

verwendeten Fruchtkörper und Ertragsverlauf der daraus hervorgehenden Kulturen zu erkennen.

10. Durch Vermehrung eines spontan aufgetretenen Fruchtkörpers neuer Form über Gewebekulturen konnte in früheren Versuchen ein Stamm mit neuer wirtschaftlich zu nutzender Fruchtkörperform gewonnen werden. Der anfänglich sehr niedrige Gesamtertrag konnte durch weitere Gewebekulturen erheblich verbessert werden.

11. Nach den hier erzielten Versuchsergebnissen ist eine Erhaltung der Stämme durch Vermehrung über Gewebekulturen nicht zu empfehlen. Das Verfahren birgt Unsicherheiten, da es sich nicht um die Vermehrung von Gewebe, also von Zellen, die je einen diploiden Kern enthalten, handelt, sondern um Vermehrung von Plektenchym. Das Plektenchym stellt jedoch eine Verflechtung von Hyphen dar, die in ihren Zellen eine unterschiedliche Anzahl haploider und in vielen Fällen genetisch verschiedener Kerne enthalten.

Für die gute Assistenz bei der Durchführung der Versuche möchte ich Frau von HOLST herzlich danken.

Literatur

1. EGER, GERLIND: Persönliche Mitteilung. — 2. EVANS, H. J.: Nuclear behaviour in the cultivated mushroom. *Chromosoma (Berl.)* 10, 115–135 (1959). — 3. FRITSCHÉ, G., und R. v. SENGBUSCH: Die züchterische Bearbeitung des Kulturchampignons (*Psalliota bispora* Lge.). Probleme und erste eigene Ergebnisse. *Der Züchter* 32, 189–199 (1962). — 4. FRITSCHÉ, G., und R. v. SENGBUSCH: Beispiel der spontanen Entwicklung neuer Fruchtkörperformen beim Kulturchampignon. *Der Züchter* 33, 270–274 (1963). — 5. FRITSCHÉ, GERDA: Versuche zur Frage der Merkmalsübertragung beim Kulturchampignon *Agaricus (Psalliota) bisporus* (Lge.) Sing. *Der Züchter* 34, 76–93 (1964). — 6. FRITSCHÉ, GERDA: Versuche zur Frage der Erhaltungszüchtung beim Kulturchampignon. I. Vermehrung durch Teilung des Mycels. *Der Züchter* 36, 66–79 (1966). — 7. HUHNKE, W., und R. v. SENGBUSCH: Aktivmycelspickung von Champignonkulturen. *Die Deutsche Gartenbauwirtschaft* 7, 238–239 (1959). — 8. KINDT, V.: Ein Beitrag zur Problematik exakter Anbauversuche bei der Champignonkultur. *Archiv für Gartenbau* 2, 135–150 (1963). — 9. KINDT, V.: Über den Einfluß der Bewässerungsmaßnahmen auf die Ertragsbildung im Champignonanbau. *Archiv für Gartenbau* 13/4, 313–328 (1965). — 10. KLIGMAN, A. M.: Some cultural and genetic problems in the cultivation of the mushroom „*Agaricus campestris*“. *American Journal of Botany* 30, 745–762 (1943). — 11. LAMBERT, E. B.: Improving Spawn Cultures of Cultivated Mushrooms. *Mushroom Science* IV, 33–51 (1959). — 12. SARAZIN, A.: The cultivated mushroom. 5. Germination of spores and development of mycelium. *MGA Bull.* 33, 281–285 (1952). — 13. SARAZIN, A.: The cultivated mushroom. Übersetzung aus dem Französischen von Dr. C. J./Sa Touche (1955). — 14. STRASBURGER, E.: *Lehrbuch der Botanik*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1962. — 15. TILL, O.: Champignonkultur auf sterilisiertem Nährsubstrat. *Die Deutsche Gartenbauwirtschaft* 9, 215–216 (1961).

Über Konstitution und Erbgang eines neuen Delphinidinglycosids „Floridorin“ aus der Garteniris-Sorte cv. 'Floridor' (Cayeux 1929)

(Studien über Anthozyane LI.)

