

RÉSUMÉ.

Les composants endocellulaires de la pigmentation du bacille de la fléole comprennent des caroténoïdes et des pigments quinoniques; nous avons identifié trois caroténoïdes, à savoir β -carotène (ou léprotène), xanthophylle et chrysofléine.

Nous avons mis en évidence l'action anticaroténogène du phénol et signalons le pouvoir chromogène du m-dinitrophénol.

Institut de Botanique générale de l'Université, Genève.

130. Die Wirkung von Carotinoiden auf die Keimung von Cyklamenpollen

von F. H. Schwarzenbach.

(28. III. 51.)

Carotinoide sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Besonders häufig sind sie in Blüten lokalisiert, was zur Vermutung geführt hat, dass diese Pigmente fortpflanzungsphysiologische Vorgänge steuern könnten. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde das folgende Teilproblem herausgegriffen: Sind Carotinoide Wirkstoffe für die Pollenkeimung?

Methodik.

Die versuchstechnische Schwierigkeit bei der Lösung dieser Frage liegt darin, dass Carotinoide extrem lipophile Stoffe sind, während der Pollen zur Keimung Wasser benötigt. Um die Wirkung von Carotinoiden auf die Pollenkeimung feststellen zu können, ist es daher notwendig, gleichzeitig Wasser und ein Fettlösungsmittel an den Pollen heranzubringen. Das lässt sich dadurch erreichen, dass der Blütenstaub in der feuchten Kammer nicht wie üblich in einer wässrigen Nährösung zur Keimung gebracht, sondern auf Paraffin, das als Lösungsmittel für Carotinoide dient, kultiviert wird. Das für die Keimung benötigte Wasser wird dem Pollen in der feuchten Kammer in Form von Wasserdampf zur Verfügung gestellt.

Versuchsvorschrift. Man löst das zu prüfende Carotinoid in der gewünschten Konzentration in geschmolzenem Paraffin vom Smp. 55°—60°. Ein Tropfen dieser Lösung wird heiß auf ein Deckglas gebracht, wo man ihn erstarren lässt. Nach Abkühlung wird der Tropfen mit Pollen beimpft, indem man den Blütenstaub mit einer Präpariernadel in möglichst dünner Schicht aufstreicht. Das Deckglas wird auf eine mit Paraffinöl oder Vaseline abgedichtete feuchte Kammer aufgesetzt. (Die verwendeten feuchten Kammern bestanden aus einem Objektträger mit aufgekleistem Glasring von 10 mm Höhe und 15 mm lichter Weite.)

Die Versuchsbedingungen für die Pollenkeimung müssen für jede Pflanzenart besonders festgelegt werden. Für Blütenstaub von *Cyclamen persicum* Mill. betrug die Versuchsdauer bei der optimalen Keimungstemperatur von 24° vier bis fünf Stunden.

Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die Keimung durch Kaltstellen der Kulturen (Temp. unter +5°) in allen Kammern gleichzeitig unterbrochen. Die Auszählung der Pollenkörner erfolgte auf einem Objektträger in Wasser, indem der Paraffintropfen mit einem Skalpell vom Deckglas abgelöst und der anhaftende Pollen durch Schwenken in einem Wassertropfen abgespült wurde.

Anlage und Auswertung der Versuche. Jedes Carotinoid wurde bei verschiedenen Konzentrationen auf seine Wirkung geprüft. Als Ausgangskonzentration diente bei leicht löslichen Carotinoiden in der Regel eine Lösung von einem Gewichtsteil des Carotinoids in 1000 Gewichtsteilen Paraffin; bei schwerlöslichen Pigmenten wurde die gesättigte Lösung als Ausgangspunkt gewählt, wobei deren absolute Konzentration abgeschätzt wurde. Zur Herstellung der Verdünnungsreihen, bei denen sich zwei aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen meist um den Faktor $n = 10$ unterschieden, wurde zu vier oder fünf Tropfen Lösung einer gegebenen Konzentration die $(n - 1)$ -fache Anzahl Tropfen reinen, geschmolzenen Paraffins zugefügt.

Bei jeder Verdünnungsstufe wurde eine Reihe paralleler Versuche angesetzt. Daneben diente zur Kontrolle der Keimfähigkeit des verwendeten Blütenstaubes eine Serie von 4–10 Kammern, in denen der Pollen auf Paraffin allein, ohne Zugabe von Carotinoiden, zur Keimung gebracht wurde.

Die Auswertung erfolgte in drei Stufen:

1. Bestimmung der Keimrate für jede einzelne Versuchskammer.
2. Bestimmung der mittleren Keimrate für jede Serie parallel durchgeföhrter Versuche.
3. Vergleich der mittleren Keimrate jeder Versuchsserie mit dem Mittelwert der Kontrollen.

