

Aus dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abt. Genetik,
Köln-Vogelsang

PHASEN DER ANTHOCYANBILDUNG IN DER
BLÜTENENTWICKLUNG VON *PETUNIA HYBRIDA*

Von

DIETER HESS

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. März 1963)

Die Aglyka der Anthocyane oder Anthocyanine, die Anthocyanidine, sind ihrer Biogenese nach Mischkörper. Ihr Ring A (vgl. die Formeln) entsteht aus Acetat-Einheiten, ihr Ring B oder Seitenphenylring und die C-Atome 2, 3, 4 aus einem Phenylpropanderivat, dessen Ringsystem sich seinerseits von Shikimisäure herleiten läßt (Lit. GRISEBACH 1958, BOGORAD 1958, HARBORNE 1960, NEISH 1960, REZNIK 1960, GRISEBACH und OLLIS 1961, BIRCH 1962, HARBORNE 1962a, b, SWAIN und BATE-SMITH 1962). Hypothetisch reagiert dabei ein Cinnamoyl-CoA, also die Co-Enzym A-Verbindung eines C_6-C_3 -Körpers, mit drei Molekülen Malonyl-CoA unter Bildung eines im mittleren Heterocyclus zunächst noch offenen $C_6-C_3-C_6$ -Systems. Möglicherweise sind Chalkone solche frühen Zwischenstufen (GRISEBACH und PATSCHKE 1961; die Bezeichnungen Zwischenstufe und Vorstufe werden im folgenden nach DAVIS 1955 gebraucht). Wahrscheinlich gabelt sich erst auf der Stufe von C_{15} -Verbindungen der bis dahin gemeinsame Syntheseweg zu den Flavonolen einerseits und den Anthocyanen andererseits. Über weitere Zwischenstufen zu den Anthocyanen hin liegen wenig konklusive Daten vor. Neuerdings scheint die schon früher (unter anderem SEYFFERT 1955, Lit. BOGORAD 1958) vermutete Beteiligung von Leukoanthocyanen an Wahrscheinlichkeit zu gewinnen (BOPP und MATHIS 1962).

Die Besetzung des Seitenphenyls mit Hydroxyl- und mit Methoxylgruppen und damit die Bildung verschiedener Anthocyanidine gehört zu schon früh bearbeiteten Problemen der biochemischen Genetik (SCOTT-MONCRIEFF 1936, LAWRENCE und PRICE 1940). Dennoch ist bisher über den Wirkungsmechanismus der beteiligten Gene nur wenig bekannt. So ist vor allem noch nicht geklärt, wann diese Gene in die Biosynthese eingreifen, ob sie die Substitution des Seitenphenyls bereits auf der Stufe von C_6-C_3 -Körpern oder erst nach der Bildung des $C_6-C_3-C_6$ -Skelets bewirken.

Mit der Zielsetzung, Einblicke in den Wirkungsmechanismus der den Ring B verändernden Gene zu gewinnen, wurden Untersuchungen an

Petunia hybrida begonnen. Es standen verschiedene reine Linien zur Verfügung, die in ihren Blüten jeweils mehrere Anthocyandine in z. T. unterschiedlichen Glykosidierungszuständen aufwiesen. Zunächst sollten folgende Fragenkomplexe bearbeitet werden:

a) Der Zeitpunkt des Auftretens der einzelnen Aglyka im Laufe der Blütenentwicklung sollte ermittelt werden. Bei *Primula obconica* finden sich einfach glykosidierte Flavonole und Anthocyane schon in früheren Stadien der Blütenentwicklung als höher glykosidierte (REZNIK 1961). Sollte sich eine entsprechende Reihenfolge auch von einfacher zu kompliziert substituierten Aglyka nachweisen lassen, so war nach deren Ursachen zu fragen und zu ermitteln, ob sich aus einer solchen Reihenfolge Rückschlüsse auf den Weg der Biosynthese ziehen lassen.

b) Die Möglichkeit einer Aufnahme von C_6-C_3 -Körpern in Blütenanthocyane war zu überprüfen. Die oben skizzierten Ergebnisse waren an vegetativem Material gewonnen worden. Da die Veränderungen des Seitenphenyls untersucht werden sollten, mußte vor allem festgestellt werden, ob auch in Blüten C_6-C_3 -Einheiten zum Aufbau der Aglyka verwendet werden.

c) Es sollte versucht werden, aus einer Kombination von Isotopenversuchen mit qualitativen und quantitativen Analysen in verschiedenen Stadien der Blütenentwicklung Hinweise auf den Zeitpunkt der Substitution des Ringes B zu gewinnen.

Material und Methoden

Versuchspflanzen. An Pflanzenmaterial standen drei reine Linien zur Verfügung, die im folgenden als Cyanidintyp, Delphinidintyp und Mischtyp bezeichnet werden. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei etwa 22° unter den natürlichen Tageslängen gehalten. Im Winter erhalten unsere Petunien Zusatzlicht, doch erwies sich das während der Durchführung unserer Hauptversuche in den Monaten August bis Mitte Oktober noch nicht als notwendig.

Stadien der Blütenentwicklung. Zur Untersuchung wurden ganze Knospen und Blüten nach Entfernung der Kelchblätter und des Blütenbodens verwendet. Eine

Tabelle 1. *Stadien der Blütenentwicklung*

Stadium-Nr.	Entwicklungs-zustand	Länge in mm, im Stadium 4 Alter		
		Delphinidintyp	Cyanidintyp	Mischtyp
1	Knospe	5—15	10—20	10—25
2	Knospe	15—20	20—35	25—35
3	Knospe	über 20, meist 20—30	über 35	über 35
4	Blüte	etwa 24 Std nach dem Aufblühen		

Unterscheidung zwischen Blütenkrone und Kronröhre war bei den früheren Knospenstadien noch nicht möglich und wurde deshalb auch bei den Blüten nicht durchgeführt. In Tabelle 1 werden die untersuchten Stadien der einzelnen Genotypen näher charakterisiert. Den dort angegebenen Längenklassen entsprechen

Stadien zunehmender Ausfärbung. Nur ist diese Farbzunahme nicht in Zahlen zu fassen, so daß die Knospenlängen als Einteilungsprinzip verwendet werden mußten.

