wirkstoff. Es muß eine Anreicherung zustande gekommen sein. Das ist jetzt verständlich. Wird doch z. B. der Geißelwuchsstoff Crocin in normalen Zellen nur als intermediäres Produkt in kleinen Mengen gebildet, wie er zur Umesterung in Gamon gebraucht wird. Wenn aber eine mutierte *gathe⁰*-Zelle diese Umesterung nicht mehr zu vollziehen vermag, so wird sich in ihr Geißelwuchsstoff anhäufen. Zur chemischen Isolierung des Crocins war der *gathe⁰*-Stamm noch nicht geeignet, da er außer Crocin noch die Termone enthielt. Er mußte nochmals mutationsauslösenden Eingriffen unterworfen werden, um solche Mutanten zu erhalten, die auch keine Termone mehr bildeten. Diese sekundären Mutanten zeichneten sich dadurch aus, daß sie den Geißelwuchsstoff in noch größeren Mengen bildeten und sezernierten (Filtrat-Test). Der Nachweis, daß diese physiologischen Veränderungen der Zellen tatsächlich erblich sind, mußte für alle erzielten Mutanten durch Kreuzungen erbracht werden. So ist es verständlich, daß diese genetischen Analysen mehrere Jahre in Anspruch nahmen.

In ähnlichen, langwierigen Experimenten wurden ♀ und ♂ Mutanten gezüchtet und vermehrt, die Gynotemon (Isohamnetin) und Androtermon II (Päonin) in großen Mengen anreichten. Diese Zellen werden im Licht nicht beweglich. Das bedeutet aber, daß sie bereits den ersten Schritt – und damit natürlich auch die folgenden! – der Protocrocetin-Spaltung nicht mehr vollziehen können. Das gesamte Carotinoid-System ist hier also abgestoppt, nicht aber die Entstehung der Flavonole und Anthocyane. Es ist eine reinliche Trennung der Farbstoffklassen durch die biologische Vorarbeit geschaffen.

Wir können also sagen, daß von jedem erwähnten Gen ein enzymatischer Prozeß gesteuert wird, durch den aus einer Vorstufe der Wirkstoff gebildet wird. Ist das Gen mutiert, dann ist dadurch gleichzeitig das Ferment inaktiviert. Der Wirkstoff kann nicht entstehen. Dafür reichert sich in den Zellen die Vorstufe an. Die betreffenden mutierten Zellen zeigen erst ihr normales Verhalten, wenn der Wirkstoff von außen zugesetzt wird. Das sind im Prinzip die Grundtatsachen der „biochemischen Genetik“.

VI. Die chemische Isolierung der Sexualstoffe

Erst als die physiologischen und genetischen Befunde über die Wirkungsweise und Entstehung der *Chlamydomonas*-Sexualstoffe auf diese Weise gesichert waren, wurde mit der chemischen Isolierung begonnen. Um Crocin zu erhalten, wurde die Mutante No. 5 auf ca. 900 Petrischalen in Schichtkulturen vermehrt. Die „Ernte“ einer ergrünten Agarplatte betrug 10 mg getrocknete Zellen. Es wurden 8,5 g Trockenalgen zur Aufarbeitung übergeben. Es konnte daraus dann tatsächlich der Geißelwuchsstoff nach Umesterung als trans-Crocetindimethylester isoliert werden¹⁸) (Ausbeute 40 mg, d. h. 0,5% vom Trockengewicht der Algen). Ebenso wurde als Gynotemon Isohamnetin isoliert und eindeutig identifiziert (aus 5 g getrockneten Zellen 70 mg, d. h. 1,4% des Trockengewichts). Weiter wurde Päonin isoliert¹⁹) und als Androtermon II bestätigt (17 g getrocknete Zellen, Ausbeute 0,3%). Der Beweglichkeitsstoff ist noch nicht

¹⁸) R. Kuhn, I. Löw, Chem. Ber. 81, 363 [1948].

