

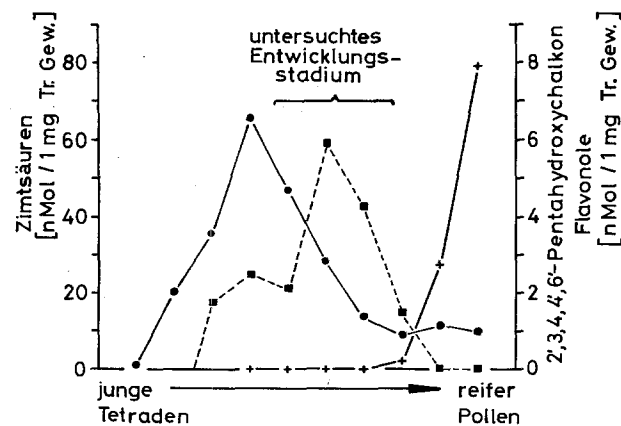
Über das Vorkommen verschieden substituierter Chalkone während der Mikrosporogenese bei *Tulipa*

Die Frage, auf welche Weise bei flavonoiden Verbindungen das Substitutionsmuster des B-Ringes festgelegt wird, ist unentschieden. Die zu diesem Problem vorliegenden experimentellen Befunde führten zur Formulierung der folgenden Hypothesen: 1. Die mit bestimmten Substituenten versehenen Zimtsäuren werden zur Synthese der im B-Ring entsprechend substituierten Anthocyane verwendet; das Substitutionsmuster der Anthocyane ist demnach schon auf der C(6)-C(3)-Stufe festgelegt. 2. Die Substitution des B-Ringes erfolgt auf der C(15)-Stufe von einfachen zu höheren Substitutionsgraden¹⁻⁴.

In früheren Untersuchungen zum Flavonoidstoffwechsel der *Tulipa*-Antheren konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Stadien der Antherenentwicklung wichtige Intermediärprodukte der Flavonoidbiosynthese akkumuliert werden. Es konnte das 2', 3, 4, 4', 6'-Pentahydroxychalkon isoliert werden⁵. Das Vorkommen einer experimentell gut fassbaren Chalkon-Zwischenstufe veranlasste uns in weiterführenden Untersuchungen, die Frage nach den Substitutionsprinzipien dieser C(15)-Zwischenstufe eingehender zu analysieren. Über die wichtigsten Ergebnisse soll im folgenden berichtet werden.

Material und Methode. Als Objekt dienten Antheren von *Tulipa* cv. Apeldoorn. Untersucht wurde der Antherenininhalt (Pollen- + Tapetumfraktion) des in der Figur gekennzeichneten Entwicklungsstadiums. Die Pigmente wurden mit einem Aceton-Methanolgemisch extrahiert. Die Trennung und Anreicherung der einzelnen Komponenten erfolgte auf Cellulosedünnschichten (Fließmittel: Chloroform:Eisessig = 2:1 (wassergesättigt); 15%ige Essigsäure; Butanol:Eisessig:Wasser (= 6:1:2)).

Wichtige Voraussetzung für die Untersuchung war die Synthese geeigneter Referenzsubstanzen. Für die Synthese von Polyhydroxychalkonen verwendeten wir das Verfahren nach RUSSELL^{6,7}, das auf der Kondensation von Phloracetophenontribenzoat mit Vanillinbenzoat und anschließender Abspaltung der Benzoäurereste beruht. Die Synthese des 2', 3, 4, 4', 6'-Pentahydroxychalkons erfolgte entsprechend unter Verwendung von Protocatechualdehyddibenzoat⁸. Die einzelnen Syntheseprodukte wurden dünnschichtchromatographisch gereinigt. Die Aufnahme von Absorptionsspektren erfolgte mit Hilfe des «Spektronic 505» von Bausch und Lomb.



Akkumulation phenylpropanoide Verbindungen während der postmeiotischen Mikrosporogenese im Antherenininhalt von *Tulipa*. ●—●, *p*-Cumarsäure + Ferulasäure; ■—■, 2', 3, 4, 4', 6'-Pentahydroxychalkon; +—+, Kämpferol + Quercetin + Isorhamnetin.