Aufarbeitungsgänge. a) Aufarbeitung zur quantitativen Bestimmung der Anthocyane. Gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial wurde zur weitgehenden Entfernung von Flavonolen zunächst mit Äthylacetat behandelt. Dazu wurden 100 mg Trockenpulver mit 20 ml Äthylacetat homogenisiert, 15 min unter öfterem Rühren bei Raumtemperatur belassen und nach Abzentrifugieren vom Äthylacetat mit weiteren 20 und schließlich 10 ml Äthylacetat gewaschen. Der Rückstand wurde mit 20 ml Methanol-HCl (hier und im folgenden stets Methanol, enthaltend 1% HCl konz.) 10 min unter Rühren bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Abzentrifugieren des ersten Methanol-HCl-Extraktes wurde mit weiteren kleineren Portionen Methanol-HCl bis zur Farblosigkeit des Rückstandes und der Extrakte behandelt. Die vereinigten Methanol-HCl-Auszüge wurden im Vakuum auf dem handwarmen Wasserbad eingeengt und auf ein bestimmtes Volumen, meist auf 5 ml gebracht. Ein Aliquot dieses Rohextraktes wurde in Strichform auf Kieselgel G aufgetragen und durch DC im Fließmittel Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (70:15:15) getrennt (HESS und MEYER 1962). Nach der DC wurden die einzelnen Anthocyanbanden mit Methanol-HCl sofort nach dem Trocknen der Platte vom Kieselgel eluiert, auf ein bestimmtes Volumen gebracht und im Zeisschen Spektralphotometer PMQ II beim jeweiligen Absorptionsmaximum gemessen.

b) Qualitative Aufarbeitung auf Anthocyanidine. Durch DC erhaltene, in Methanol-HCl überführte Anthocyane wurden mit Äthylacetat ausgefällt, mit etwas 2n HCl aufgenommen und je nach Menge 10–20 min auf dem siedenden Wasserbad gehalten. Die Anthocyanidine wurden mit Amylalkohol ausgeschüttelt und durch DC auf Kieselgel G mit dem Fließmittel Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (85:6:9) getrennt (HESS und MEYER 1962).

c) Aufarbeitung zur halbquantitativen Bestimmung der Flavonol-Aglyka. 100 mg gefriergetrocknetes Blütenmaterial wurde mit 10 ml Petroläther homogenisiert und weiterhin mit Petroläther bis zur Farblosigkeit der Auszüge gewaschen. Der Rückstand wurde wie bei der Anthocyanaufarbeitung mit Methanol-HCl bis zur Farblosigkeit eluiert. Anschließend wurde aber noch mit 10 ml Methanol 80% extrahiert. Die methanolischen Extrakte wurden vereinigt, im Vakuum zur Trockne gebracht und mit 2n HCl wieder aufgenommen. In 2n HCl wurde 50–60 min auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden im Vakuum getrocknet und mit Methanol-HCl auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Ein Teil der Lösung wurde in Strichform auf Kieselgel G-Platten aufgetragen. Als Fließmittel bei der DC dienten Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (5:4:1) und die sonst zur DC von Phenolcarbonsäuren eingesetzten Fließmittel Benzol-Dioxan-Eisessig (90:25:4) sowie Benzol-Methanol-Eisessig (90:16:8) (STAHL und SCHORN 1962). Das beste Fließmittel war das erstgenannte, das deshalb zu allen halbquantitativen Untersuchungen herangezogen wurde. Die durch die DC erhaltenen Flavonolbänder wurden mit Methanol-HCl eluiert, auf ein bestimmtes Volumen gebracht und im Zeisschen Spektrophotometer PMQ II beim jeweiligen Absorptionsmaximum gemessen. Da beim geschilderten Aufarbeitungsgang mit Hydrolysenverlusten zu rechnen ist, wurde er nur als semiquantitativ bezeichnet.

Zur qualitativen Analyse wurde außer der DC in den genannten drei Lösungsmitteln auch die Papierchromatographie in Benzol-Propionsäure-Wasser (2:2:1) (HATS und MACEK 1958) herangezogen. Die Lokalisierung und weitere Charakterisierung der getrennten Flavonol-Aglyka erfolgte durch Betrachten der Chromatogramme im Tageslicht und im UV bei 360 m μ , durch Besprühen mit Naturstoffreagens A, mit basischem Bleiacetat und mit Aluminiumchlorid sowie durch

Spektrophotometrie. Von den Sprühreagentien (Zusammensetzung nach STAHL 1962) erwies sich Naturstoffreagens A als das weitaus brauchbarste.

Zur Bestimmung der Flavonol-Aglyka in Blattmaterial wurde zur weitgehenden Entfernung der Chlorophylle und ihrer Abbauprodukte zunächst nach HÄNSEL (1959) aufgearbeitet. Die Flavonol-Extrakte wurden dann wie oben hydrolysiert und durch DC fraktioniert. Auch Blütenmaterial wurde gelegentlich ebenso aufgearbeitet, doch war bei den nahezu chlorophyllfreien Blüten dadurch keine wesentliche Verbesserung zu erzielen.

d) Qualitative Aufarbeitung auf Zimtsäuren. Um den Gesamtbestand an freien, glykosidierten und veresterten Zimtsäuren zu erfassen, wurde in getrennten Arbeitsgängen sauer und alkalisch hydrolysiert. Saure Hydrolyse: Gefriergetrocknetes Blatt- oder Blütenmaterial wurde bis zur Farblosigkeit mit Methanol-HCl extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum getrocknet, in 2n HCl aufgenommen und 1 Std am Rückflußkühler hydrolysiert (IBRAHIM und TOWERS 1960). Die Hydrolysate wurden in Methanol-HCl überführt. Alkalische Hydrolyse: Trockenpulver wurde mit 2n NaOH 5 Std lang bei Raumtemperatur hydrolysiert (etwa 100 mg Trockenpulver auf 5 ml 2n NaOH). Bei einem Vergleich von unter Luft und unter Wasserstoff angesetzten Hydrolysen zeigten sich keine qualitativen Unterschiede. Routinemäßige qualitative Analysen konnten deshalb unter Luft vorgenommen werden. Die weitere Aufarbeitung der Hydrolysate erfolgte meist nach IBRAHIM und TOWERS mit anschließender Überführung in Methanol-HCl. Wenn nur wenig Trockenpulver zur Verfügung stand, wurde die Ätherausschüttelung des angesäuerten Hydrolysates auch ohne weitere Fraktionierung in Methanol-HCl übernommen. Die Auftrennung der Methanol-HCl-Lösungen erfolgte durch Papierchromatographie in Benzol-Propionsäure-Wasser (2:2:1) (HAIS und MACEK 1958) und durch DC in den drei bei der Trennung der Flavonol-Aglyka genannten Fließmitteln. Zum Teil wurden papierchromatographisch erhaltene Säuren dann noch der DC unterworfen. Bei der DC war es notwendig, dasselbe Hydrolysat in Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure und auch in Benzol-Dioxan-Eisessig zu trennen. Im ersten Lösungsmittel erhält man nach steigendem R_f -Wert geordnet Kaffeesäure, Sinapinsäure, p-Cumarsäure zusammen mit Säure X (vgl. Ergebnisse) und schließlich Ferulasäure, im zweiten Lösungsmittel Kaffeesäure, Sinapinsäure zusammen mit p-Cumarsäure, Säure X und dann Ferulasäure. Die Lokalisierung und weitere Charakterisierung erfolgte durch Betrachten der Platten im UV bei 360 m μ (dann DC auf Kieselgel G) und bei 254 m μ (dann DC auf Kieselgel GF₂₅₄), durch Besprühen mit Echtblausalz B, FeCl₃, 2,4-Dichlorchinonchlorimid, Roux-Reagens und Anisaldehyd (bestes Reagens in unserem Fall Echtblausalz B; Zusammensetzung der Reagentien nach STAHL 1962) und durch Spektrophotometrie nach Elution aus dem Kieselgel mit Methanol-HCl. Bei längerem Liegen werden die Säuren auch bei Tageslicht in charakteristischen Farben auf den Platten sichtbar.