Zur Bestimmung der Keimrate in jeder Einzelkammer wurden 300 Pollenkörner in sechs zufällig herausgegriffenen Stichproben von je 50 Körnern ausgezählt. Diese Gruppe wurde statistisch auf ihre Homogenität geprüft¹⁾. Da nur bei homogenen Kulturen Gewähr dafür besteht, dass das Stichprobenmittel nicht wesentlich von dem Wert abweicht, der durch das Auszählen sämtlicher Pollenkörner einer Versuchskammer bestimmt wird, schaltete ich inhomogene Kulturen von der weiteren Auswertung aus. Elimination einer Kammer erfolgte dann, wenn die Wahrscheinlichkeit, rein zufällig aus der normal verteilten Gesamtheit aller Pollenkörner eine Stichprobengruppe von 6×50 Körnern mit der beobachteten oder einer noch grösseren Streuung zu ziehen, unter den Wert von 0,05 sank. Für den Homogenitätstest wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Chi}^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x}_{St})^2}{mpq},$$

Chi^2 = statistische Masszahl.

x_i = Anzahl der gekeimten Pollenkörner in jeder einzelnen Stichprobe.

\bar{x}_{St} = arithmetisches Mittel der sechs Stichproben.

m = Anzahl der ausgezählten Pollenkörner pro Stichprobe.

p = prozentualer Anteil der gekeimten Pollenkörner in der gesamten Stichprobengruppe.

q = $1 - p$.

Aus Tabellen für Chi^2 lässt sich der Zahlenwert für die Wahrscheinlichkeit P ablesen; als Freiheitsgrad wird der Wert $(n - 1)$ gewählt. (n = Anzahl Stichproben in der untersuchten Gruppe.)

Dann wurde für jede Serie paralleler Einzelversuche das arithmetische Mittel berechnet und, nach der gleichen Formel wie oben, die Wahrscheinlichkeit P als Mass für die Homogenität bestimmt. Inhomogene Serien mit der Wahrscheinlichkeit $P \leq 0,05$

¹⁾ Das im folgenden skizzierte, statistische Verfahren wurde mir von Herrn Prof. Dr. A. Linder, ETH. Zürich persönlich mitgeteilt. Ich möchte es nicht unterlassen, ihm dafür meinen besten Dank auszusprechen.

wurden von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen. Solche inhomogenen Kulturen traten sehr selten auf und konnten immer auf Versuchsfehler, wie z. B. ungenügende Abdichtung der feuchten Kammern, zurückgeführt werden.

Um die Wirkung eines Carotinoids bestimmter Konzentration auf die Keimung von Cyklamenpollen festzulegen, diente der t-Test nach *R. A. Fisher*¹⁾.

Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die Experimente zeigen, dass Carotinoide die Pollenkeimung von *Cyclamen persicum* Mill. beeinflussen. Nach ihrer Wirkung und nach den Schwellenwerten der wirksamen Konzentration lassen sich die 25 geprüften Carotinoide in sechs Gruppen einteilen. Tabelle 1 beginnt mit den extremen Förderstoffen und schliesst mit den extremen Hemmstoffen ab.

Die extremen Förderstoffe stimulieren noch in Verdünnungen von $1:10^6$ Gewichtsteilen die Keimung von Cyklamenpollen. In diese Gruppe gehören Lycopin und Crocetin.

Die Gruppe der starken Förderstoffe mit der Wirkungsschwelle bei einer Konzentration zwischen 10^{-5} und 10^{-6} Gewichtsteilen wird durch die beiden Carotinoide Bixin und Capsanthin gebildet.

Bei den schwachen Förderstoffen liegt die Wirkungsschwelle bei einer Konzentration von 10^{-4} Gewichtsteilen; Konzentrationen von 10^{-3} wirken stimulierend auf die Keimung. Diese Gruppe umfasst eine Reihe von Xanthinen: Kryptoxanthin, Xanthophyll-epoxyd, Xanthophyll-dipalmitat, Antheraxanthin und Physalien. Aus Analogie werden Xanthophyll und Zeaxanthin ebenfalls in diese Gruppe eingereiht, obwohl sich diese beiden Stoffe ihrer Schwerlöslichkeit in Paraffin wegen bei der entscheidenden Konzentration von 10^{-3} nicht prüfen lassen. Ausserdem gehören Dihydro- β -carotin und Eschscholtzxanthin²⁾ in diese Gruppe.

Erläuterungen zur Tabelle 1.

Konzentrationen:

Die Konzentrationen werden in Gewichtsteilen angegeben; eine Konzentration von 10^{-4} bedeutet z. B. dass ein Gewichtsteil des Carotinoids in 10000 Gewichtsteilen Paraffin gelöst ist.

Symbole zur Bezeichnung der Wirkung:

H = Hemmung, F = Förderung, I = Indifferenz.