¹⁹) R. Kuhn, I. Löw, ebenda 82, 481 [1949].

isoliert worden, da noch keine Mutanten vorhanden sind, aus denen ein Anhaltspunkt für seine Entstehung gewonnen werden könnte. Auch bei den Gamonen fehlt es bisher noch an Mutanten, die die Stoffe so weit anreichern, daß an eine Isolierung derselben gegangen werden könnte. Für das Androtermon I liegen zur Zeit ebenfalls noch keine brauchbaren Mutanten vor.

VII. Der Sterilitätsstoff Rutin

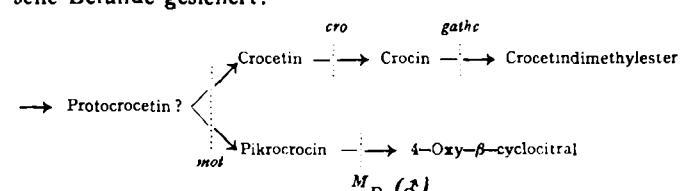
1935 wurde in einer portugiesischen Erdprobe eine *Chlamydomonas* gefunden, die sich von der normalen *Chlamydomonas eugametos* durch ein merkwürdiges Verhalten unterschied: Am Licht wurden in wäßrigen Suspensionen zwar bewegliche Zellen erhalten, aber niemals konnten Kopulationen beobachtet werden²⁰⁾. Auch mit normalen *eugametos*-Gameten geht diese Rasse keine Kopulationen ein. Sie ist offenbar steril. Die Rasse wurde als *agametos* bezeichnet und in Kultur genommen. Filtrate von belichteten Suspensionen beweglicher *agametos*-Zellen bewirken, daß zugesetzte, normale, kopulationsfähige *eugametos*-Gameten ebenfalls steril werden. Sie verlieren durch diese Behandlung ihr Kopulationsvermögen! Es muß also in den Filtraten ein Sterilitätsstoff enthalten sein, den die *agametos*-Zellen ausgeschieden haben.

Bei der Austestung der bereits erwähnten 45 Flavonole auf Termon-Wirkung war seinerzeit eine Substanz aufgefallen. Es war das Rutin. Dieses übte auf normale *eugametos*-Gameten dieselbe Wirkung aus wie das Filtrat mit dem unbekannten Sterilitätsstoff¹⁴⁾. Noch in einer Verdünnung von 1:10 Milliarden führte es zur Sterilität (Tabelle 1). Durch abgestufte Verdünnungen der natürlichen Filtrate ließ sich zeigen, daß die Zellen den Sterilitätsstoff nur in geringen Mengen bilden. Es mußte deshalb wieder nach Mutanten dieser Rasse gesucht werden, die bessere Voraussetzungen für die chemische Isolierung boten. Eine solche wurde schließlich auch gefunden. Sie besaß weder die Fähigkeit, die Carotinoid-Wirkstoffe (Geißelwuchsstoff, Gamon, Androtermon I) zu synthetisieren noch das Vermögen zur Termonbildung (Isorhamnetin bzw. Päonin). Infoigedessen muß sie dauernd im vegetativen Zustand bleiben. Der Sterilitätsstoff wird von den Zellen jedoch in sehr großen Mengen ausgeschieden, wie mit Filtratverdünnungen nachgewiesen wurde. Wenn es sich beweisen ließe, daß dieser mit Rutin identisch ist, dann hätte man den ersten pflanzlichen Sterilitätsstoff gefunden. Die Mutante wurde auf Agar vermehrt und 9,7 g getrocknete Zellen erhalten, die zur Aufarbeitung übergeben wurden. Als maximale Ausbeute wurden 7-8% des Trockengewichts Rutin isoliert²¹⁾. Rutin ist demnach der Sterilitätsstoff der Rasse *Chlamydomonas agametos*.