Bei allen qualitativen Analysen auf Anthocyanidine, Flavonol-Aglyka und Zimtsäuren wurden authentische Stoffe auf verschiedene Weise, bei der DC vor allem auch im Mischchromatogramm, zum Vergleich herangezogen. Die Substanzen wurden großenteils von der Fa. Carl Roth, Karlsruhe, geliefert.

Isotopenversuche. a) Applikation. Isotopenversuche wurden nur mit dem Cyanidin- und mit dem Delphinidintyp durchgeführt. Phenylalanin(1-¹⁴C) des Radiochemical Centre, Amersham, wurde auf folgende Weise zugeführt: 10–15 cm unterhalb des Sproßgipfels wurde ein Reagensglas 70 × 8 mm am Sproß befestigt. Ein entfetteter Baumwollfaden wurde mit einer Nadel durch die Sproßachse hindurchgezogen (MACOVSKI 1958) und mit seinen beiden freien Enden in das Glas eingeführt. Zur Herabsetzung der Verdunstung wurde der Faden zwischen

Glas und Sproß durch einen ausgekochten Gummischlauch geleitet und die Anschlußstelle zwischen Schlauch und Sproß mit Wachspapier umkleidet. Anschließend wurde die radioaktive Lösung in die Gläser gegeben. Jeder Versuchsansatz bestand aus sechs Pflanzen, die zunächst je 1 ml einer wäßrigen Lösung von Phenylalanin ($1-^{14}\text{C}$) mit 2×10^6 ipm und nach rund 24 Std nochmals die gleiche Dosis erhielten. Die Versuchsanordnung war für beide Genotypen gleich und läßt sich aus Tabelle 2 ersehen.

Tabelle 2. Applikation von Phenylalanin ($1-^{14}\text{C}$) und Bestimmung der Radioaktivität

Nr.	Applikation der ersten ^{14}C -Phenylalanin-Dosis (zweite etwa 24 Std danach)	Bestimmung der Radioaktivität
1 a	Knospentadium 1	24 Std entfaltete Blüte
1	Knospentadium 1	Knospentadium 2
2	Knospentadium 2	Knospentadium 3
3	Knospentadium 3	24 Std entfaltete Blüte

b) Aufarbeitungen. Anthocyane. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Aufarbeitung kam es nicht auf eine quantitative Erfassung der Anthocyane, sondern auf eine Beseitigung aller eventuell ebenfalls aktiver Substanzen wie vor allem der Flavonole und Zimtsäuren an. Dazu wurde gefriergetrocknetes Material wie beschrieben mit Äthylacetat homogenisiert und gewaschen und dann zwei- bis dreimal mit Methanol-HCl extrahiert. Aus den erhaltenen Extrakten wurden die Anthocyane vorsichtig mit Äthylacetat gefällt. Anschließend wurde noch 30 min bei Raumtemperatur im Äthylacetat gerührt. Dann wurden die Anthocyane abzentrifugiert, in etwas Methanol-HCl aufgenommen und wie oben, nur auf 500μ dicken Kieselgelschichten in Bandform getrennt. Die einzelnen Anthocyanbänder wurden mit Methanol-HCl eluiert, aus dem Methanol-HCl nochmals mit Äthylacetat gefällt und schließlich wieder in Methanol-HCl aufgenommen. Nach Abzentrifugieren ungelöster Verunreinigungen wurde die Extinktion der Lösungen im Photometer Eppendorf bei $546 m\mu$ gemessen (die Extinktionsmaxima unserer Anthocyane lagen nach Elution aus dem Kieselgel mittels Methanol-HCl und gemessen in Methanol-HCl um $530 m\mu$). In einem Teil der gleichen Lösung wurde die Radioaktivität bestimmt.

Flavonole und Zimtsäuren wurden wie oben aufgearbeitet. Die Bestimmung der Flavonol-Aglyka wurde routinemäßig bei $366 m\mu$ im Photometer Eppendorf vorgenommen (Extinktionsmaxima in Methanol-HCl-Eluaten aus Kieselgel für Kämpferol $361 m\mu$, für Quercetin $363 m\mu$), die der Zimtsäure bei ihrem jeweiligen Absorptionsmaximum im Bereich von $310-330 m\mu$ für Methanol-HCl-Eluate aus Kieselgel im Zeisschen Spektrophotometer PMQ II. In einem Teil derselben Lösungen wurde die Radioaktivität bestimmt.

Spezifische Aktivität. Von keinem der in unseren Petunien vorliegenden Anthocyane war uns der molare Extinktionskoeffizient bekannt. Die spezifische Aktivität wurde deshalb in ipm/ml Lösung/ $E_{546} m\mu$ derselben Lösung angegeben. Man erhält so für ein und dasselbe Anthocyan vergleichbare Werte und auch von Anthocyan zu Anthocyan ist ein Vergleich möglich, weil nach Angaben von HARBORNE die Differenzen in den Extinktionskoeffizienten verschiedener Anthocyane und Anthocyanidine nur gering sind. Nach einer persönlichen Mitteilung von J. B. HARBORNE, für die ihm auch an dieser Stelle gedankt sei, liegen die Extinktionskoeffizienten für Pel [SONDHEIMER and KERTESZ, J. Amer. Chem. Soc. **70**, 3476 (1948)], Del [SPAETH, Anal. Chem. **22**, 1321 (1950)], Cya-3-rutinosid, Cya-3-galactosid, Pel-3,4-diglucosid zwischen 30,0 und 34,0. Ein bei Del-3,5-diglucosid

ermittelter etwas niedriger Wert wird nach HARBORNE wohl durch die geringe Löslichkeit der Substanz vorgetäuscht.

Die spezifische Aktivität der Flavonol-Aglyka wurde entsprechend in ipm/1 ml Lösung/ $E_{366} m\mu$ derselben Lösung, die der Zimtsäuren in ipm/1 ml Lösung/ $E\lambda_{max}$ derselben Lösung angegeben.

Messungen der Radioaktivität wurden mit Hilfe des Methandurchflußzählers FH 407 mit Handprobenwechsler FH 411 und des Strahlenmeßgerätes FH 49 der Fa. Frieseke und Hoepfner, Erlangen-Bruck, durchgeführt.

Abkürzungen: CoA = Co-Enzym A, DC = Dünnschichtchromatographie, ipm = Impulse pro Minute, spez. Akt. = spezifische Aktivität, Pel = Pelargonidin, Cya = Cyanidin, Pao = Päonidin, Del = Delphinidin, Pet = Petunidin, Mal = Malvidin, G = Monoglucosid, GG = Diglucosid.