PETER WERCKMEISTER, KÔZÔ HAYASHI und YOSHIKAZU YASAKI

Institut für Botanik, Gärungsphysiologie und Hefereinzucht der Lehr- und Forschungsanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau, Geisenheim a. Rh., und Botanisches Institut der Tokyo Kyoiku Universität, Ohtsuka, Tokyo

On the constitution and inheritance of a new delphinidine glycoside „Floridorin“ from the cultivated iris variety cv. 'Floridor' (Cayeux 1929) (Studies on anthocyanins LI)

Summary. The diploid tall bearded garden Iris cv. 'Floridor' (Cayeux 1929) proved to be thus far the only variety with a different anthocyanine, called 'Floridorin'. Its chemical structure has been found to be delphinidine-3-glucose-rhamnose-p-coumaric-acid. It occurs together with tulipanine already analyzed by us as delphinidine-3-glucose-rhamnose. The main anthocyanine of the *Pogoniris* garden varieties proved to be violanin the structure of which has been studied by us lately. The investigations were carried out by some newer methods, such as partial hydrolysis and oxidative degradation already published by us. The new 'Floridorin' gives a monohybrid recessive Mendelian ratio with other diploid varieties of *Pogoniris* colored by violanin. The varieties colored by 'Floridorin' show a characteristic greyish blue coloration which can be recognized with the naked eye.

Einleitung

In einer an dieser Stelle veröffentlichten Untersuchung über Anthozyane (WERCKMEISTER 1952, 1954), in der auch die Garteniris der Geisenheimer Iris-Sammlung behandelt worden waren, wurde mitgeteilt, daß sich unter den damals ca. 400 Namenssorten der Iris nur eine einzige Sorte fand, die ein abweichendes Anthozyan aufwies. Es war dies die Sorte cv. 'Floridor'

(Cayeux 1929). Diese Sorte wurde 1954 an Geisenheimer Material cytologisch von SIMONET untersucht und mit $2n = 24$ Chromosomen als diploid erkannt (SIMONET, briefl. Mitt. v. 14. 9. 1954). In der Farbe weicht diese Sorte auffällig von anderen blauvioletten Sorten des Sortiments ab. Bei uns wird eine solche Farbe üblicherweise als „taubenblau“, in der französischen Sprache gelegentlich als „ardoise“ (= schieferfarben) bezeichnet, wobei diese Bezeichnung die tatsächliche Farbe weniger gut charakterisiert, da diese eher blau als grau ist. Der damalige Farbvergleich mit der britischen Horticultural Colour Chart ergab den Farbton 039 (= Dauphinviolett) für die äußeren Perigonblätter („Hängeblätter“) und 040/1 für die etwas blauerer inneren Perigonblätter („Domblätter“), ein Farbton, der jedoch in der HCC nicht vorliegt und nach 40/1 (= Hyacinthblau) interpoliert wurde. Der Farbton 039/1 HCC entspricht einigermaßen dem Farbton 14 K (14:4:3,5) auf dem Pflanzenfarbenatlas nach DIN 6164 von BIESALSKI (1957). Die anderen hierher gehörigen Farbtöne sind auf den beiden Atlanten schwer vergleichbar. Der gedeckt graublau Farbton ist jedoch innerhalb des Iris-Sortiments einmalig und ohne Mühe aus den anderen blauen und graublauen Farbtönen der Gartensorten herauszuerkennen.

