

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE LICHTABHÄNGIGE CAROTINOIDSYNTHESE
I. DAS WIRKUNGSSPEKTRUM VON *FUSARIUM AQUAEDUCTUUM**

W. RAU

Botanisches Institut der Universität München

Eingegangen am 5. August 1966

LIGHT-DEPENDENT CAROTENOID SYNTHESIS

I. ACTION SPECTRUM OF PHOTOINDUCTION IN *FUSARIUM AQUAEDUCTUUM*.

Summary. As a first step towards the identification of the photoreceptor responsible for the light-dependent carotenoid synthesis, this paper presents an accurate action spectrum of photoinduction in *Fusarium aquaeductuum*.

As a prerequisite for the determination of the spectrum the optimal conditions for the light-dependent synthesis of pigments were studied. Addition of glucose after illumination enhances the amount of pigment produced in the following darkness, indicating that the limiting factor for pigment formation may be a deficiency of carotenoid precursors. The amount of pigments produced depends on the logarithm of the incident light over a 100 fold range. The reciprocity law holds true over a wide range of time and light intensity.

Carotenoid synthesis is induced only by light with wavelength shorter than 520 nm. The action spectrum has maxima at 375/380 nm and 450/455 nm, one shoulder at 430/440 nm and a further shoulder (or possibly a third maximum) between 470 and 480 nm.

From this action spectrum carotenoids can be ruled out as possible photoreceptors. The spectrum resembles the absorption spectra of certain flavoproteins. It is therefore concluded that a flavoprotein is the acting photoreceptor; data of other investigators with different organisms also support this conclusion. The action spectrum presented also resembles the spectra of phototropism in *Phycomyces*-sporangioophores and *Avena*-coleoptiles; therefore, the possibility is discussed that the same photoreceptor might be acting in all cases in which development and movements are mediated by light of short wavelength.

Einleitung

Die bei einigen Mikroorganismen durch Licht induzierbare Carotinoidsynthese verläuft in zwei deutlich voneinander getrennten Reaktionsabschnitten, der temperatur-unabhängigen Lichtinduktion und einer Reihe von Folgereaktionen, die auch im Dunkeln ablaufen und zur Synthese von gefärbten Carotinoiden führen (ZALOKAR, 1954, 1955; HAXO, 1955; GROB, 1959; RILLING, 1962, 1964; BATRA u. RILLING, 1964; EBERHARD, RAU u. ZEHENDER, 1961; RAU, 1962). Als eine der ersten durch die Lichtinduktion in Gang gesetzten Dunkelreaktionen wird die Neusynthese von Enzymen, die für die Pigmentbildung not-

* Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. BÜNNING, zum 60. Geburtstag in Dankbarkeit gewidmet.

wendig sind, diskutiert (RILLING, 1962, 1964; BATRA u. RILLING, 1964). Die lichtabhängige Carotinoidsynthese dürfte wohl ein im Vergleich zu anderen lichtbedingten Entwicklungs- und Bewegungsvorgängen verhältnismäßig einfaches und überschaubares System sein und erscheint deshalb für Untersuchungen über den Reaktionsmechanismus einer Lichtinduktion sehr geeignet.

Für die Analyse des lichtabhängigen Reaktionsschrittes ist die Identifizierung des verantwortlichen Lichtacceptors notwendig; ein wertvolles Hilfsmittel für diese Identifizierung ist die Aufnahme des Wirkungsspektrums. Angaben über die Wirksamkeit von Licht verschiedener Wellenlängen auf die Carotinoidbildung liegen für mehrere Pilze vor (FRIEDERICHSEN u. ENGEL, 1957; ETZOLD, 1960; JURZITZA, 1964), etwas genauere Wirkungsspektren wurden aber nur bei *Neurospora crassa* (ZALOKAR, 1955) und bei zwei Bakterien, *Mycobacterium sp.* (RILLING, 1964; BATRA u. RILLING, 1964) und *Mycobacterium marinum* (MATHEWS, 1963; BATRA u. RILLING, 1964), aufgenommen. Sämtliche Befunde stimmen darin überein, daß nur das langwellige UV und der kurzwellige Anteil des sichtbaren Lichts (violett, blau) wirksam sind; die Grenze zum Langwelligen liegt bei etwa 520 nm, nur bei *Mycobacterium marinum* scheint um 570 nm noch ein weiteres Maximum der Wirksamkeit vorhanden zu sein. Als mögliche Lichtacceptoren kämen demnach (mit Ausnahme von *Mycobacterium marinum*) Carotinoide oder Flavine in Frage. ZALOKARs Spektrum für *Neurospora* beschränkt sich auf den sichtbaren Bereich und läßt deshalb eine schlüssige Entscheidung für eine der beiden Stoffgruppen nicht zu. Bei *Mycobacterium sp.* fand RILLING Gipfel bei 460 und bei 365 nm und schließt daraus, wie auch schon ZALOKAR vermutete, daß der Lichtacceptor ein Flavin oder Flavoprotein ist; die von ihm ermittelten Spektren zeigen allerdings im sichtbaren Bereich keine deutliche Feinstruktur. Aus Versuchen über die Hemmung der Lichtreaktion durch Hydrosulfit, Azid und niedrige pH-Werte (BATRA u. RILLING, 1964) ergaben sich dagegen zusätzliche Hinweise, die für ein Flavoprotein als verantwortlichen Lichtacceptor sprechen.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, ein möglichst genaues Wirkungsspektrum der lichtabhängigen Carotinoidsynthese bei *Fusarium aquaeductuum* aufzunehmen. Als Voraussetzung dafür mußten aber zunächst noch einige Fragen über den Zusammenhang zwischen Lichtinduktion und Carotinoidsynthese geklärt werden. Bei unseren früheren Untersuchungen (EBERHARD, RAU u. ZEHENDER, 1961; RAU, 1962) hatten wir mit Suspensionen des Pilzes in Phosphatpuffer gearbeitet, um ein Wachstum des Organismus während der Farbstoffbildung zu verhindern. Dadurch sollten eventuell vorhandene Einflüsse einer Plasmavermehrung auf die Menge der gebildeten Pigmente vermieden, die Pilze

also in einem stationären Zustand untersucht werden. Einige Ergebnisse deuteten nun allerdings daraufhin, daß die Synthesefähigkeit des Pilzmycels mit der Zeit abnimmt; so bildeten z. B. Pilzproben nach Bestrahlung mit gleichen Lichtmengen um so weniger Farbstoff, je länger die Zeit zwischen Überführung in Phosphatpuffer und Belichtung ausgedehnt wurde. Dieser als „Verarmung“ bezeichnete Vorgang ist ein begrenzender Faktor der Carotinoidsynthese, der sehr wahrscheinlich nichts mit der Beziehung zwischen Lichtinduktion und Farbstoffbildung zu tun hat und deshalb bei der weiteren Analyse stören könnte.