Ergebnisse

I. Die Phenylpropanderivate der Blüten

1. Anthocyane. Die Anthocyane der benützten Genotypen waren nach Untersuchungen von BIRKOFER (unveröffentlicht) und darauf basierenden Ergänzungen von MEYER (Dissertation Köln, in Bearbeitung) bekannt. Der Cyanidintyp enthält Cya-3-G, Cya-3-GG, Pao-3-G, Del-3-G und Pet-3-G, der Delphinidintyp Del-3-G, Pet-3-G, Pet-3-GG und Mal-3-G, der Mischtyp alle eben genannten Anthocyane. Darüber hinaus kommen in geringen und geringsten Mengen noch weitere nicht identifizierte Anthocyane vor. Da für unsere Fragestellung die Art der vorliegenden Aglyka besonders wichtig war, führten wir saure Hydrolysen der einzelnen Anthocyane durch. Die Ergebnisse der Hydrolysen bestätigten hinsichtlich der Aglyka die obigen Angaben.

2. Flavonol-Aglyka. Ebenso wie bei den Anthocyanen war auch bei den Flavonolen vor allem die Art der Aglyka zu ermitteln. Der Glykosidierungszustand der Flavonole wurde nicht untersucht. Nach saurer Hydrolyse wurden in allen drei Genotypen zunächst Quercetin und Kaempferol festgestellt. Diese Daten stehen mit Befunden von BIRKOFER und KAISER (1962) in Übereinstimmung, die in anderen Linien von *Petunia* ebenfalls Glykoside des Quercetins und Kaempferols, in zwei Sorten außerdem noch ein Glykosid des Dihydroquercetins nachweisen konnten. Auch VAN WYK fand in ihren Linien Glykoside des Quercetins (VAN WYK 1962). Darüber hinaus ist in unseren Hydrolysaten aller drei Genotypen in geringen Mengen aber noch ein weiteres Aglykon enthalten, das sich bislang nur über die empfindliche DC fassen ließ. Es stimmt in allen überprüften Daten mit Myricetin überein.

3. Zimtsäuren. An Zimtsäurederivaten konnten in allen drei Genotypen nach alkalischer Hydrolyse mit Sicherheit Kaffeesäure und p-Cumarsäure identifiziert werden. Dieses mit Hilfe der üblichen Methoden gewonnene Ergebnis konnte durch Isotopenversuche abgesichert und erweitert werden. Alkalische Hydrolysate aus Pflanzen, die Phenylalanin ($1-^{14}C$) erhalten hatten, wurden im Mischchromatogramm mit

authentischer Kaffeesäure, Sinapinsäure, p-Cumarsäure und Ferulasäure getrennt. Das Mischchromatogramm war auch deshalb notwendig, weil nur so wenig radioaktives Hydrolysat zur Verfügung stand, daß nur die mengenmäßig vorherrschende Kaffeesäure eben noch auf Grund ihrer Fluoreszenz hätte lokalisiert werden können. Am Ort aller vier Säuren fand sich nach DC in Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure und in Benzol-Dioxan-Eisessig Aktivität. Im zweiten Lösungsmittel getrennte Säuren wurden eluiert und nochmals im gleichen Fließmittel chromatographiert. Die spez. Akt. in Sinapinsäure + p-Cumarsäure (vgl. Methoden) und in der Ferulasäure sank dabei nicht ab. Für Kaffeesäure ließ sich keine entsprechende Aussage machen, weil sie während der wiederholten Arbeitsgänge weitgehend zerstört wurde.

An unbekanntem Substanzen fiel in allen drei Genotypen ein im UV bei $360\text{ m}\mu$ blaufluoreszierender Stoff auf, der bei der Papierchromatographie und der DC stets einen etwas geringeren R_f -Wert als Ferulasäure aufweist. Er wird im folgenden als Säure X bezeichnet. Die Farben im UV, nach Besprühen mit den unter Methoden genannten Reagentien und nach Lagern der Platten sind die gleichen wie bei Ferulasäure. Eine erste Charakterisierung ist möglich: Säure X verhält sich bei der Ätherfraktionierung nach IBRAHIM und TOWERS (1960) tatsächlich wie eine Säure. Es handelt sich um einen C_6-C_3 -Körper, denn nach Applikation von Phenylalanin($1-^{14}C$) entsteht radioaktive Säure X. Für das Vorhandensein mindestens einer phenolischen Hydroxylgruppe sprechen die Farbreaktionen. Der Test auf Methoxylgruppen und $N-CH_3$ -Gruppen nach FEIGL (1960) fiel positiv aus. Da sich eine Verbindung mit der Gruppierung $N-CH_3$ nicht wie Säure X aus salzsaurer Lösung mit Äther ausschütteln läßt, muß mindestens eine Methoxylgruppe vorhanden sein. Säure X ist also eine C_6-C_3 -Säure mit mindestens einer Hydroxyl- und mindestens einer Methoxylgruppe.

In sauren Hydrolysaten sind weniger Säuren enthalten, insbesondere weniger Kaffeesäure. Die qualitative Zusammensetzung ist die gleiche wie nach alkalischer Hydrolyse. Die geringere Ausbeute dürfte z.T. damit im Zusammenhang stehen, daß die Zimtsäuren recht säureempfindlich besonders beim Erhitzen sind, aber auch damit, daß bei alkalischer Hydrolyse Zuckerester der Zimtsäuren gespalten werden, bei saurer dagegen nicht (IBRAHIM und TOWERS 1960). Solche Zimtsäure-Zuckerester sind für Petunien durch BIRKOFER, KAISER und KOSMOL (1960) bereits festgestellt worden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in allen drei Genotypen die gleichen Zimtsäuren enthalten sind: der fallenden Konzentration nach Kaffeesäure, Säure X, p-Cumarsäure, Spuren von Sinapin- und Ferulasäure. Auch weitere noch nicht identifizierte Phenolkörper finden sich in allen drei Genotypen gleichermaßen.

Tabelle 3. *Phenylpropan-Derivate in den Blüten der untersuchten Genotypen*

Zugleich der Substituenten vgl. die Formeln. Das Vorkommen einer Substanz wird durch + gekennzeichnet, (+) bedeutet, daß der Stoff nur über Isotopenversuche faßbar war.