Eine von dieser „vegetativen“ Mutante abermals mutierte Form, also eine sekundäre Mutante, schien das Vermögen der Rutinbildung nicht zu besitzen. Wenigstens wirkten ihre Filtrate nicht sterilisierend. Es wurde vermutet, daß ihr das Gen bzw. das Ferment fehlt, welches für die Rutinsynthese aus einer unbekannten Vorstufe verantwortlich ist. Die chemische Aufarbeitung von 5 g Trockenalgen dieser Form brachte das Ergebnis, daß sie 100 mg Quercetin (Ausbeute 2%) enthielten¹⁹⁾. Damit ist sichergestellt, daß Quercetin tatsächlich die Vorstufe des Rutins ist.

VIII. Übersicht über die Sexualstoffe von *Chlamydomonas*

Tabelle 2 gibt den heutigen Stand der Kenntnisse von den *Chlamydomonas*-Sexualstoffen wieder. Die noch bestehenden Lücken können erst dann ausgefüllt werden, wenn brauchbare Mutanten gefunden sind, die die chemische Isolierung der Stoffe ermöglichen. Folgendes Schema, das den Ablauf der chemischen Reaktionen, wie sie in der lebenden Zelle vor sich gehen mögen, wiedergibt, ist durch genetische, physiologische und biochemische Befunde gesichert:



²⁰⁾ F. Moewus, Naturwiss. 34, 282 [1947].

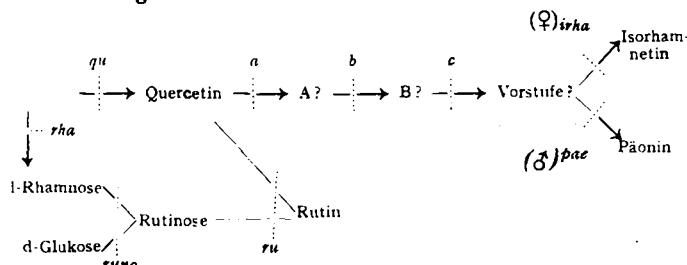
²¹⁾ R. Kuhn, I. Löw, ebenda 34, 283 [1947].

Wirkstoffe für:	ersetzbar durch:	Aus <i>Chlamydomonas</i> -Zellen isoliert
1. Geißelwachstum	Crocin	Nach Umesterung als trans-Crocetindimethylester
2. Beweglichkeit der Geißeln		
3. Kopulation der Gameten (Gamon)	cis- und trans-Crocetindimethylester	
4. Geschlechtsbestimmung bei Zwittern (Termons)		
Gynotermom	Isorhamnetin	Isorhamnetin
Androtermon I	4-Oxy-β-cyclocitral	
Androtermon II	Päonin	Päonin
5. Verhinderung der Kopulation (Sterilität)	Rutin	Rutin
6. Vorstufe von 5	Quercetin	Quercetin

Tabelle 2. Die Sexualstoffe von *Chlamydomonas eugametos*

Jeder Schritt ist durch ein Gen gesteuert (*mot*, *cro*, *gathe*, *MD*). Den Abbau bzw. Aufbau des für jede Phase des Sexualaktes benötigten Wirkstoffes besorgt ein Gen-abhängiges Ferment.

Auch für die Flavonol-Synthese kann ein ähnliches Schema aufgestellt werden:



Es liegen verschiedene Anhaltspunkte dafür vor, daß Isorhamnetin und Päonin eine gemeinsame Vorstufe haben. Weiter ist bekannt, daß vom Quercetin bis zur Entstehung dieser Vorstufe 3 Gene (*a*, *b*, *c*) den Ablauf dieser Synthese bewerkstelligen. Die Zwischenprodukte sind jedoch wie die Vorstufe unbekannt. Die Termonbildung aus der Vorstufe wird von den Genen *irha* bzw. *pae* gesteuert. Die Bildung von Rutin ist am genauesten untersucht²²⁾. Von der Synthese der 1-Rhamnose an, die sich mit d-Glukose zu Rutinose verbindet, ist gesichert, daß aus Rutinose mit Quercetin schließlich Rutin entsteht. 3 Gene (*rha*, *runo* und *ru*) steuern diese Vorgänge. Von jedem dieser Gene hängt ein spezifisch wirkendes Enzym ab.