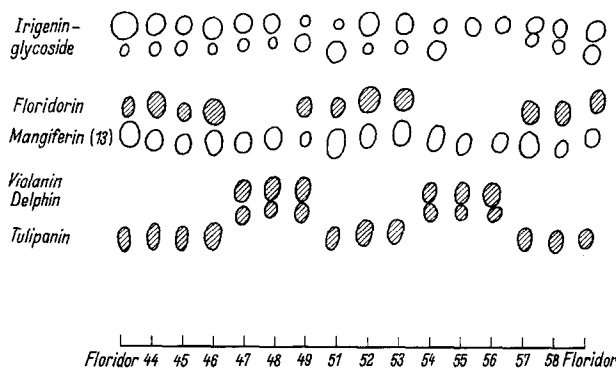


Abb. 1. Eines der Serienchromatogramme von den 88 Klonen aus der Aufspaltung der Kreuzung Iris cv. 'Floridor' \times Sämling Nr. 227, entwickelt mit Isopropanol/Amylenhydrat/50%ige Ameisensäure (2:1:2, v/v). Außer den Anthozyanen Floridorin/Tulipanin, resp. Violanin/Delphin und den Irgeninglycosiden ist das Glycoxanthon Mangiferin (2-Glukosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthon) eingezeichnet, das von BATE-SMITH und HARBORNE (1963) identifiziert wurde und in allen Blüten der *Pogoniris* vorkommt.

Für die damaligen Anthozyan-Untersuchungen standen noch keinerlei Vergleichssubstanzen zur Verfügung, und so richteten sie sich nach dem Vergleich mit Pflanzen, über die sich in der Literatur verlässliche Angaben fanden. Bei der damaligen papierchromatographischen Untersuchung zeigte das Hauptanthozyan aller untersuchten anthozyanführenden Gartensorten von Iris den gleichen Rf-Wert wie das Anthozyan der Gartenstiefmütterchen, das als Violanin von KARRER (1942) und KARRER und DE MEURON (1933) beschrieben worden war. Nur das Anthozyan der cv. 'Floridor' erwies sich in allen Laufmitteln stets gegenüber dem Violanin als schneller laufend. Alle drei Farbstoffe erwiesen sich nach Hydrolyse als Delphinidinfarbstoffe. Die damalige Zuckerbestimmung ergab Glucose und Rhamnose und noch einen Fleck, der damals für Xylose gehalten wurde. Inzwischen sind Konstitution und Haupteigenschaften des Violanins in Tokyo näher ermittelt worden (TAKEDA, ABE u. HAYASHI 1963; TAKEDA u. HAYASHI 1963a und b, 1965).

Genetisches Verhalten

Die cv. 'Floridor' als diploide Sorte mit $2n = 24$ ließ erwarten, daß sich eine Faktorenanalyse in überschaubaren Grenzen halten würde. Daher wurden eine Anzahl anderer diploider Sorten mit der cv. 'Floridor' gekreuzt. Von diesen ergab besonders die Kreuzung mit einem rotvioletten Sämling Nr. 227 zahlreiche und gut keimfähige Samen. Die aus diesen aufgezogene F_1 war jedoch keineswegs uniform. Es fanden sich einige violette und einige 'plicata'-Typen unter zahlreichen blauvioletten Sämlingen. Keiner der erhaltenen Sämlinge jedoch zeigte das charakteristische „Taubenblau“ der Ausgangssorte cv. 'Floridor'. Eine Analyse aller Faktoren wäre über den Rahmen des damals Möglichen hinausgegangen. Jedoch wurde die Frage des 'Floridor'-Anthozyans weiter verfolgt. Aus der F_1 -Generation wurden einige Sämlinge des 'plicata'-Typs ausgewählt, da dieser Typ aus der Literatur (STURTEVANT und RANDOLPH 1945) verlässlich als rezessives Zeichnungsmuster bekannt ist. Diese wurden zur Rückkreuzung mit cv. 'Floridor' herangezogen. Nach zwei weiteren Jahren ergab diese Aussaat aus zwei Früchten einen Bestand von 88 Klonen, von denen die typischsten mehrere Jahre bis heute erhalten wurden. Unter diesen fanden sich wiederum die Hauptfarben blauviolett, spektral-

violett, rotviolett und zahlreiche 'plicata', ein Zeichnungsmuster, bei dem die Anthozyanbildung an den Blütenrändern dem Leitbündelverlauf folgt. Neu und charakteristisch war, daß nun auch bei den anderen Farbtönen und bei dem 'plicata'-Zeichnungsmuster ein gedeckter Farbton mit dem Auge angesprochen werden konnte, der der Farbendeckung bei der cv. 'Floridor' entspricht.