	Substituenten					
	R ₁ = R ₂ = H R ₃ = OH	R ₁ = R ₂ = OH R ₃ = H	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH, R ₃ = H	R ₁ = R ₂ = R ₃ = OH	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = R ₃ = OH	R ₁ = R ₂ = OCH ₃ , R ₃ = OH
Zimtsäure	p-Cumar- säure	Kaffee- säure	Ferula- säure			Sinapin- säure
Cyanidintyp	+	+	(+)	—	—	(+)
Delphinidintyp	+	+	(+)	—	—	(+)
Mischtyp	+	+	(+)	—	—	(+)
Flavonol	Kaempferol	Quercetin	Isorhamnetin	Myricetin		
Cyanidintyp	+	+	—	+	—	—
Delphinidintyp	+	+	—	+	—	—
Mischtyp	+	+	—	+	—	—
Anthocyanidin	Pelargonidin	Cyanidin	Päonidin	Delphinidin	Petunidin	Malvidin
Cyanidintyp	—	+	+	+	+	—
Delphinidintyp	—	—	—	+	+	+
Mischtyp	—	+	+	+	+	+

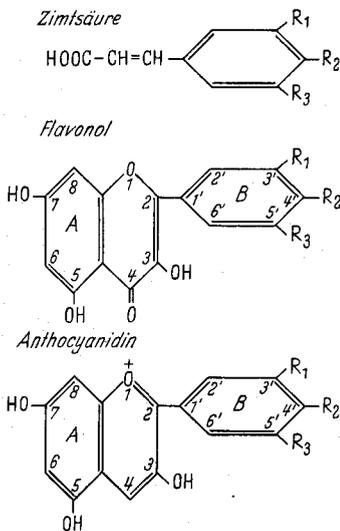


Tabelle 3 orientiert über die in den drei reinen Linien aufgefundenen Phenylpropane (vgl. dazu auch die Formeln). Dabei fällt auf, daß die Besetzung mit Zimtsäuren und mit Flavonol-Aglyka einheitlich ist. Die Anthocyane dagegen entsprechen sich in der Substituierung ihres Ringes B weder untereinander von Genotyp zu Genotyp, noch stimmen sie darin mit den Zimtsäuren oder Flavonolen überein.

Ergänzend wurden auch die Phenylpropane der Blätter untersucht. Anthocyane sind nicht vorhanden. An Flavonol-Aglyka ließen sich Kaempferol und Quercetin auffinden, Myricetin nicht.

Doch ist es möglich, daß Spuren von Myricetin durch Chlorophyll-Abbauprodukte verdeckt werden, die nicht gänzlich aus den Extrakten entfernt werden konnten. An Zimtsäuren

waren Kaffeesäure, p-Cumarsäure, Säure X und Sinapinsäure vorhanden. Ferulasäure war nicht faßbar. Allerdings wurden die Blätter nicht zu Isotopenversuchen herangezogen, so daß der dadurch bei Blüten geführte Nachweis der Ferulasäure nicht möglich war. — Alte und junge Blätter aus allen drei Genotypen wiesen dieses Spektrum an Phenylpropanen auf, das mit dem der Blüten mit Ausnahme des Myricetins und der Ferulasäure übereinstimmt.

II. Phasen der Anthocyanbildung

Zu den folgenden Untersuchungen wurden vor allem der Cyanidintyp und der Delphinidintyp, der Mischtyp nur zur Ergänzung herangezogen.

1. Frischgewicht und Trockengewicht in den einzelnen Entwicklungsstadien. Abb. 1 zeigt die Veränderungen des Frisch- und des Trockengewichtes während der Entwicklung von der Knospe zur Blüte. Bei beiden Genotypen steigen Frisch- und auch Trockengewicht beim Übergang vom jeweiligen Knospenstadium 2 nach 3 am stärksten an.

2. Zimtsäuren. In jedem Knospenstadium aller drei Genotypen findet sich das für die Blüten geschilderte Zimtsäurespektrum. Nach dem Schema der Tabelle 2 wurden Isotopenversuche durchgeführt. Aus den behandelten Pflanzen gewonnene alkalische Hydrolysate wurden im Gemisch mit authentischen Substanzen durch DC mit dem Fließmittel Benzol-Dioxan-Eisessig getrennt. Die Verteilung der Aktivität war wie oben im Abschnitt I 3 geschildert. In allen Knospenstadien jedes der drei Genotypen können also Zimtsäuren aus Phenylalanin ($1-^{14}\text{C}$) gebildet werden.

3. Flavonol-Aglyka. In jedem Entwicklungsstadium aller drei Linien finden sich Kaempferol und Quercetin, während sich Myricetin in den ersten Knospenstadien noch nicht fassen ließ. Die Möglichkeit von Hydrolysenverlusten und die Schwierigkeit, in Eluat aus Kieselgel G trotz der stets durchgeführten Bezugnahme auf Blindeluate bei niederen Wellenlängen quantitativ zu photometrieren, lassen exakte Bestimmungen nicht zu. Immerhin sei erwähnt, daß in allen drei Genotypen Kaempferol und Quercetin nach den erhaltenen Meßwerten zur Blüte hin zunehmen. Myricetin wurde nicht bestimmt. Daß in der Tat eine

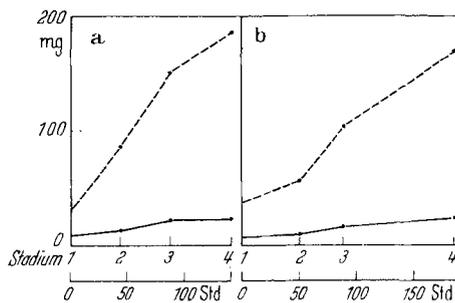


Abb. 1 a u. b. Frisch- und Trockengewicht während der Blütenentwicklung. — Frischgewicht einer Knospe (Stadium 1—3) oder Blüte (Stadium 4), ---- Trockengewicht einer Knospe (Stadium 1—3) oder Blüte (Stadium 4). a Cyanidintyp, b Delphinidintyp

Flavonolsynthese auch noch in den letzten Entwicklungsstadien stattfindet, zeigt sich an der Aufnahme von Phenylalanin ($1-^{14}C$) in die Flavonol-Aglyka (Tabelle 4). Es war früher angenommen worden, bei Petunien würden Flavonole im Lauf der Blütenentwicklung in Anthocyane umgewandelt (STÖRMER und v. WITSCH 1937). Beim Buchweizen ist das nachgewiesenermaßen nicht der Fall (GRISEBACH und BOPP 1959). Die Möglichkeit einer solchen Umwandlung läßt sich durch unsere Daten nicht ausschließen. Doch es konnte gezeigt werden, daß der Grundvorgang, auf dem STÖRMER und v. WITSCH ihre Annahme von der Umwandlung basierten, das Verschwinden von Flavonolen und das gleichzeitige

Tabelle 4. *Spez. Akt. der Flavonolaglyka Kaempferol und Quercetin in verschiedenen Entwicklungsstadien*
(Versuchs-Nr. nach Tabelle 2)

Genotyp	Flavonol	Spez. Akt. der Gesamtmenge an Flavonol			
		Nr. 1a	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3
Cyanidintyp	Kaempferol	28	80	11	16
	Quercetin	50	64	15	18
Delphinidintyp	Kaempferol	6	7	5	3
	Quercetin	40	18	18	5

Erscheinen von Anthocyanen, durchaus nicht in allen Linien von *Petunia hybrida* stattfindet. Es sei angefügt, daß auch bei *Primula obconica* der Flavonolspiegel von der Anthocyanbildung nicht beeinflußt wird (REZNIK 1962).