Unsere bereits zitierten Untersuchungen hatten außerdem gezeigt, daß die Pigmentsynthese durch Zuckerrütterung kräftig gesteigert werden kann. Wir hatten daraus geschlossen, daß die „Verarmung“ auf einer Abnahme der im Pilz vorhandenen Carotinoid-Vorstufen beruht. Diese Annahme sollte überprüft werden um sicherzustellen, daß die Verarmung nicht auch Reaktionsschritte beeinträchtigt, die an der Lichtinduktion beteiligt sind.

Material und Methodik

Anzucht des Pilzes

Zu den Versuchen wurde der gleiche Stamm von *Fusarium aquaeductuum* wie in den früheren Untersuchungen (RAU u. ZEHENDER, 1959; EBERHARD, RAU u. ZEHENDER, 1961; RAU, 1962) verwendet; die Anzucht des Pilzes und die Vorbereitung zum Versuch wurde ebenfalls bereits früher beschrieben. Alle Arbeitsgänge wurden ausschließlich bei schwachem Rotlicht (Leuchtstoffröhren Philips TL 40 W, Lichtfarbe 15 oder rote Dunkelkammerbirnen Philips PF 712 E 45) ausgeführt; das verwendete Licht induziert selbst bei einer Bestrahlungsdauer von mehreren Stunden keine Carotinoidsynthese.

Bestimmung der Pigmentmenge

Zur Bestimmung der gebildeten Carotinoide wurde die früher beschriebene Extraktionsmethode (RAU, 1962) folgendermaßen abgewandelt: Das Mycel wird aus der Suspension abfiltriert, auf dem Papierfilter in ein Plastikfläschchen (100 ml) mit 20 ml Methanol und Glasperlen eingebracht und durch längeres Schütteln (Schüttelmaschine) weitgehend zerschlagen. Dann werden 20 ml Aceton zupipettiert, erneut geschüttelt und schließlich das Homogenat durch eine Nutsche filtriert und mehrmals mit Aceton nachgewaschen. Da das zerschlagene Pilzmycel meist noch nicht rein weiß erscheint, wird der gesamte Vorgang wiederholt, wobei als Extraktionsmittel diesmal nur Aceton mit etwa 10% Eisessig verwendet wird. Mit Hilfe dieser Methode können auch relativ geringe Pigmentmengen quantitativ extrahiert werden.

Der Farbstoff wird dann durch Zugabe einer 10%igen Ammoniumsulfat-Lösung in Petroläther (Kp. 30–50° C) übergetrieben, dieser mehrmals mit Wasser ausgewaschen und in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Die Carotinoide werden mit 10 ml Petroläther aufgenommen und ihre Absorption im Bereich von 450–480 nm in einem Beckmann-Spektralphotometer (Modell B oder DB) gemessen. Als Maß für die Pigmentmenge dient die Extinktion im Absorptionsmaximum.

Belichtung

a) *Weißlicht*. Zur Belichtung mit Weißlicht wurden je 100 ml Pilzsuspension in Gaswaschflaschen gefüllt und vor einem Aggregat aus drei Leuchtstoffröhren (Osram, Lichtfarbe 15 mit Reflektor, 65 W) aufgestellt; die Temperatur während der Belichtung betrug $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C. Die Suspension wurde durch einen O_2 -Strom optimal mit Sauerstoff versorgt und gleichzeitig durchmischt. Vor und nach der Belichtung standen die Pilze unter ständiger Durchlüftung in einer Dunkelkammer bei einer Temperatur von ebenfalls $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C.

b) *Monochromatisches Licht*. Monochromatisches Licht im Bereich von 350 bis 510 nm wurde mit Hilfe eines Quarz-Monochromators (M 4 Q II, Fa. C. Zeiss) hergestellt. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Hochdrucklampe (XBO 450 W), die in einem Lampengehäuse mit Quarzoptik (LX 501 aus einem Spektral-Fluorometer der Fa. Zeiss) untergebracht war; Monochromator und Lampengehäuse waren auf einer optischen Bank montiert und optisch justiert. Die Schlitzbreite des Austrittsspalt am Monochromator betrug im Bereich von 350–400 nm 0,3 mm, von 410 bis 510 nm 0,2 mm; die dadurch erzielte Halbwertsbreite des monochromatischen Lichts schwankte zwischen 4,0 und 8,5 nm. Die Lichtintensität wurde mit einer geeichten Großflächen-Thermosäule (E 1 der Firma Kipp, Delft) über ein Multiflex-Galvanometer (Fa. Lange, Berlin) gemessen (MOHR u. SCHOSER, 1959); sie betrug 550–1150 erg/cm²·sec.