Symbole zur Bezeichnung der statistischen Sicherung:

* = statistisch gesichert, $0,05 \geq P > 0,01$.

** = statistisch stark gesichert, $0,01 \geq P > 0,001$.

*** = statistisch sehr stark gesichert $0,001 \geq P$.

() = statistisch ungesicherte Förderung oder Hemmung.

¹⁾ Für Anwendung und mathematische Grundlagen des Verfahrens vgl. z. B. *A. Linder*, Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure, Verlag Birkhäuser, Basel 1948.

²⁾ *Helv.* **34**, 445 (1951).

Tabelle 1.

Wirkung von Carotinoiden auf die Pollenkeimung von *Cyclamen persicum*.

	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Lycopin ¹⁾		(F) ²⁾	F**	F*	I	I
Crocin ¹⁾		F**	(F) ³⁾	F***		
Bixin ¹⁾			F**	I	I	I
Capsanthin ¹⁾		F**	F*	I	I	I
Xanthophyll ¹⁾		I	I	I	I	I
Xanthophyll-epoxyd .	F**	I	I			
Xanthophyll-dipalmitat	F**	I	I	I	I	
Kryptoxanthin ¹⁾	F*	I	I	I	I	
Antheraxanthin ¹⁾	F*	I	I	I		
Zeaxanthin ¹⁾		I	I	I	I	
Physalien	F**	I	I	I	I	
Dihydro-β-carotin . . .	F***	F*	F*	I	I	I
Eschscholtzxanthin . .	F***	I	I	I		
γ-Carotin		I	I	I	I	
ε ₁ -Carotin	I	I	I	I	I	I
Aurochrom ¹⁾			I	I	I	I
Mutatochrom		H***	H***	I	I	
Luteochrom	H***	H*	H**	I	I	
Flavoxanthin ¹⁾		H*	H**	I	I	
Chrysanthemaxanthin ¹⁾		H**	(H) ⁴⁾	I	I	
α-Carotin		H***	H***	I	I	
β-Carotin		H***	H***	H***	I	
β-Carotin-monoepoxyd	H**	H**	H**	(H) ⁵⁾	I	
β-Carotin-diepoxyd . .	H***		H***	(H) ⁶⁾		
Decapreno-β-carotin .	H**	H**	H**	(H) ⁷⁾	I	I

¹⁾ Dieser Hinweis bedeutet, dass es sich um ein schwerlösliches Carotinoid handelt, für welches die gesättigte Lösung als Ausgangskonzentration zur Herstellung der Verdünnungsreihe gewählt wurde. Da die absolute Konzentration der gesättigten Lösung geschätzt wurde, können die Konzentrationsangaben bei diesen Carotinoiden nur in bezug auf die Größenordnung als gesichert angenommen werden.

²⁾ Die Förderung lässt sich statistisch nicht sichern, da die Werte der drei parallel durchgeführten Versuche eine zu grosse Streuung aufweisen, was sich im niedrigen Wert P für Homogenität ausdrückt: P = 0,51.

³⁾ Die Wahrscheinlichkeit für die Übereinstimmung der Versuchsserie mit der Kontrollserie liegt mit 0,06 nur knapp ausserhalb der Sicherheitsschwelle von 0,05.

⁴⁾ Die Streuung der drei Einzelwerte dieser Serie ist zu gross; die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die drei Werte aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, beträgt nur 0,43.

⁵⁾ Die Hemmung lässt sich statistisch nicht sichern, da die beobachtete Abweichung zu klein ist.

⁶⁾ Die Keimrate liegt bei der Konzentration von 10⁻⁶ noch deutlich unter dem Durchschnitt der Kontrolle; die Differenz ist jedoch statistisch nicht mehr zu sichern.

⁷⁾ Die Hemmung lässt sich nicht mehr statistisch belegen, da die beiden einzigen Werte der Versuchsserie eine zu grosse Streuung aufweisen. (P für Homogenität = 0,47).

Drei Carotinoide sind indifferent: γ -Carotin, ε_1 -Carotin¹⁾ und Aurochrom.

Der Gruppe der starken Hemmstoffe (Wirkungsschwelle bei einer Konzentration zwischen 10^{-5} und 10^{-6} Gewichtsteilen) sind fünf Carotinoide zuzurechnen: die vier monofuranoiden Oxyde Mutatochrom, Luteochrom, Flavoxanthin und Chrysanthemaxanthin sowie α -Carotin.

Die Gruppe der extremen Hemmstoffe, die noch in Verdünnungen von 1:10⁶ wirksam sind, umfasst β -Carotin, β -Carotin-mono-epoxyd, β -Carotin-di-epoxyd und Decapreno- β -carotin²⁾.