4. Anthocyane (vgl. Abb. 2 und 3). a) Erstes Auftreten und Zunahme der einzelnen Anthocyane während der Blütenentwicklung. Im Delphinidintyp fand sich im ersten Knospenstadium nur Del-3-G, im zweiten Stadium kamen dann Pet-3-G, Pet-3-GG und Mal-3-G hinzu, wobei die Menge pro Knospe in der angegebenen Reihenfolge abnahm. In den nächsten Stadien nehmen alle Anthocyane zu, wobei der Anstieg beim Übergang von Stadium 2 nach 3 am steilsten ist.

Für den Cyanidintyp gilt: im Stadium 1 finden sich Cya-3-G, Cya-3-GG, Pao-3-G und Del-3-G. Vorherrschend ist Cya-3-G, gefolgt von seinem Diglucosid, Pao-3-G ist in geringerer Menge, Del-3-G nur in Spuren vorhanden. Erst im dritten Stadium läßt sich Pet-3-G nachweisen. Qualitativ wurden noch jüngere Knospen als solche im Stadium 1 untersucht. In ihnen fanden sich nur Cya-3-G und etwas Cya-3-GG.

Der Mischtyp wies in Stadium 1 überwiegend Cya-3-G, weniger Cya-3-GG und in Spuren Del-3-G auf. Die methylierten Anthocyane treten erst im zweiten Knospenstadium auf. Gruppiert man im zweiten Stadium nach fallender Konzentration, so ergibt sich die Reihenfolge

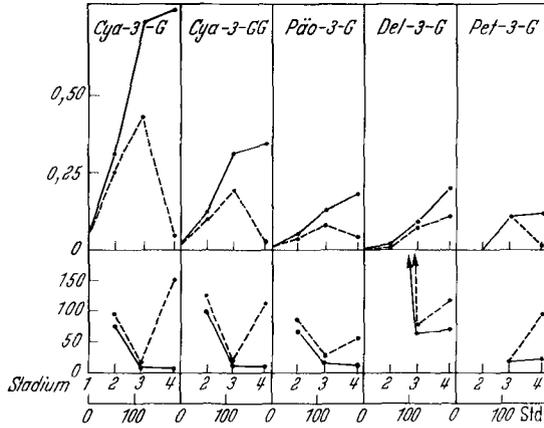


Abb. 2. Zuwachs und spez. Akt. der einzelnen Anthocyane des Cyanidintyps während der Blütenentwicklung. Obere Hälfte: Abszisse wie für die untere Hälfte, Ordinate: EA_{max} /Trockensubstanz einer Knospe oder Blüte. — Gesamtmenge des betreffenden Anthocyans, ---- Zuwachs des betreffenden Anthocyans von Stadium zu Stadium. Untere Hälfte: Abszisse: Entwicklungsstadien und Stunden, Ordinate: spez. Akt. — spez. Akt. der Gesamtmenge des betreffenden Anthocyans, ---- spez. Akt. des Zuwachses des betreffenden Anthocyans von Stadium zu Stadium. Phenylalanin ($1-^{14}C$) wurde nach Tabelle 2, Nr. 1—3, zugeführt. Es wurde also jeweils Phenylalanin in einem Stadium gegeben und nach Übergang der Knospen in das nächste Stadium die spez. Akt. bestimmt. An den jeweiligen Versuchspflanzen waren nur Knospen des betreffenden Stadiums belassen worden

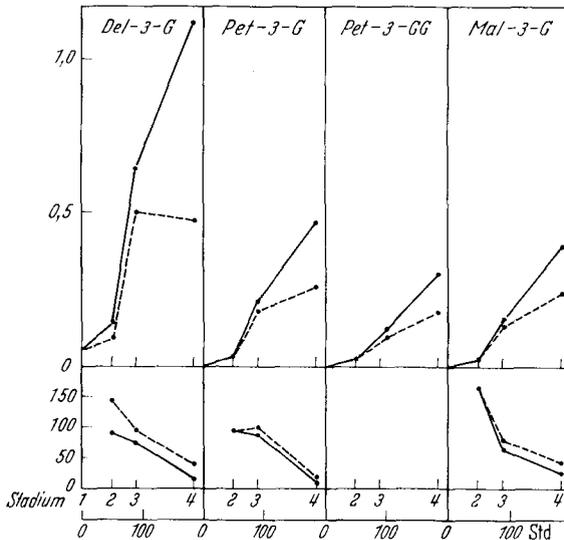


Abb. 3. Zuwachs und spez. Akt. der einzelnen Anthocyane des Delphinidintyps während der Blütenentwicklung. Sonstige Legende wie zu Abb. 2

Cya-3-G, Del-3-G, Pet-3-G, Cya-3-GG, Pet-3-GG, Pao-3-G, Mal-3-G. Eine auffällige Verschiebung in der weiteren Entwicklung ergibt sich

daraus, daß Pet-3-GG, das im Stadium 1 noch fehlte, gegen Ende der Blütenentwicklung Cya-3-GG mengenmäßig übertrifft.

In allen drei Genotypen treten die einfachen Anthocyane früher auf als die etwas komplizierteren. Für die Aglyka ist die Abfolge im Delphinidintyp Del, Pet, Mal, im Cyanidintyp Cya, Del, Pao, Pet. Auch im Mischtyp findet sich zuerst Cya und weniger Del.

Was den Glykosidierungsstatus angeht, so treten wie bei *Primula obconica* (REZNIK 1962) die Monoglucoside vor den entsprechenden Diglucosiden auf.

Zum Verlauf des Zuwachses läßt sich sagen, daß er von Anthocyan zu Anthocyan sehr ähnlich sein kann. Es ist das um so mehr oder weniger der Fall, je näher oder ferner die chemische Verwandtschaft der betreffenden Anthocyane ist (vgl. im Cyanidintyp Cya-3-G, Cya-3-GG und Pao-3-G einerseits mit Del-3-G andererseits).

Der Zeitpunkt stärkster Anthocyanzunahme liegt für den quantitativ untersuchten Cyanidintyp und Delphinidintyp für alle Anthocyane mit Ausnahme des Del-3-G im Cyanidintyp beim Übergang von Stadium 2 nach 3. Er fällt somit mit der Physe des steilsten Anstieges im Frisch- und Trockengewicht zusammen (Abb. 1).