Zur Belichtung wurden 50 ml Pilzsuspension in eine Küvette (Tiefe 3,5 cm) aus UV-durchlässigem Spezialglas gefüllt; die Lichtabsorption dieses Glases war zwischen 510 und 390 μ m völlig gleich und nahm zum kürzerwelligen Bereich nur unwesentlich zu. Die Küvette wurde 15 cm vor dem Austrittsspalt des Monochromators aufgestellt; die Größe des Lichtflecks betrug in dieser Entfernung etwa 2×2 cm. Zwischen Monochromator und Küvette befand sich eine Blende, um seitlich austretendes Streulicht zu absorbieren; der Raum, in dem die Pilzproben belichtet wurden, war gegen das Weißlicht der Hg-Lampe lichtdicht abgeschlossen. Durch einen O_2 -Strom wurde die Pilzsuspension mit Sauerstoff versorgt und gleichzeitig ständig durchmischt. Die Suspension erwärmte sich während der Belichtung nicht nennenswert; außerdem hätte eine kurzzeitige Temperaturerhöhung keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis, weil die Lichtinduktion temperatur-unabhängig ist (RAU, 1962). Nach der Belichtung wurden die Proben in Gaswaschflaschen umgefüllt und blieben bis zum Ende des Versuches unter ständiger Durchlüftung in der Dunkelkammer.

Ergebnisse

A. Steigerung der Carotinoidsynthese durch Zuckerfütterung

1. Zeitlicher Verlauf der Farbstoffbildung

Um die durch eine bestimmte Lichtmenge induzierte Farbstoffmenge vollständig erfassen zu können, mußte zunächst der zeitliche Verlauf der Carotinoidsynthese bei Zuckerfütterung verfolgt werden. Vorversuche hatten ergeben, daß *Fusarium* bei Zusatz von Glucose in der Lage ist, auch ohne Lichtinduktion geringe Mengen von Carotinoiden zu bilden. Bei jedem Versuch wurde deshalb auch die Farbstoffbildung im Dunkeln bestimmt und die Werte der belichteten Proben gegen diesen Dunkelwert korrigiert. Die in Abb. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß ohne Lichtinduktion die pro Zeiteinheit gebildete Pigmentmenge während des ganzen Versuches etwa gleich bleibt. Bei Belichtung

beginnt die Carotinoidsynthese mit einer deutlichen lag-Periode von $1-1\frac{1}{2}$ Std, steigt dann rasch an und ist im Gegensatz zu den Versuchen ohne Glucose (RAU, 1962) erst nach 48 Std nahezu und nach 60–72 Std vollständig abgeschlossen. Bei allen folgenden Versuchen wurden deshalb die Pilzproben — soweit nicht anders angegeben — nach der Belichtung noch mindestens 60 Std. im Dunkeln belassen.

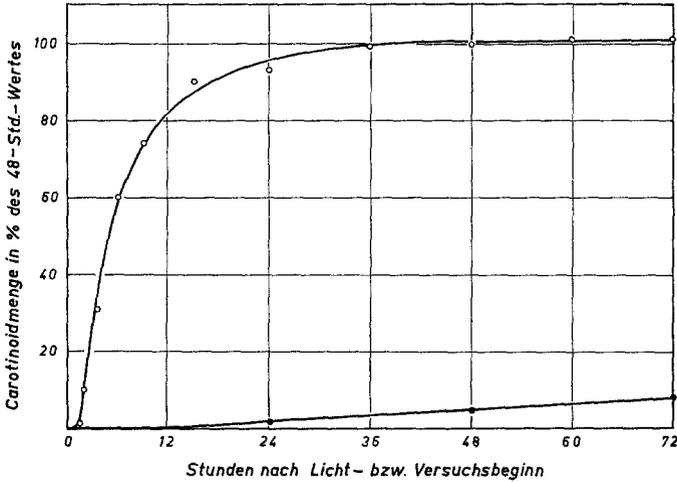


Abb. 1. Verlauf der Farbstoffbildung im Dunkeln (●—●) und nach 1stündiger Belichtung mit 16000 Lux Weißlicht (○—○); Mittelwerte aus 5 Versuchen

2. Aufhebung der „Verarmung“ durch Glucosefütterung

Fütterungsversuche mit verschiedenen Substraten (Disaccharide, Hexosen, Pentosen, Glycerin, Acetat) zeigten, daß Glucose, Saccharose und Maltose die höchste Carotinoidausbeute ergeben. Die Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Glucosekonzentration ist aus Tabelle 1 zu ersehen; die im optimalen Bereich liegende Konzentration von 1,8% wurde bei allen weiteren Versuchen angewendet.

Tabelle 1. Abhängigkeit der Carotinoidbildung von der Glucosekonzentration. Alle Proben wurden 1 Std mit 16000 Lux Weißlicht belichtet und anschließend der Zucker zugesetzt. Die Farbstoffmenge ist in Prozent des Wertes ohne Glucose angegeben. (Mittelwerte aus 5 Versuchen)

Ohne Glucose	Glucosekonzentration					
	0,1%	0,5%	1,0%	1,5%	2%	3%
100%	141%	145%	155%	163%	159%	150%

In den folgenden Versuchen sollte nun geprüft werden, ob sich die Abnahme des Carotinoidsynthesevermögens („Verarmung“) durch

Glucosezusatz aufheben läßt und welche Teilschritte der Gesamtreaktion (Lichtinduktion oder Farbstoffsynthese) von der Verarmung betroffen werden.

Dazu wurden Pilzproben nach sorgfältigem Auswaschen des Nährbodens in Phosphatpuffer überführt und nach verschieden langer Wartezeit („Verarmungszeit“) 1 h mit 16 000 Lux belichtet. Sofort anschließend