Ergebnisse und Diskussion. In mittleren Entwicklungsstadien der postmeiotischen Mikrosporogenese findet eine intensive Akkumulation des 2', 3, 4, 4', 6'-Pentahydroxychalkons statt (Figur). Orientierende Untersuchungen mit den verschiedensten dünnschichtchromatographischen Verfahren zeigten das Vorhandensein von 3 weiteren Anthochlorpigmenten an. Diese sind in so geringen Spuren vertreten, dass lediglich die Anreicherung von 2 Komponenten gelang. Durch Co-Chromatographie in den verschiedensten Systemen ergab sich eine so weitgehende Übereinstimmung zwischen den synthetisierten Testsubstanzen und den aus den Antheren isolierten Komponenten, dass es sich bei diesen Substanzen um das 2', 4, 4', 6'-Tetrahydroxy-3-methoxychalkon und das 2', 4, 4', 6'-Tetrahydroxychalkon handeln muss. Die Identität des Tetrahydroxy-3-methoxychalkons wurde durch Spektralphotometrie abgesichert. Ausserdem konnten die einzelnen Verbindungen nach längerer Lagerung auch in Form ihrer isomeren Flavanone nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Erfahrungen von ENDRESS⁹ lassen sich die genannten Chalkone, die sich nur im Substitutionsmuster des B-Ringes unterscheiden, in verschiedenen Fließmitteln ausgezeichnet trennen (Tabelle).

Die 3 Chalkone liegen als Aglykone vor. Sie stimmen in der Substitution des B-Ringes vollständig mit dem Substitutionsmuster der in der Endphase der Antherenentwicklung gebildeten Flavonole Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin überein. Wie die Figur zeigt, ist das mittlere Entwicklungsstadium der postmeiotischen Mikrosporo-

Rf-Werte der aus den Antheren von *Tulipa* cv. Apeldoorn isolierten Chalkone

		1		2		3	
		a	b	a	b	a	b
Laufmittel/Zellulose	I	0,55	0,55	0,74	0,74	0,85	0,85
	II	0,64	0,64	0,75	0,75	0,84	0,84
	III	0,23	0,23	0,47	0,47	0,38	0,38
Laufmittel/Polyamid	IV	0,08	0,08	0,27	0,27	0,17	0,17
	V	0,28	0,28	0,43	0,43	0,35	0,35

Laufmittel I: iso-Butanol: Eisessig:Wasser = 10:3,5:7; II: Butanol: Eisessig:Wasser = 6:1:2; III: Chloroform: Eisessig = 1:1 (wassergesättigt); IV: Chloroform: Methanol: Methyläthylketon = 9:4:2; Methanol: Methyläthylketon: Acetylacetone: Chloroform = 10:5:1:3. 1. 2', 3, 4, 4', 6'-Pentahydroxychalkon; 2. 2', 4, 4', 6'-Tetrahydroxy-3-methoxychalkon; 3. 2', 4, 4', 6'-Tetrahydroxychalkon; a) Referenzsubstanz; b) die aus dem Antherenininhalt isolierte Komponente.

¹ D. HESS, *Biochemische Genetik* (Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1968).

² H. GRIEBACH, in *Recent Advances in Phytochemistry* (Eds. T. J. MABRY, R. E. ALSTEN and V. C. RONECKLES (Appleton-Century-Crofts, New York 1968)).

³ H. GRIEBACH und W. BARZ, *Naturwissenschaften* 56, 538 (1969).

⁴ A. M. STEINER, *Z. Pflanzenphysiol.* 63, 370 (1970).

⁵ R. WIERMANN, *Planta* 95, 133 (1970).

⁶ A. RUSSELL, *J. chem. Soc.*, 1934 218.

⁷ A. RUSSELL und J. TODD, *J. chem. Soc.* 1937, 421.

⁸ A. RUSSELL und J. TODD, *J. chem. Soc.* 1934, 1066.

⁹ R. ENDRESS, *Z. Pflanzenphysiol.* 67, 188 (1972).

genese durch intensive Akkumulation des Pentahydroxychalkons markiert. Ob das Tetrahydroxy- und das Tetrahydroxy-3-methoxychalkon ähnliche Kinetiken zeigen, ist noch offen.

Mit diesen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass bei Synthese mehrerer, im B-Ring verschieden substituierter Flavonole entsprechend substituierte Chalkone in bestimmten Stadien der Organentwicklung akkumuliert werden. Damit kann freilich noch nichts über den biogenetischen Zusammenhang der einzelnen Komponenten ausgesagt werden. Die vollständige Übereinstimmung in der Substitution lässt es jedoch als wahrscheinlich erscheinen, dass bei dem hier untersuchten Objekt das Substitutionsmuster der Flavonole schon auf der Chalkonstufe festgelegt sein dürfte.