Diese Farbstoffe und deren Derivate sind ausschließlich bei *Chlamydomonas eugametos* und den ihr nahe verwandten Arten wirksam. Bereits entfernt verwandte *Chlamydomonas*-Arten oder andere Algen bilden wahrscheinlich andere Stoffe. Daraus erklärt sich auch die große Spezifität dieser Stoffe, wenn sie die Wirkung natürlicher Filtrate ersetzen sollen. Ob die aus den Geschlechtsorganen des *Crocus* (Narben und Pollen) isolierten Farbstoffe auch für den Ablauf des Sexualaktes dieser Pflanze eine Bedeutung haben, ist nicht bekannt.

IX. Flavonole als Sterilitätsstoffe bei einer Blütenpflanze

Sterilitätsphänomene sind im Pflanzenreich keine Seltenheit. Daß die physiologische Ursache dieses Verhaltens in der Bildung eines bestimmten Wirkstoffes zu suchen ist, ist erstmalig bei *Chlamydomonas* erkannt worden. Rutin ist nun aber auch der gelbe Farbstoff der Blüten von *Forsythia*-Sträuchern. Von diesem Frühjahrsblüher ist bereits seit 1894 bekannt, daß er eine besondere Art der Sterilität besitzt. Gesunder Pollen keimt nicht auf der normalen Narbe einer Zwitterblüte aus. Auch bei Übertragung des Pollens auf Narben anderer Blüten des gleichen Strauches kommt es nicht zu Samenansatz, d. h. *Forsythia* ist selbststeril. Von *Forsythia* gibt es innerhalb einer Art stets 2 Typen von Sträuchern. Bei einem Typ überragt in den Blüten der Griffel die kurzgestielten Staubbeutel (= Langgriffel-Blüten). Bei dem anderen Typ überragen die langgestielten Staubbeutel den kurzen Griffel (= Kurzgriffel-Blüten). Diese morphologische Verschiedenheit des Blütenbaues wird Heterostylie genannt.

²²⁾ F. Moewus, Portug. Acta Biol. p. 161 [1949]; Z. Naturforsch. (im Druck); R. Kuhn, diese Ztschr. 61, 1 [1949].

Das Sterilitätsverhalten von *Forsythia* besteht nun darin, daß alle Kurzgriffel-Blüten untereinander steril sind. Das gleiche gilt von allen Langgriffel-Blüten. Samen werden nur gebildet, wenn eine Kreuzung von Langgriffel-Blüten \times Kurzgriffel-Blüten zustande kommt. Es gelang, die physiologischen Ursachen aufzuklären^{23).}

- 1) Der gelb gefärbte reife Pollen von L- und K-Blüten keimt in 30proz. Rohrzuckerlösung, wenn 0,1% Borsäure zugesetzt wird. Der weiße unreife Pollen (aus Knospen) von L- und K-Blüten keimt dagegen ohne Borsäure-Zusatz. Reifer und unreifer Pollen sind also nicht nur in der Farbe, sondern auch physiologisch verschieden.
- 2) Verwendet man für Selbstbestäubungen unreifen Pollen, dann werden Samen gebildet.
- 3) Wässrige Extrakte aus zerriebenen, reifen Pollen verhindern unreifen Pollen am Auskeimen. Im reifen Pollen müssen also Hemmstoffe enthalten sein. Unreifer Pollen enthält diese Hemmstoffe nicht.
- 4) Im eigenen, wässrigen Narbenextrakt keimt reifer Pollen nicht aus. Dagegen ist reifer Pollen zur Keimung zu bringen, wenn man ihn in den Narbenextrakt des anderen Blütentyps bringt. Durch die fremden Narbenextrakte werden offenbar die Hemmstoffe des Pollens enzymatisch inaktiviert.