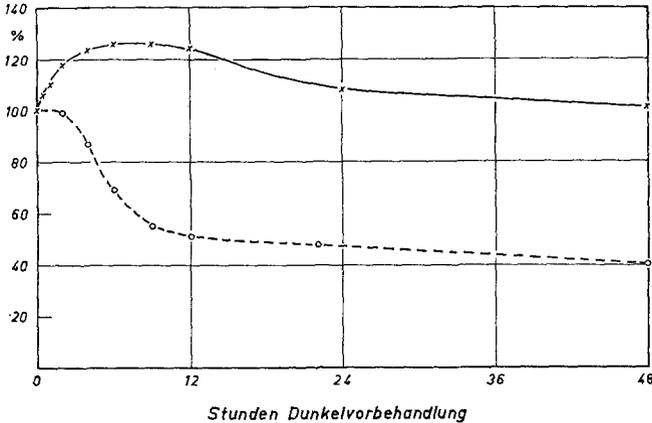


Abb. 2. Farbstoffbildung bei folgender Versuchsanordnung: Verschieden lange Dunkelvorbereitung („Verarmungszeit“), dann 1stündige Belichtung mit 16 000 Lux Weißlicht, anschließend 60 Std im Dunkeln; nach der Belichtung Glucose zugesetzt (x—x) bzw. Proben ohne Glucosezusatz (o---o); Ordinate: Farbstoffmenge in % der jeweiligen Probe ohne Dunkelvorbereitung (Mittelwerte aus 4 Versuchen)

wurde Glucose zugesetzt und die Pilzproben weitere 60—72 h im Dunkeln belassen; die Kontrollen erhielten keinen Zucker. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt. Ohne Glucosefütterung nimmt die durch Belichtung induzierte Farbstoffbildung bis zur 2. Std nur wenig, dann aber bis zu 12. Std drastisch und von dieser Zeit an nur noch langsam ab. Diese „Verarmung“ wird durch Zusatz von Glucose nach der Belichtung vollständig aufgehoben; noch nach einer Wartezeit von 48 h, in der der Organismus keinerlei Nährstoffe von außen erhielt, bildet er die gleiche Carotinoidmenge wie nach sofortiger Belichtung. Überraschend ist, daß bei Belichtung nach einer kurzen „Verarmungszeit“ sogar um etwa 25% höhere Pigmentmengen gebildet werden; die Werte steigen bis etwa zur 3. Std. an, bleiben bis zur 12. Std. nahezu gleich und werden dann wieder langsam kleiner. Eine befriedigende Erklärung für dieses Ergebnis kann bis jetzt nicht gegeben werden; als auslösende Faktoren für die „Aktivierung“ oder „Sensibilisierung“ des Pilzes könnten die mechanische Schädigung beim Auswaschen oder der osmotische Schock beim Überführen vom Nährboden in den Phosphatpuffer in Frage kommen.

Die Tatsache, daß bei Glucosefütterung *nach* der Belichtung das Farbstoffbildungsvermögen vollständig erhalten bleibt, zeigt eindeutig, daß sich die Verarmung nicht auf die Lichtinduktion, sondern nur auf die Synthese der Pigmente erstreckt. Da aber der durch Belichtung induzierte Pigmentgehalt nicht nur von der Lichtmenge sondern auch vom Zeitpunkt der Lichteinwirkung abhängt, mußte bei allen folgenden Versuchen darauf geachtet werden, daß vergleichbare Proben etwa zur gleichen Zeit nach Überführung in den Phosphatpuffer belichtet werden.

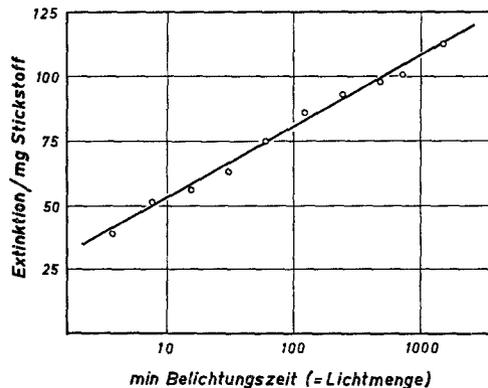


Abb. 3. Abhängigkeit der Carotinoidbildung von der eingestrahelten Lichtmenge; die Belichtung erfolgte mit konstanter Lichtintensität (Mittelwerte aus 3 Versuchen)

Die nach Lichteinwirkung gebildete Carotinoidmenge zeigt eine logarithmische Abhängigkeit von der eingestrahelten Lichtmenge (EBERHARD, RAU u. ZEHENDER, 1961). Die in Abb. 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die logarithmische Beziehung auch bei Glucosefütterung erhalten bleibt und lassen damit wiederum erkennen, daß der Mechanismus der Lichtinduktion durch eine „Verarmung“ nicht beeinflusst wird.

B. Aufstellung eines Wirkungsspektrums

1. Gültigkeit der Produktenregel

Die im vorhergehenden Abschnitt dargestellten Versuche haben gezeigt, daß durch Zuckerfütterung auch *nach* der Belichtung eine optimale Ausnutzung der Lichtinduktion für die Carotinoidsynthese durch den Pilz erreicht werden kann; außerdem konnte aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß das für die Lichtinduktion verantwortliche System von der Menge der vorhandenen Carotinoidvorstufen nicht beeinflusst wird. Außer diesen Voraussetzungen mußte für die Aufnahme des Wirkungsspektrums noch die Gültigkeit der Produktenregel geprüft werden. Für Versuche ohne Substratzufuhr konnten wir dies bereits früher zeigen (EBERHARD, RAU u. ZEHENDER, 1961), die entsprechenden Ergebnisse mit Glucosefütterung sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2. Gültigkeit der Produktenregel bei Glucosefütterung nach der Belichtung. Alle Proben wurden mit der gleichen Lichtmenge (Weißlicht) von 120 000 Luxminuten belichtet (Mittelwerte aus 5 Versuchen)

Lichtintensität (Lux)	16000	8000	4000	2000	1000	500
Belichtungszeit (min)	7,5	15	30	60	120	240
Carotinoidmenge (Extinktion/100 mg Trockengewicht)	344	354	351	352	345	356

Ergänzend dazu sollte noch untersucht werden, ob bei der Lichtinduktion „Ermüdungserscheinungen“ oder „Erholungsvorgänge“ eine Rolle spielen. Dazu wurde eine bestimmte Belichtung entweder zusammenhängend oder intermittierend mit verschiedenen langen Pausen geboten. Die in Tabelle 3 dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, daß innerhalb des geprüften Zeitraumes eine Aufteilung der Belichtung keinen Einfluß auf die Menge der gebildeten Farbstoffe hat. Daraus kann geschlossen werden, daß bis zu der verwendeten Lichtintensität mit einer Sättigung des Lichtacceptors nicht gerechnet werden muß.