Es fragt sich, welches die Ursachen für die Reihenfolge im Auftreten der Anthocyane sein könnten. Dabei sind für unsere Zielsetzung die Verhältnisse im Seitenphenyl wichtiger als der Glykosidierungsstatus. Einmal wäre es denkbar, daß die den Seitenring verändernden Gene nacheinander „aktiviert“ werden, was eine entsprechende Reihenfolge im Auftreten der Anthocyanidine mit sich bringen müßte. Zum anderen könnte die Reihenfolge darauf zurückzuführen sein, daß die Pflanze zunächst einfache Zwischenstufen und daraus einfache Anthocyane bildet. Die einfachen Zwischenstufen werden aber auch in kompliziertere Zwischenstufen umgewandelt, die dann nach der durch ihren Umbau bedingten Verzögerung zur Synthese der abgeleiteten Anthocyane eingesetzt werden. Solche Zwischenstufen könnten C_6-C_3 - oder $C_6-C_3-C_6$ -Körper sein. Zwar scheint die Fähigkeit, C_6-C_3 -Körper zu bilden, in Blättern und in Blüten aller Entwicklungsstadien völlig gleich zu sein. Doch muß berücksichtigt werden, daß die Synthese der Anthocyane von analytisch nicht erfaßten Phenylpropanen ausgehen könnte. C_6-C_3 -Körper dürfen also im gegebenen Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden.

b) Isotopenversuche an Anthocyanen. Mit Hilfe von Phenylalanin-(1- ^{14}C) wurde versucht, solche Zwischenstufen nachzuweisen und zu entscheiden, ob es sich bei eventuell vorhandenen Zwischenstufen um C_6-C_3 - oder um $C_6-C_3-C_6$ -Körper handelt.

Gibt man aktives Phenylalanin als Vorstufe des Ringes B, so sollten sich daraus und aus in den Pflanzen schon vorliegenden Zwischenstufen

Anthocyane einer bestimmten spez. Akt. bilden. Voraussetzung ist, daß zum gegebenen Zeitpunkt überhaupt noch das $C_6-C_3-C_6$ -Gerüst unter Verwendung von C_6-C_3 -Einheiten gebildet wird. Falls die Verzögerung im Auftreten der höher substituierten Anthocyane tatsächlich auf die ja nur geringfügige Verlängerung des Biosyntheseweges (Einfügen neuer Substituenten in den Ring B) zurückgehen sollte, müßte eine gleiche Verzögerung im Auftreten der einzelnen radioaktiven Anthocyane nach Applikation von Phenylalanin ($1-^{14}C$) eintreten. Denn auch die Vorstufe Phenylalanin muß durch einen entsprechend längeren Syntheseweg hindurchgeschleust werden, um in komplizierten Anthocyanen auftreten zu können, als das bei einfachen Anthocyanen der Fall ist. Nach einer nicht allzu langen Zeitspanne sollten dann komplizierte Anthocyane eine niedrigere spez. Akt. aufweisen als einfache, weil die von Phenylalanin abgeleiteten radioaktiven Zwischenstufen für ihre Synthese erst später zur Verfügung stehen.

Auch eine Bereitstellung von Zwischenstufen für ein bestimmtes Anthocyan vor Beginn seiner Synthese ist denkbar. Nach Zufuhr von radioaktivem Phenylalanin sollte sie sich ebenfalls an einer niederen spez. Akt. dieses Anthocyan im Vergleich mit anderen Anthocyanen zu erkennen geben. Denn je mehr Zwischenstufen vorhanden sind, desto stärker müßte die über Phenylalanin eingebrachte Radioaktivität verdünnt werden.

Daß Phenylalanin den Seitenring und die C-Atome 2, 3, 4 des mittleren Heterocyclus stellen kann, war für vegetatives Material bekannt (vgl. die eingangs genannte Literatur). Es blieb festzustellen, ob auch in die Anthocyane der Blüten von *Petunia* Phenylalanin-Derivate aufgenommen werden. Dazu wurde Phenylalanin ($1-^{14}C$) nach dem Schema der Tabelle 2 zugeführt. Sowohl im Delphinidin- als auch im Cyanidintyp waren die jeweils vorhandenen Anthocyane radioaktiv. Die nach einer ersten DC ermittelte spez. Akt. der einzelnen Anthocyane blieb auch nach wiederholten Fällungen mit Äthylacetat und jeweils anschließender erneuter DC konstant. Nachdem so mit Sicherheit festgestellt worden war, daß die Anthocyane Radioaktivität aufwiesen, wurden die Glykoside salzsauer hydrolysiert. Nach dünnschichtchromatographischer Trennung waren alle in unseren Anthocyanen vorkommenden Aglyka aktiv. Der Modus des Einbaus wurde nicht weiter verfolgt, da er kaum anders sein dürfte als in vegetativem Material.

Isotopenversuche während der Blütenentwicklung zeigten, daß in allen Knospenstadien Phenylalanin ($1-^{14}C$) zur Bildung der Anthocyane herangezogen werden kann. Dabei weisen sowohl der Zuwachs schon vorhandener Anthocyane als auch erstmalig auftretende Anthocyane Aktivität auf (Abb. 2 und 3). Wenn also überhaupt neue Anthocyane in Erscheinung treten, so geschieht das auf der Basis einer Synthese des

C₆-C₃-C₆-Skelets unter Verwendung von C₆-C₃-Bausteinen, die z.T. aus der Vorstufe Phenylalanin gebildet werden können.

Die Höhe der spez. Akt. wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Phenylalanin wurde innerhalb der relativ kurzen Zeitspanne zwischen zwei Knospenstadien zweimal im Abstand von 24 Std gegeben. Obwohl die Pflanzen die radioaktive Lösung stetig aufsaugen, ist es keinesfalls sicher, daß die Zufuhr von Phenylalanin in die Knospen zwischen zwei Stadien gleichbleibt. Weiterhin dürfte Phenylalanin in je nach dem Stadium wechselnden Mengen auch in andere Substanzen wie Proteine und Lignin übernommen werden. Der jeweils für die Anthocyan synthese verfügbare Prozentsatz des gesamten Phenylalanins kann also recht verschieden sein.

Hinzu kommt, daß je nach dem Knospenstadium auch mehr oder weniger Anthocyan gebildet wird. Zu Zeiten einer besonders starken Verdünnung des eingesetzten Phenylalanin (1-¹⁴C) durch alle oder einen der genannten Prozesse muß die spez. Akt. abfallen. Im Cyanidintyp ist das nur vorübergehend während der stärksten Trockengewichts- und auch Anthocyanzunahme von Stadium 2 nach 3 der Fall, im Delphinidintyp sinkt die spez. Akt. mit der Weiterentwicklung der Knospen stetig ab.

Obwohl die genannten Faktoren die Verwendung von radioaktivem Phenylalanin zur Anthocyan synthese beeinflussen, kann der Verlauf der spez. Akt. während der Blütenentwicklung für einzelne Anthocyane sehr ähnlich sein. Im Cyanidintyp lassen sich die Linien für Cya-3-G und Cya-3-GG fast zur Deckung bringen und auch Pao-3-G kann angeschlossen werden. Es spricht das für eine über mehrere Schritte hinweg gemeinsam oder parallel verlaufende Biosynthese, wie sie der konstitutionsmäßigen Verwandtschaft der Substanzen entspricht. Größere Abweichungen finden sich im Cyanidintyp beim Del-3-G. Wie die spez. Akt. beim Pet-3-G des gleichen Typs verläuft, läßt sich nicht eindeutig sagen, da nur die Aktivität in den beiden letzten Stadien bestimmt werden konnte.