In den oben beschriebenen *Chlamydomonas*-Mutanten standen Testzellen zur Verfügung, die auf kleinste Mengen bestimmter Flavonole in ganz bestimmter Weise reagieren. Durch diese mikrobiologische Methode konnte nachgewiesen werden, daß die Pollenkörper Flavonole enthalten. Extrakte aus unreifen Pollen von L- und K-Blüten enthalten Quercetin, wie mit *qu⁰*-Mutanten (vgl. Übersicht S. 501) festgestellt werden konnte. In Extraktten von reifen Pollen von K-Blüten verlieren normale *Chlamydomonas*-Gameten ihr Kopulationsvermögen. Der Pollen enthält demnach Rutin. Der Hemmstoff des Pollens von L-Blüten hat dagegen keine Wirkung auf irgendeine der bisher bekannten *Chlamydomonas*-Mutanten. Weiter wurde gefunden, daß durch die Einwirkung von Narbenextrakten des fremden Blütentyps auf zerriebenen K-Pollen und auf zerriebenen L-Pollen in beiden Fällen Quercetin enzymatisch entsteht. (Nachweis durch *qu⁰*-Mutante). Es muß also auch der Pollen von L-Blüten ein Quercetin-Derivat enthalten. Nur ist es nicht mit Rutin identisch.

²³⁾ F. Moewus, Biolog. Zbl. 69, 181 [1950]; R. Kuhn, I. Löw, Chem. Ber. 82, 474 [1949].

Daraufhin wurden Keimversuche mit unreifen Pollen in Lösungen von verschiedenen Flavonolen angestellt. Es ergab sich, daß von 14 geprüften Flavonolen nur 2 die Keimung unterdrücken: Rutin und Quercitrin. Mit großer Sicherheit war daraus zu schließen, daß der Hemmstoff der K-Pollenkörper Rutin, der Hemmstoff der L-Pollenkörper Quercitrin ist. Bei der chemischen Aufarbeitung wurden aus 3,8 g Pollen von K-Blüten 400 mg Rutin isoliert. Aus 4,2 g Pollen von L-Blüten wurden 370 mg Quercitrin gewonnen^{23).}

Damit ist die Selbststerilität von *Forsythia* physiologisch und biochemisch aufgeklärt: Kurzgriffel-Blüten haben Rutin-haltigen Pollen und in den Narben ein Quercitrin-spaltendes Ferment. Bei Selbstbestäubung unterbleibt die Pollenkeimung, weil Hemmstoff und Ferment nicht zueinander passen. Langgriffel-Blüten haben Quercitrin-haltigen Pollen und in den Narben ein Rutin-spaltendes Ferment. Wieder passen Hemmstoff und inaktivierendes Ferment nicht zueinander. Nur bei den Kreuzbestäubungen (Bild 6) werden die Hemmstoffe, Rutin bzw.

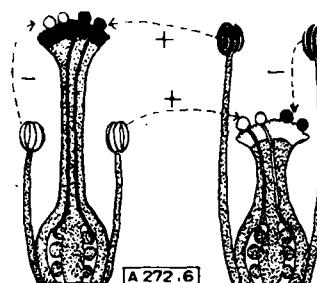


Bild 6. Die Befruchtungsverhältnisse bei *Forsythia intermedia*

Quercitrin, durch die dazugehörigen Fermente inaktiviert. Jetzt können die Pollenkörper auskeimen und die Eizellen befruchten. Unreifer Pollen ist deshalb nicht gehemmt in seiner Keimung, weil er die Vorstufe der beiden Hemmstoffe, nämlich Quercetin, enthält. Die Hemmstoffe werden erst während des Aufblühens synthetisiert. Im Keimversuch, der unter 1) beschrieben ist, hat die Borsäure die Rolle der inaktivierenden Fermente übernommen.