Tabelle 3. Farbstoffbildung bei intermittierender Belichtung. Belichtungszeit jeweils 1 Std mit 16 000 Lux Weißlicht; nach der Belichtung wurde Glucose zugesetzt (Mittelwerte aus 3 Versuchen)

Bestrahlungsprogramm	1mal 1 Std (zusammenhängend)	2mal 1/2 Std (dazwischen 1/2 Std Pause)	4mal 1/4 Std (dazwischen je 1/4 Std Pause)
Carotinoidmenge (in Prozent der Belichtung ohne Pausen)	100%	103,0 ± 1,5%	101,5 ± 3,0%

2. Wirkungsspektrum

Zur Ermittlung des Wirkungsspektrums wurden alle Pilzproben mit einer konstanten Quantenmenge von $4,2 \cdot 10^{-7}$ Einstein/cm² bestrahlt; dies wurde durch verschieden lange Belichtungszeiten (im sichtbaren Bereich 16—34 min, im UV-Bereich 20—41 min) erreicht. Um den zeitlichen Abstand zwischen den Belichtungen verschiedener Proben möglichst klein zu halten, wurden pro Versuch nur bestimmte Abschnitte des gesamten Spektralbereichs getestet. Bei jeder Versuchsreihe wurde deshalb als Standard eine mit Licht der Wellenlänge 465 nm bestrahlte Probe mitgeführt und die Pigmentmengen der einzelnen Pilzproben in Prozent der Farbstoffmenge der Standardprobe berechnet. Abb. 4 zeigt das auf diese Weise gewonnene Spektrum; jeder Kurvenpunkt stellt den Mittelwert aus 4—6 Einzelbestimmungen dar, die einfachen mittleren Fehler sind nach oben und unten eingetragen. Das Wirkungsspektrum läßt eindeutig zwei Maxima der Wirksamkeit bei 375/380 nm

und bei 450/455 nm erkennen, die durch ein Minimum bei 400 nm getrennt sind. Im sichtbaren Bereich zeigt sich außerdem eine Schulter bei 430—440 nm und ein weiteres Maximum zwischen 470 und 480 nm. Ob das letztere allerdings reell ist, läßt sich bei Berücksichtigung der mittleren Fehler nicht sicher entscheiden; auf jeden Fall ergibt sich aber

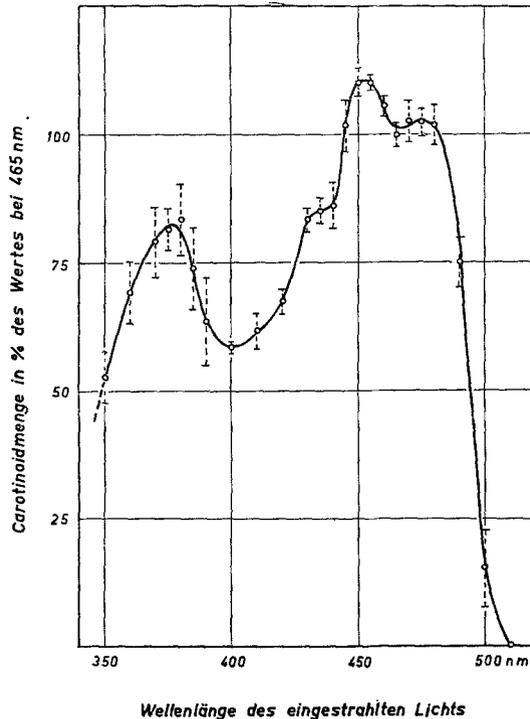


Abb. 4. Wirkungsspektrum der lichtabhängigen Carotinoidebildung; alle Proben wurden mit der gleichen Quantenmenge von $4,2 \cdot 10^{-7}$ Einstein/cm² belichtet. Senkrechte gestrichelte Linien: einfacher mittlerer Fehler

dann in diesem Bereich eine sehr ausgeprägte Schulter. Oberhalb von 480 nm fällt die Wirksamkeitskurve steil ab und erreicht bei 510 nm den Nullwert; bei Bestrahlung mit einer etwa 8fachen Quantenmenge (durch Verlängerung der Belichtungszeit) zeigte Licht der Wellenlänge 510 nm allerdings noch eine sehr geringe Wirksamkeit, während eine Belichtung bei 520 und 550 nm keine Farbstoffbildung mehr induzierte. Wie bereits im Abschnitt „Material und Methodik“ erwähnt wurde, ist das Licht von roten Leuchtstoffröhren (Philips TL 40 W/15, Emission > 590 nm) selbst bei einer Belichtungszeit von mehreren Stunden unwirksam. Zur Induktion der Carotinoide synthese ist demnach nur kurzwelliges Licht unterhalb der Wellenlänge 520 nm befähigt.

Die in Abb. 5 dargestellten Dosis-Effekt-Kurven für drei charakteristische Wellenlängen wurden mit Hilfe einer Interferenzfilteranlage aufgenommen; die dabei eingestrahelten Quantenmengen lagen im gleichen Bereich wie diejenigen bei der Aufnahme des Wirkungsspektrums. In Übereinstimmung mit den Weißlicht-Versuchen ergibt sich bei allen drei Wellenlängen eine logarithmische Abhängigkeit der Carotinoïdbildung von der eingestrahelten Lichtmenge. Der parallele Verlauf der drei Geraden läßt darauf schließen, daß für die Aufnahme des Lichtreizes nur ein Pigment verantwortlich ist.