Summary. During the development of anthers in *Tulipa* cv. 'Apeldoorn' the following chalcones were isolated: 2', 3, 4, 4', 6-pentahydroxychalcone as the main component and 2', 4, 4', 6'-tetrahydroxy-3-methoxychalcone as well as 2', 4, 4', 6'-tetrahydroxychalcone in a very small amount.

L. QUAST und R. WIERMANN¹⁰

*Botanisches Institut der Universität Münster,
Schlossgarten 3, D-44 Münster (Westfalen, Deutschland),
8. Februar 1973.*

¹⁰ Die Untersuchungen wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Studies on Yellow Mosaic Disease of Soybean. I. Effect of Virus Infection on Plant Pigments

The adverse effects of virus infection on the plant pigments have been studied¹⁻³. The various types of yellowing and mosaic patterns associated with virus diseases may reflect the extent to which the plant pigments are affected. The effects of yellow mosaic disease on the pigments of soybean are reported in this paper.

The young and matured leaves of soybean showing mild, moderate and severe symptoms of yellow mosaic disease, were collected in the mornings. Comparable controls of healthy leaves were also obtained. The contents of chlorophyll a, b and total chlorophylls were estimated by the method of YOSHIDA et al.⁴ and expressed as mg of chlorophyll/g of leaf. The carotenoids were extracted by the method of HARDER et al.⁵ and the intensity of the colour was measured at 460 nm. The comparative carotenoids contents of diseased leaves were calculated, taking the content of healthy leaves as 100.00.

The chlorophyllase activity of the healthy and diseased samples was determined by modifying the method of WILLSTÄTER and STOLL⁶. The chlorophyll content of the solution used as substrate was determined by the method of YOSHIDA et al.⁴. After an incubation period of 24 h, the amounts of chlorophyll left in the solution were determined for different samples and the amounts of chlorophyll destroyed were calculated by subtraction.

The chlorophyll contents of infected leaves decreased progressively with increasing intensity of symptoms. The reduction in the contents of chlorophyll fractions a, b and

total showed similar trends. In the case of matured leaves infected by the virus, the percentage of decrease over healthy progressively increased from 9.69 to 79.66, indicating a heavy reduction in the chlorophyll a contents of severely infected leaves (Table I). The young severely infected leaves also showed such a remarkable reduction of 68.06% over healthy leaves. The effect of virus infection on chlorophyll b is less, as compared to chlorophyll a. Similar progressive reduction of this fraction was also evident as the intensity of the symptoms increased. Maximum reduction in chlorophyll b contents was observed in severely infected young and matured leaves.

The ratio of chlorophyll a to chlorophyll b was altered due to virus infection. Both young and matured leaves

- ¹ V. S. TRIPPI and J. R. MESIAS, *Revta ind. agric. Tucuman*, **47**, 29 (1957).
- ² P. NARAYANASAMY and K. RAMAKRISHNAN, *Proc. Indian Acad. Sci. B*, **62**, 130 (1965).
- ³ R. JEVARAJAN and K. RAMAKRISHNAN, *Madras agric. J.* **58**, 217 (1971).
- ⁴ S. YOSHIDA, D. A. FORNO and J. H. COCK, *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice* (International Rice Research Institute, Philippines 1971), p. 61.
- ⁵ D. E. HARDER, J. W. MARTENS and R. I. H. MCKENZIE, *Can. J. Bot.* **49**, 1783 (1971).
- ⁶ R. M. WILLSTÄTER and A. STOLL, *Investigations on Chlorophyll* (The Science Press Printing Co., Lancaster 1928), p. 385.

Table I. Chlorophyll and carotenoids contents of healthy and diseased soybean leaves

Nature of samples	Chlorophyll fractions (mg/g of leaf)			Carotenoids (parts)
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	
Matured leaves				
Healthy	1.332	1.976	3.308	100.00
Mild	1.203 (9.69) ^a	1.887 (4.51)	3.090 (6.29)	84.99 (5.01)
Moderate	0.808 (39.34)	1.690 (14.48)	2.498 (24.49)	81.66 (8.34)
Severe	0.271 (79.66)	1.045 (47.07)	1.316 (60.22)	71.66 (18.34)
Young leaves				
Healthy	1.440	2.221	3.661	100.00
Mild	1.300 (9.72)	2.122 (4.46)	3.422 (6.51)	89.64 (10.36)
Moderate	0.811 (43.69)	1.475 (33.59)	2.286 (37.56)	84.47 (15.53)
Severe	0.460 (68.06)	1.085 (51.15)	1.545 (57.80)	70.68 (29.32)

^a The percentages of decrease over healthy are given in parentheses.