Dies veranlaßte eine Reihenuntersuchung aller 88 Klone, bei der eindimensional chromatographiert wurde. Hierfür wurde das einphasige Gemisch Isopropanol/Amylenhydrat/50%ige Ameisensäure 2:1:2 v/v, verwendet, das für Anthozyane recht hohe Rf-Werte und distinkte, unverwaschene Flecken ergibt. Bei der Auszählung der Chromatogramme ergab sich, daß alle „taubenblauen“ und gedecktfarbigten Klone die für die cv. 'Floridor' charakteristischen Anthozyane besaßen, alle anderen jedoch das normale Iris-Hauptanthozyan Violanin.

Die Auszählung nach der Farbe und nach dem Farbstoff ergab ein Spaltungsverhältnis von 45 'Floridor'-Klonen zu 43 „normalgefärbten“ Klonen, welches zufriedenstellend einer erwarteten 1:1-Spaltung entspricht. Da auch einige rotviolette und einige 'plicata'-Klone des gedeckten Farbtyps erhalten wurden, so ist der neue Farbstoff nun auch für weitere Farbenzüchtung verfügbar. Neuerdings werden, besonders in den USA, wieder kleinblumige diploide Sorten für die Dekoration beliebter, so daß das neue Anthozyan hier Bedeutung erlangen könnte. Bei tetraploiden hohen Gartensorten wurde es bisher nicht aufgefunden. Inwieweit der Farbton „Taubenblau“ allein diesem neuen Anthozyan zuzuschreiben ist oder vielleicht ganz anderen, mit seinem Auftreten korrelierten chemisch-physikalischen Bedingungen im Zellsaft, bleibt natürlich ungeklärt.

Untersuchung der Anthozyane in Tokyo

Nachdem diese Befunde jedoch einmal vorlagen, entstand der Wunsch, dieses neue Delphinidinglycosid seiner Konstitution nach genau kennen zu lernen. Hierfür wurde getrocknetes Blütenmaterial von den 'Floridor'-Klonen, von cv. 'Floridor' selbst sowie von den „normalen“ Klonen und zum Vergleich von der rotvioletten Sorte cv. 'Magenta' (Cayeux) nach Tokyo geschickt. Das frische Blütenmaterial wurde kurz mit Benzol entfettet (nicht mit Aceton ausgezogen, weil sich dabei zu hohe Farbstoffverluste ergaben), dann 10–15 Min. im Trockenschrank auf ca. 85 °C zur Fermentzerstörung erhitzt und dann sehr schnell getrocknet.

Das trockene Material wurde in Tokyo mit 1%iger Salzsäure extrahiert und eindimensional aufsteigend chromatographiert. Bei cv. 'Floridor' und den farblich dieser Sorte entsprechenden 5 Sämlingsklonen Nr. 27, 41, 44, 52 u. 53 wurden zwei Flecken erhalten. Das Hauptanthozyan dieser Sorte, das wir nach dieser „Floridorin“ nennen, hat einen Rf-Wert von 0,5 in n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5, v/v) und von 0,73 in n-Butanol/Salzsäure/Wasser (7:2:5, v/v) und ist ein bisher noch nicht bekanntes Anthozyan. Das zweite Anthozyan dieser Sorten mit einem Rf-Wert von 0,13 in n-Butanol/Eisessig/Wasser wie oben und 0,35 in n-Butanol/Salzsäure/Wasser wie oben können wir als das bereits bekannte Anthozyan Tulipanin ansprechen; beides sind Delphinidinglycoside.

Zur weiteren Aufarbeitung für die Identifizierung wurden die Flecken ausgeschnitten und mit wenig 0,5%iger methanolischer Essigsäure eluiert.

Als erstes folgte die Verseifung mit Alkali. Das Eluat wurde mit 8%iger Natronlauge 30 Min. in N₂-Atmosphäre bei Zimmertemperatur verseift, dann angesäuert und mit Äther ausgezogen. Die in den Äther übergegangene organische Säure wurde nach dem Chromatographieren mit Hilfe der Fluoreszenzfarbe, mit Sulfanilsäure-Reagenz und durch den Vergleich mit authentischer Substanz durch den Rf-Wert von 0,92 als p-Cumarsäure identifiziert. Das von p-Cumarsäure befreite Farbstoffglycosid erwies sich als mit dem zweiten 'Floridor'-Anthozyan, Rf-Wert 0,13, identisch und ließ sich als das schon bekannte Tulipanin (Delphinidin-3-rhamnoglucosid) identifizieren.