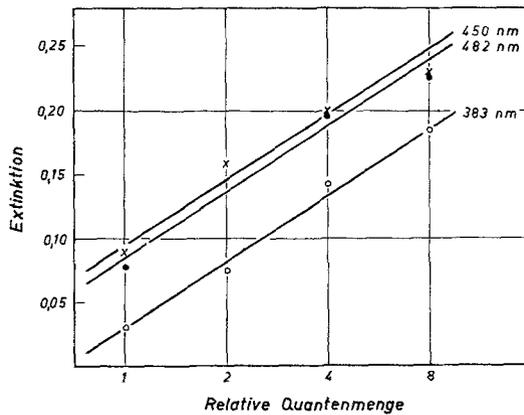


Abb. 5. Dosis-Effekt-Geraden für die 3 Wellenlängen 383, 450 und 482 nm (Mittelwerte aus 3 Versuchen)

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde als erster Schritt für eine Analyse des Reaktionsmechanismus der lichtabhängigen Carotinoïdsynthese ein genaues Wirkungsspektrum der Lichtinduktion bei *Fusarium aquaeductuum* aufgenommen. Es stimmt in den wesentlichen Punkten mit den Wirkungsspektren von *Neurospora crassa* (ZALOKAR, 1955) und von *Mycobacterium sp.* (RILLING, 1964; BATRA u. RILLING, 1964) überein, läßt darüberhinaus aber erstmals die genauere Lage der Wirkungsmaxima sowie im sichtbaren Bereich des Lichts eine ausgeprägtere Feinstruktur erkennen. Bei allen drei Organismen ist für die Induktion der Carotinoïdsynthese nur kurzwelliges Licht mit einer Grenze zum längerwelligen Bereich bei etwa 520 nm wirksam.

Bei *Mycobacterium* wurde im UV-Bereich ein Maximum der Wirksamkeit bei 365 nm gefunden, während bei *Fusarium* dieser Gipfel bei 375/380 nm liegt. Da in den beiden für *Mycobacterium* ermittelten Spektren die Meßpunkte 20 nm auseinanderliegen (nächster Meßpunkt 385 nm), läßt sich nicht entscheiden, ob ein Unterschied wirklich vorhanden ist. Im sichtbaren Bereich ist nur ein grober Vergleich zwischen

den Wirkungsspektren der beiden Organismen möglich, weil die Meßpunkte beim Spektrum von *Mycobacterium* so weit auseinanderliegen, daß eine sichere Aussage über Zahl und Lage von Maxima nicht möglich ist; der Bereich maximaler Wirksamkeit liegt bei *Mycobacterium* zwischen 440 und 480 nm. Dagegen könnte man aus dem von ZALOKAR für *Neurospora crassa* aufgestellten Wirkungsspektrum entgegen seiner

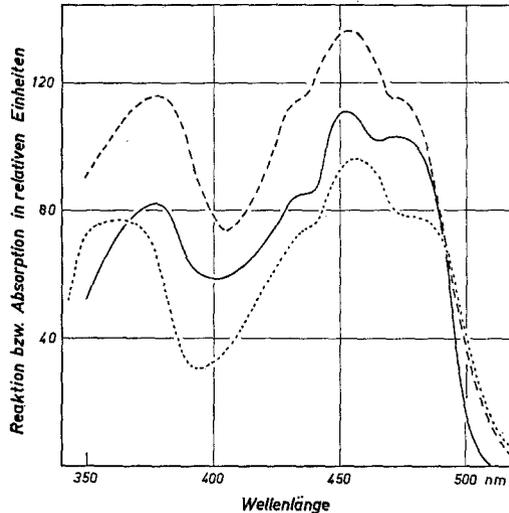


Abb. 6. Vergleich des Wirkungsspektrums der lichtabhängigen Carotinoidsynthese bei *Fusarium* (—) mit den Absorptionsspektren der Flavoproteide L- α -Hydroxysäure-Oxidase nach ROBINSON et al., 1962 (-----) und Lipoyl-Dehydrogenase nach WILLIAMS, 1965 (.....)

eigenen Meinung, daß zwischen 449 und 488 nm ein Plateau ohne deutlich erkennbare Gipfel vorhanden sei, Maxima bei 454 und 480 nm herauslesen, die mit den Maxima bei *Fusarium* gut übereinstimmen würden.

Auf Grund des Wirkungsspektrums kämen als möglicher Licht-acceptor Flavine oder Carotinoide in Frage. ZALOKAR sowie RILLING entscheiden sich für ein Flavin bzw. Flavoprotein als Acceptor, glauben aber doch, daß ein Carotinoid allein auf Grund des Wirkungsspektrums nicht ausgeschlossen werden kann. Nun müßte ein solches Carotinoid zur Erklärung des UV-Gipfels der Wirksamkeit ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich besitzen. Diese Absorptionseigenschaft weisen nur cis-Carotinoide auf, bei denen der UV-Gipfel aber immer einen Abstand von 140 nm vom langwelligsten Maximum im sichtbaren Bereich hat (ZECHMEISTER, 1962). Die Tatsache, daß langwelligstes und UV-Maximum im Wirkungsspektrum dagegen höchstens 110 nm auseinander liegen, dürfte ein Carotinoid als Lichtacceptor mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Viele Flavoproteine haben ein Absorptionsspektrum, das neben den beiden Maxima im UV und bei 450 nm noch zwei mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Schultern um 430 und um 480 nm zeigt (MASSEY u. GANTHER, 1965). Ein Vergleich des vorliegenden Wirkungsspektrums mit den Absorptionsspektren von zwei Flavoproteinen (Abb. 6) läßt die Übereinstimmung im Kurvenverlauf deutlich erkennen. Für die

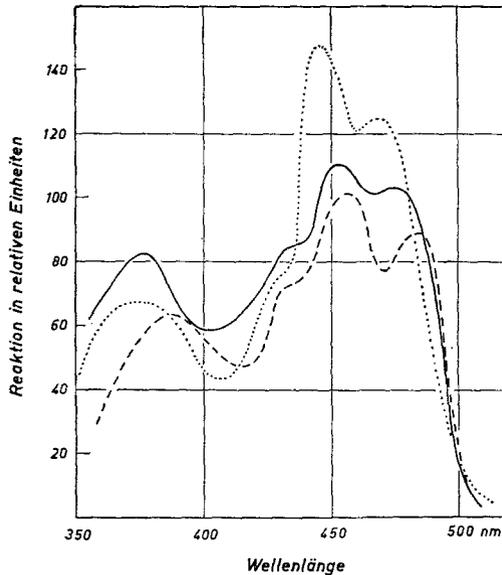


Abb. 7. Vergleich des Wirkungsspektrums der lichtabhängigen Carotinoidsynthese bei *Fusarium* (—) mit den Wirkungsspektren des Phototropismus von *Phycomyces*-Sporangienträgern nach CURRY u. GRUEN, 1959 (·····) und nach DELBRÜCK u. SHROPSHIRE, 1960 (-----)

Identität des Lichtacceptors mit einem Flavoproteinid sprechen außerdem die bereits erwähnten Versuche über die Hemmung der Lichtreaktion durch Azid und Hydrosulfit (BATRA u. RILLING, 1964).