Damit konnte der erste Fall von Selbststerilität aufgeklärt werden. Wieder sind es Farbstoffe und Fermente, die hier regulierend eingreifen. Es ist bekannt, daß die Selbststerilität durch Gene bedingt ist. Die genetische Seite des Problems ist bei vielen selbststerilen Pflanzen (Roggen, Stein- und Kernobst, Klee, Löwenmäulchen, Petunien) bereits eingehend untersucht worden. Es ist anzunehmen, daß auch bei diesen Pflanzen derartige biochemische Prozesse ablaufen, wie sie bei *Forsythia* gefunden wurden. Den Farbstoffen, die überall in den Sexualorganen der Blütenpflanzen vorkommen, muß eine wichtige physiologische Bedeutung für den Sexualakt zugesprochen werden.

Eingeg. am 8. Mai 1950.

[A 272]

Über einen Stoff, der bei der Futterwahl des Kartoffelkäfers eine Rolle spielt

Lockstoffe bei Insekten, I. Mitteilung

Von Prof. Dr. G. HESSE und Dr. R. MEIER. Aus dem chem. Laboratorium der Universität Freiburg/Br.

Es wurde gefunden, daß der Kartoffelkäfer und seine Larve nur das Laub derjenigen Kartoffelsorten fressen, die Acetaldehyd enthalten; dabei scheint es sich vor allem um eine Geschmackswirkung zu handeln. Nach einer besonders entwickelten Untersuchungsmethode wurden die genaueren Einzelheiten bestimmt und auch verwandte Aldehyde systematisch untersucht.

Es gehört zu den merkwürdigsten Erscheinungen in der Lebensweise vieler Insekten, daß sie entweder nur eine einzige (Monophagie, oder nur einige wenige und dann meist nahe miteinander verwandte Pflanzen (Oligophagie) als Nahrung annehmen und eher an Hunger zugrunde gehen, als anderes zu fressen. Der Kartoffelkäfer und seine Larve sind oligophag; nur vier Arten der Gattung *Solanum* bringen ihnen normales Gedeihen vom Ei bis zum fertigen Tier (*S. tuberosum*, *S. marginatum*, *S. rostratum*, *S. melongena*¹⁾). Einige andere *Solanaceen* werden zwar gefressen, aber die Tiere sterben teils an Hunger (*S. demissum*), teils an einer Giftwirkung (*Atropa belladonna*) früher

¹⁾ Diese und einige weitere Angaben entnehmen wir der interessanten Dissertation von Chun-The Chin, *Studies on the physiological relations between the larvae of Leptinotarsa decemlineata Say and some solanaceous plants*. Dissert. Amsterdam; H. Veemann u. Zonen, Wageningen 1950.

oder später. Die größte Auswahl grüner Blätter aus anderen Gattungen oder Familien, teils dem Kartoffelkraut zum Wechseln ähnlich, werden auch von hungernden Tieren nicht angenommen.

Man kann sich kaum vorstellen, daß zum Beispiel die Tomate oder der Klee in ihren Blättern nicht auch alle jene Nahrungsstoffe enthalten sollten, die zum normalen Gedeihen notwendig sind. Was aber die Vitamine oder unentbehrlichen Aminosäuren angeht, so gilt in der Ernährungslehre von den höheren Tieren und vom Menschen eine vielseitige Kost als sicherste Garantie der ausreichenden Versorgung. Zudem ist es nicht sehr wahrscheinlich, daß die eine Kartoffelrasse *Solanum tuberosum* sie alle enthalten, die nahe verwandte Wildkartoffel *S. chacoense* aber unvollständig damit versehen sein sollte, denn gerade diese