Das Hauptanthozyan „Floridorin“ wurde darauf mit 20%iger Salzsäure hydrolysiert. Wie erwartet, konnten in der Ätherschicht p-Cumarsäure, in der isoamylalkoholischen Schicht Delphinidin und in der wäßrigen Phase Glucose und Rhamnose mit aufsteigender Chromatographie eindeutig nachgewiesen werden. Die p-Cumarsäure wurde gegen Kontrollsubstanzen in n-Butanol/Eisessig/Wasser wie oben chromatographiert; Rf-Wert 0,90. Das Aglukon erwies sich in Forestal-Solvens als Delphinidin; Rf-Wert 0,36. Die Zucker wurden in n-Butanol/Eisessig/Wasser wie oben und in n-Butanol/Pyridin/Wasser (6:4:3, v/v) chromatographiert und als Glucose und Rhamnose identifiziert; Rf-Werte für Glucose 0,10 resp. 0,34, für Rhamnose 0,26 resp. 0,52.

Anschließend wurde auf den Zuckerester mittels der kürzlich angegebenen Methode des Perhydrol-Abbaues geprüft (vgl. K. TAKEDA und K. HAYASHI, 1963 und 1964). Dabei ergab sich, daß die Gruppe in 3-Stellung nichts anderes ist als p-Cumaroyl-rutinoside (Glucose-Rhamnose-p-Cumarsäure). Sie hat gegen die Vergleichssubstanz in n-Butanol/Eisessig/Wasser einen Rf-Wert von 0,45.

Für die Bestimmung des zweiten Farbstoffs Tulipanin diente der Klon Nr. 27 als Ausgangsmaterial. Hierzu wurde der Perhydrolabbau wie die fraktionierte Hydrolyse verwendet. Wie soeben beschrieben, wurde die 3ständige Zuckergruppe abgetrennt, chromatographiert und die Flecken mit Silbernitrat-Reagens sichtbar gemacht. Hierbei wurde als Hauptprodukt Rutinose und in kleiner Menge auch Glucose erfaßt. In n-Butanol/Eisessig/Wasser ergab Rutinose den Rf-Wert von 0,05, in n-Butanol/Pyridin/Wasser den Rf-Wert von 0,21, Glucose entsprechend 0,10 und 0,29 (Kontrollsubstanzen 0,05 und 0,22 resp. 0,10 und 0,28).

Die stufenweise Hydrolyse diente zum Nachweis der Reihenfolge der Glycosidbindung. Ein Teil des Hauptanthozyans „Floridorin“ wurde in 60%igem salzsauren Äthanol (12% HCl) gelöst und auf dem Wasserbade auf 70 °C erwärmt. Während der Erwärmung wurden kleine Portionen in zeitlichen Abständen herauspipettiert und auf das Chromatographiepapier getropft. Dann wurde das Chromatogramm mit Essigsäure/Salzsäure/Wasser (15:3:82, v/v) entwickelt, wobei mit fortschreitender Hydrolyse zunehmend Tulipanin (Delphinidin-Glucose-Rhamnose), Delphinidin-3-Glucosid und Delphinidin erkennbar wurden. Andere Flecken wurden nicht

beobachtet. Damit ist bewiesen, daß die zwei Zucker, Glucose und Rhamnose, in 3-Stellung am Delphinidin sitzen und daß die Reihenfolge als Delphinidin-Glucose-Rhamnose angenommen werden muß.