Das hier ermittelte Wirkungsspektrum der lichtabhängigen Carotinoidsynthese ist praktisch identisch mit dem Wirkungsspektrum einer anderen physiologischen Reaktion, nämlich dem Phototropismus; ein Vergleich mit den an Sporangienträgern von *Phycomyces* (CURRY u. GRUEN, 1959; DELBRÜCK u. SHROPSHIRE, 1960) ermittelten Wirkungsspektren ist aus Abb. 7 zu ersehen; von kleineren Abweichungen abgesehen stimmt die Lage der Maxima und Minima aller drei Kurven überein. Sehr ähnliche Aktionsspektren wurden außerdem von SHROPSHIRE u. WITHROW (1958) und von CURRY u. THIMANN (1961) bei *Avena*-Koleoptilen gefunden. Gerade beim Phototropismus ist aber die Diskussion über die Natur des verantwortlichen Lichtacceptors noch in vollem Gange, wobei die Verhältnisse zusätzlich dadurch kompliziert

werden, daß die Empfindlichkeit für kurzwelliges Licht durch Rotlicht beeinflußt wird und außerdem mit einer „Schattenspenderwirkung“ durch andere Pigmente gerechnet werden muß (CURRY u. THIMANN, 1961; BRIGGS, 1964; HAUPT, 1964 und dort zitierte Literatur).

Bei einer so weitgehenden Übereinstimmung der Wirkungsspektren erhebt sich die Frage, ob nicht beim Phototropismus und bei der Carotinoidsynthese und darüberhinaus auch bei anderen nur durch kurzwellige Strahlung induzierbaren Vorgänge wie z. B. gewissen Chloroplastenbewegungen (HAUPT, 1963), Morphogenesen (MOHR, 1956; MOHR u. HOLL, 1964; BERGFELD, 1963; BERGMANN u. BERGER, 1966) oder Änderungen des Plasmazustandes (VIRGIN, 1964) der gleiche oder mindestens sehr ähnliche Lichtacceptoren wirksam sein könnten. Eine Lichtabsorption durch den gleichen Acceptor könnte dann, in Analogie zum Phytochromsystem, in den verschiedenen Organismen die verschiedenartigsten physiologischen Prozesse induzieren. Daß Flavine die verantwortlichen Lichtreceptoren für physiologische Vorgänge sein können, wurde in letzter Zeit von ZENK (1963, 1966) für Photooxydationen in der *Avena*-Koleoptile gezeigt und von MAYER (1966) für Chloroplastenbewegungen wahrscheinlich gemacht.

Welche Folgereaktionen bei der lichtabhängigen Carotinoidsynthese durch eine Strahlungsabsorption des Acceptors in Gang gesetzt werden, ist noch weitgehend ungeklärt; die bis jetzt vorliegenden Versuchsergebnisse und die sich daraus ergebenden Folgerungen sollen in einer späteren Arbeit besprochen werden.

Die Untersuchungen wurden in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, möchte ich für die leihweise Überlassung der Xenon-Lampe danken. Mein besonderer Dank gilt Frau URSULA SCHERF und Fräulein IRMGARD LINDEMANN für ihre sorgfältige und unermüdliche Mitarbeit.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde als erster Schritt zur Identifizierung des für die lichtabhängige Carotinoidsynthese verantwortlichen Acceptors ein genaues Wirkungsspektrum der Lichtinduktion bei *Fusarium aquaeductuum* aufgenommen.

Als Voraussetzung dafür wurde nach den Bedingungen für eine optimale Ausnützung der Lichtinduktion zur Farbstoffbildung gesucht. Es konnte gezeigt werden, daß Glucosefütterung eine wahrscheinlich durch Abnahme der Carotinoidvorstufen bedingte Begrenzung der Pigmentsynthese verhindert. Die Menge der nach der Lichtinduktion gebildeten Carotinoide ist über einen Bereich von zwei Zehnerpotenzen vom Logarithmus der eingestrahlten Lichtmenge abhängig; dabei ist im ganzen untersuchten Bereich die Produktenregel gültig.

Die Farbstoffbildung kann nur durch kurzwellige Strahlung unterhalb 520 nm induziert werden. Das Wirkungsspektrum zeigt zwei Maxima bei 375/380 nm und 450/455 nm, eine Schulter bei 430—440 nm, sowie ein kleineres Maximum oder eine deutlich ausgeprägte Schulter zwischen 470 und 480 nm.

Auf Grund der Ähnlichkeit des ermittelten Wirkungsspektrums mit den Absorptionsspektren von Flavoproteiden wird angenommen, daß der Lichtacceptor für die lichtabhängige Carotinoidsynthese sehr wahrscheinlich ein Flavoprotein ist; Versuchsergebnisse anderer Autoren an verschiedenen Organismen sprechen ebenfalls für diese Annahme. Das vorliegende Wirkungsspektrum ist mit dem des Phototropismus von *Phycomyces*-Sporangienträgern und von *Avena*-Koleoptilen praktisch identisch; es wird deshalb die Möglichkeit erörtert, ob nicht für alle Entwicklungs- und Bewegungsvorgänge, die durch kurzwellige Strahlung induziert werden, der gleiche Lichtacceptor verantwortlich sein könnte.