Chromatographisch gereinigte Fraktionen zweier Carotinoide aus Cyklamenpollen wirkten stark hemmend auf die Keimung von Cyklamenblütenstaub. Die Hemmwirkung der beiden Carotinoidfraktionen liess sich durch Zugabe von unbefruchteten, jungen Samenanlagen einer bestimmten Handelssorte von *Cyclamen persicum* Mill. neutralisieren. Der gleiche Effekt konnte in Modellversuchen reproduziert werden, indem es gelang, die Hemmwirkung von β -Carotin und Luteochrom (Konzentrationen 10⁻⁵ Gewichtsteile) durch β -Indolyl-essigsäure (wässrige Lösung von 50 mg/l) aufzuheben. β -Indolyl-essigsäure selbst wirkt indifferent auf die Keimung von Cyklamenpollen. (Vgl. Tab. 2.)

Auf den extremen Förderstoff Crocetin hatte die Zugabe von β -Indolyl-essigsäure keinen Einfluss.

Die Versuche wurden mit einer neuen Methode durchgeführt, die es erlaubt, gleichzeitig den Einfluss beliebiger fett- und wasserlöslicher Wirkstoffe auf die Pollenkeimung zu untersuchen. Einzelheiten darüber werden zusammen mit dem Belegmaterial für die vorliegende Arbeit und weiteren Versuchsergebnissen an anderen Pollensorten später veröffentlicht. Die Publikation wird voraussichtlich in der Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft Zürich erscheinen.

Tabelle 2.
Einfluss von β -Indolyl-essigsäure auf die Wirkung verschiedener Carotinoide.

	β -Carotin			Luteochrom			Crocetin		
	n	%	SQ	n	%	SQ	n	%	SQ
Kontrollen:									
a) Keimfähigkeit des Pollens	9	23,19%	13,35	9	22,29%	58,36	9	21,07%	85,25
b) Wirkung der β -Indolyl-essigsäure . . .	9	22,63%	11,03	9	24,26%	83,35	9	20,44%	75,49
c) Wirkung des Carotinoids	9	16,90%	50,30	8	13,78%	180,70	9	25,70%	35,67
Versuch:									
Carotinoid + β -Indolyl-essigsäure	9	26,93%	5,07	8	21,25%	72,68	9	24,93%	134,62

¹⁾ Helv. **33**, 1433 (1950).

²⁾ Helv. **34**, 28 (1951).

Erläuterungen zur Tabelle 2.

n = Anzahl der ausgezählten Einzelversuche pro Versuchsserie. In jedem Einzelversuch wurde die Keimrate durch Auszählen von $6 \times 50 = 300$ Körnern bestimmt.

% = mittlere Keimrate der Versuchserie, berechnet als arithmetisches Mittel der n Einzelversuche.

SQ = Summe der Quadrate der Abweichungen der Einzelwerte vom arithmetischen Mittel der Versuchsserie.

Die Werte von n und SQ sind angeführt, um die Möglichkeit zu bieten, die Angaben über den Grad der statistischen Sicherung nach dem t-Test überprüfen zu können.

Die Aufhebung der Hemmwirkung des β -Carotins ist statistisch sehr stark ($P \ll 0,001$), die Blockierung der Hemmung des Luteochroms stark gesichert ($P \ll 0,01$). Die Keimrate von 24,93% im Versuch mit dem Förderstoff Crocetin weicht nicht wesentlich vom Kontrollmittel (25,70%) ab.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methodik beschrieben, mit welcher es gelingt, Carotinoide auf ihre Wirkung in der Pollenkeimung zu untersuchen. Es wird gezeigt, dass auf die Pollenkeimung von *Cyclamen persicum* Mill. gewisse Carotinoide hemmend, andere stimulierend wirken, während eine dritte Gruppe keine ausgesprochene Wirkung aufweist.

Chromatographisch gereinigte Fraktionen zweier Carotinoide aus dem Cyklamenpollen wirken stark hemmend. Die Hemmwirkung lässt sich durch Zugabe unbefruchteter Samenanlagen von *Cyclamen persicum* Mill. aufheben. Der Effekt kann in Modellversuchen reproduziert werden, indem die Hemmwirkung von β -Carotin und Luteochrom durch die Zugabe von β -Indolyl-essigsäure aufgehoben wird.

Die Präparate für diese Versuche wurden mir vom Chemischen Institut der Universität Zürich zur Verfügung gestellt. Ich möchte es nicht unterlassen, Herrn Prof. Dr. P. Karrer für dieses grosszügige Entgegenkommen sowie für sein Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat, aufrichtig zu danken. Zu Dank verpflichtet bin ich ferner den Herren C. H. Eugster und E. Leumann, Assistenten am Chemischen Institut der Universität Zürich, für ihre Anregungen und ihre Unterstützung.

Institut für Allgemeine Botanik
(Direktor Prof. Dr. H. Wanner) der Universität Zürich.