Vergleichsweise wurde das Hauptanthozyan der anderen Iris untersucht, das als Violanin erkannt wurde. Die Struktur des Violanins wurde hier kürzlich als p-Cumaroyl-triglucosid des Delphinidins festgestellt (TAKEDA, ABE u. HAYASHI, 1963, TAKEDA u. HAYASHI 1963a u. b). Das Iris-Hauptanthozyan Violanin wurde, wie bereits beschrieben, mit Alkali verseift und ergab p-Cumarsäure. Es folgten der Perhydrol-Abbau und die stufenweise Hydrolyse. Dann konnten auf dem Chromatogramm fortlaufend Violanin, das Delphinidin-3,5-diglucosid (Delphin), Delphinidin-5-monoglucosid und Delphinidin-3-monoglucosid ermittelt werden.

Zusammenfassung

Bei der diploiden hohen Garten-Iris cv. 'Floridor' (Cayeux 1929) wurde als bisher einziger Sorte ein neues Delphinidinglycosid „Floridorin“ aufgefunden. Seine chemische Konstitution wurde als Delphinidin-3-Glucose-Rhamnose-p-Cumarsäure aufgeklärt. Es fand sich zusammen mit dem schon von uns aufgeklärten Anthozyan Tulipanin (Delphinidin-3-Glucose-Rhamnose). Das Hauptanthozyan der anderen Garten-Iris ist das von uns neuerdings nachuntersuchte Violanin. Die Untersuchungen wurden mit bereits von uns angegebenen neueren Methoden ausgeführt, wie der stufenweisen Hydrolyse und dem oxidativen Abbau. Das neue „Floridorin“ zeigte bei den diploiden Garten-Iris einen monohybriden rezessiven Erbgang gegen Violanin. Die Blüten der Sorten, die „Floridorin“ enthalten, sind schon mit dem Auge an einem charakteristischen taubenblauen Farbton zu erkennen.

Literatur

1. BATE-SMITH, E. C., and J. B. HARBORNE: Mangiferin and other Glycophenolics in Iris Species. *Nature* **198**, 1307–1308 (1963). — 2. BIESALSKI, E.: Pflanzenfarbenatlas nach DIN 6164. Göttingen: Musterschmidt 1957. — 3. Horticultural Colour Chart, I u. II. Copyright R. F. Wilson (1938 u. 1941). — KARRER, P.: Anthozyane. In: G. KLEIN, Hb. Pflanzenanalyse III; II, 2, S. 941 (1942). — 4. KARRER, P., u. G. DE MEURON: Über Violanin. *Helv. Chim. Acta* **16**, 292 (1933). — 5. STURTEVANT, A. H., and L. F. RANDOLPH: Iris Genetics. *Bull. Am. Iris Soc.* **99**, 52–66 (1945). — 6. TAKEDA, K., and K. HAYASHI: Analytical Evidence for the Triglycosidic Pattern in Violanin (Anth. XL). *Bot. Mag. (Tokyo)* **76**, 206–214 (1963a). — 7. TAKEDA, K., and K. HAYASHI: Further Evidence for the New Structure of Violanin as Revealed by Degradation with Hydrogen Peroxide (Anth. XLI). *Proc. Japan Acad.* **39**, 484–488 (1963b). — 8. TAKEDA, K., and K. HAYASHI: Oxidative Degradation of Acylated Anthocyanins Showing the Presence of Organic Sugar Linkage in the 3-Position of Anthocyanidins; Experiments on Ensatin, Awobanin and Shisonin (Anth. XLIII). *Proc. Japan Acad.* **40**, 510–515 (1964). — 9. TAKEDA, K., and K. HAYASHI: Crystallization and Some Properties of the Genuine Anthocyanin Inherent to the Deep Violet Colour of Pansy (Anth. XLVIII). *Proc. Japan Acad.* **41**, 449–454 (1965). — 10. TAKEDA, K., Y. ABE and K. HAYASHI: Violanin as a complex Triglycoside of Delphinidin (Studies on Anth. XXXIX). *Proc. Japan Acad.* **39**, 225–229 (1963). — 11. WERCKMEISTER, P.: Papierchromatographische Untersuchungen zur Blütenfarbenzüchtung. *Naturwiss.* **39**, 328 (1952). — 12. WERCKMEISTER, P.: Papierchromatographische Untersuchungen an Anthozyanen und chymochromen Begleitstoffen zur Frage der Blütenfarbenzüchtung. *Züchter* **24**, 224–242 (1954).