Literatur

- BATRA, P. P., and H. C. RILLING: On the mechanism of photoinduced carotenoid synthesis: Aspects of the photoinductive reaction. *Arch. Biochem.* **107**, 485—492 (1964).
- BERGFELD, R.: Die Wirkung von hellroter und blauer Strahlung auf die Chloroplastenausbildung. *Z. Naturforsch.* **18 b**, 328—331 (1963).
- BERGMANN, L., u. CH. BERGER: Farblicht und Plastidendifferenzierung in Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* var. „Samsun“. *Planta (Berl.)* **69**, 58—69 (1966).
- BRIGGS, W. R.: Phototropism in higher plants. In: A. C. GIESE (Ed.), *Photophysiology*, vol. 1. New York and London: Academic Press 1964.
- CURRY, G. M., and H. E. GRUEN: Action spectra for the positive and negative phototropism of *Phycomyces* sporangiophores. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **45**, 797—804 (1959).
- , and K. V. THIMANN: Phototropism; the nature of the photoreceptor in higher and lower plants. In: B. CHR. CHRISTENSEN and B. BUCHMANN (Eds.), *Progress in photobiology*. Amsterdam: Elsevier Publ. Co. 1961.
- DELBRÜCK, M., and W. SHROPSHIRE jr.: Action and transmission spectra of *Phycomyces*. *Plant Physiol.* **35**, 194—204 (1960).
- EBERHARD, D., W. RAU u. C. ZEHENDER: Über den Einfluß des Lichts auf die Carotinoidbildung von *Fusarium aquaeductuum*. *Planta (Berl.)* **56**, 302—308 (1961).
- ETZOLD, H.: Die Wirkungen des Lichts auf einige Pilze und ihre spektrale Grenze zum Langwelligen hin. *Arch. Mikrobiol.* **37**, 226—244 (1960).
- FRIEDERICHSEN, I., u. H. ENGEL: Beiträge zur Kenntnis des Abschlußrhythmus und des Farbstoffs von *Sphaerobolus stellatus* (Thode) Pers. *Planta (Berl.)* **49**, 578—587 (1957).
- GROB, E. C.: The biosynthesis of carotenoids by microorganisms. *Ciba Foundation Symp. on Biosynthesis of Terpenes and Sterols 1959*, p. 267—276.
- HAUPT, W.: Photoreceptorprobleme der Chloroplastenbewegung. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **76**, 313—322 (1963).
- Bewegungen: In: *Fortschritte der Botanik*, Bd. 26. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.

- HAXO, F.: Some biochemical aspects of fungal carotenoids. Fortschr. Chem. org. Naturstoffe **12**, 169—197 (1955).
- JURZITZA, G.: Studien an der Symbiose der Anobiiden. II. Physiologische Studien am Symbionten von *Lasioderma serricornis* F. Arch. Mikrobiol. **49**, 331—340 (1964).
- MASSEY, V., and H. GANTHER: On the interpretation of the absorption spectra of flavoproteins with special reference to D-amino acid oxidase. Biochemistry **4**, 1161—1173 (1965).
- MATHEWS, M. M.: Studies on the localization, function and formation of the carotenoid pigments of a strain of *Mycobacterium marinum*. Photochem. Photobiol. **2**, 1—8 (1963).
- MAYER, F.: Lichtinduzierte Chloroplastenverlagerungen bei *Selaginella martensii*. Untersuchungen zur Identifizierung des Photoreceptors durch Anwendung von Quencher-Substanzen. Z. Pflanzenphysiol. **55**, 65—70 (1966).
- MOHR, H.: Die Abhängigkeit des Protonemawachstums und der Protonemapolarität bei Farnen vom Licht. Planta (Berl.) **47**, 127—158 (1956).
- , u. G. HOLL: Die Regulation der Zellaktivität bei Farnvorkeimen durch Licht. Z. Bot. **52**, 209—221 (1964).
- , u. G. SCHOSER: Eine Interferenzfilter-Monochromatoranlage für photobiologische Zwecke. Planta (Berl.) **53**, 1—17 (1959).
- RAU, W.: Über den Einfluß der Temperatur auf die lichtabhängige Carotinoidbildung von *Fusarium aquaeductuum*. Planta (Berl.) **59**, 123—137 (1962).
- , u. C. ZEHENDER: Die Carotinoide von *Fusarium aquaeductuum* Lagh. Arch. Mikrobiol. **32**, 423—428 (1959).
- RILLING, H. C.: Photoinduction of carotenoid synthesis of a *Mycobacterium* sp. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **60**, 548—556 (1962).
- On the mechanism of photoinduction of carotenoid synthesis. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **79**, 464—475 (1964).
- ROBINSON, J. C., L. KEAY, R. MOLINARI, and I. W. SIZER: L- α -Hydroxy acid oxidases of hog renal cortex. J. biol. Chem. **237**, 2001—2010 (1962).
- SHROFESHIRE jr., W., and R. B. WITHROW: Action spectrum of phototropic tip-curvature of *Avena*. Plant Physiol. **33**, 360—365 (1958).
- VIRGIN, H. I.: Some effects of light on chloroplasts and plant protoplasm. In: A. C. GIESE (Ed.), Photophysiology, vol. 1. New York and London: Academic Press 1964.
- WILLIAMS jr., CH. H.: Studies on lipoyl dehydrogenase from *Escherichia coli*. J. biol. Chem. **240**, 4793—4800 (1965).
- ZALOKAR, M.: Studies on biosynthesis of carotenoids in *Neurospora crassa*. Arch. Biochem. **50**, 71—80 (1954).
- Biosynthesis of carotenoids in *Neurospora*. Action spectrum of photoactivation. Arch. Biochem. **56**, 318—325 (1955).
- ZECHMEISTER, L.: Cis-trans isomeric carotenoids, vitamins A and arylpolyenes. Wien: Springer 1962.
- ZENK, M. H.: Über Primäreffekte der phototropischen Perception. Habil.-Schr. Naturwiss. Fak. Univ. München 1963.
- Untersuchungen zum Phototropismus der *Avena*-Coleoptile. II. Pigmente. Z. Pflanzenphysiol. **55**, 1966 (im Druck).

Priv.-Doz. Dr. W. RAU
 Botanisches Institut der Universität
 8 München 19, Menzingerstr. 67.