Im Delphinidintyp liegt der erste Wert für Pet-3-G verglichen mit Del-3-G etwas zu niedrig, der für das in der Delphinidinreihe am weitgehendsten substituierte Mal-3-G dagegen etwas höher, obwohl man nach der Zwischenstufenhypothese gerade bei ihm die niedrigste spez. Akt. hätte erwarten sollen.

Die Isotopenversuche ließen keine niedrigere spez. Akt. der später auftretenden Anthocyane erkennen. Von geringeren Variationen nach oben oder unten abgesehen, ist der Verlauf der spez. Akt. für einen gegebenen Genotyp von Anthocyan zu Anthocyan durchaus vergleichbar. Die einzige erhebliche Abweichung innerhalb der spez. Akt. eines Genotyps stellt der erste Meßwert für Del-3-G im Cyanidintyp dar. Doch handelt es sich hier um eine Erhöhung, nicht um eine Senkung der spez. Akt.

Besprechung der Ergebnisse

I. Phasen der Anthocyanbildung

In den untersuchten Linien von *Petunia hybrida* treten im Lauf der Blütenentwicklung Anthocyanidine mit einfacher Substitution des Seitenphenyls früher auf als solche mit vergleichend chemisch davon ableitbarer, komplizierter Substitution. Erklärungsmöglichkeiten hierfür sind: 1. Zunächst werden einfach substituierte Zwischenstufen gebildet, die zum Aufbau gleichartig substituierter Anthocyanidine verwendet werden. Sie werden aber auch in komplizierter substituierte Zwischenstufen überführt, aus denen dann etwas später entsprechend substituierte Anthocyanidine hervorgehen. 2. Die Gene, die auf die Substitution des Ringes B Einfluß nehmen, realisieren ihre Potenzen in einer bestimmten zeitlichen Abfolge. Erste Daten über die bei *Petunia* in dieser Hinsicht wirksamen Gene liegen vor (PARIS und HANEY 1958, BIANCHI 1960, MOSIG 1960). Eine weitere genetische Analyse unter Einbeziehung der hier verwendeten Linien ist im Gange (MEYER, Dissertation Köln, in Bearbeitung).

Die Unterschiede zwischen den Anthocyanidinen und damit auch den entsprechenden Zwischenstufen sind gering. Es handelt sich um das Einfügen von Hydroxylgruppen in den Ring B und um die Methylierung solcher Hydroxyle. Die zugrunde liegenden biochemischen Reaktionen sollten leicht und schnell vor sich gehen. Eine wesentliche Verzögerung in der Fertigstellung stärker substituierter Anthocyanidine erscheint so wenig wahrscheinlich, sei aber in Betracht gezogen. Weiterhin wäre es denkbar, daß Zwischenstufen erst bis zu einem bestimmten Schwellenwert angesammelt werden müssen, bevor die Synthese des betreffenden Anthocyanidins beginnen kann. Wie im Abschnitt „Ergebnisse“ bereits ausgeführt, müßte sich eine Verzögerung aus einem der genannten Gründe daran erkennen lassen, daß nach Zufuhr von radioaktivem Phenylalanin die abgeleiteten, später auftretenden Anthocyanidine eine niedrigere spez. Akt. aufweisen als die schon früher vorhandenen einfacher substituierten Anthocyanidine.

Die Isotopenversuche lieferten keinerlei Anhaltspunkte für das Zutreffen einer solchen „Zwischenstufenhypothese“. Zunächst wird es unwahrscheinlich, daß solche Zwischenstufen $C_6-C_3-C_6$ -Einheiten sein könnten. Denn es gibt keinen Hinweis darauf, daß lediglich schon vorhandene $C_6-C_3-C_6$ -Zwischenstufen in gefärbte Anthocyanidine überführt würden, wenn ein neues Aglykon in Erscheinung tritt. Wird ein Anthocyanidin vermehrt oder tritt es erstmalig auf, so findet auch ein Aufbau des $C_6-C_3-C_6$ -Skelets unter Verwendung von Phenylalanin ($1-^{14}C$) statt. Vor allem aber zeigt es sich, daß die spez. Akt. erstmalig erscheinender Anthocyanidine gegenüber der spez. Akt. des Zuwachses schon

vorhandener Anthocyanidine weder zum Zeitpunkt des ersten Auftretens noch während der weiteren Blütenentwicklung herabgesetzt ist. Phenylalanin ($1-^{14}\text{C}$) wird in alle Anthocyanidine aufgenommen, ohne daß sich ein Sonderstatus der abgeleiteten Aglyka nachweisen ließe.

Es bleibt somit die zweite Erklärungsmöglichkeit: eine zeitlich differentielle Genaktivität (BEERMANN 1952, Lit. MECHELKE 1963) führt zu der Reihenfolge im Auftreten der Anthocyanidine. Diese Reihenfolge mag mit der Abfolge der Substitutionsschritte in der Synthese übereinstimmen, ist jedoch kein sicheres Indiz hierfür.

II. Der Zeitpunkt der Substitution des Ringes B der Anthocyanidine

Bislang konnte noch nicht entschieden werden, ob die Substituenten des Ringes B schon im Stadium des freien $\text{C}_6\text{-C}_3$ -Bausteins oder erst nach der Bildung des $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ -Gerüsts eingeführt werden. Weder die genetischen noch die biochemischen Daten sind in dieser Hinsicht eindeutig (vgl. die eingangs genannte Literatur). Vielfach wurde versucht, aus dem Substitutionsmuster der verschiedenen, innerhalb der Versuchspflanzen vorliegenden Phenylpropane Hinweise auf den Zeitpunkt der Substitution zu gewinnen. Stimmen z. B. Zimtsäuren und Flavanoderivate in ihrem Substitutionsmuster überein und werden zudem noch Mechanismen nachgewiesen, die eine entsprechende Substitution der Zimtsäuren bewirken (GEISSMAN und SWAIN 1957, SCHMIDT 1962: Überführung von Phenylalanin in Zimtsäurederivate bei *Antirrhinum*), so sprechen solche Daten für eine Veränderung des Ringes B schon auf der Stufe von $\text{C}_6\text{-C}_3$ -Körpern.

In den hier untersuchten Linien ist die Substitution der Zimtsäuren, Flavonole und Anthocyanidine voneinander verschieden (vgl. Tabelle 3). Bei solchen Vergleichen muß berücksichtigt werden, daß die Zimtsäuren als mögliche Zwischenstufen der Flavonoidsynthese z. T. in so niedriger stationärer Konzentration vorliegen könnten, daß sie sich dem Nachweis entziehen. Es sei auch darauf hingewiesen, daß in den drei Linien noch unbekannte Phenole enthalten sind. Entscheidender als der noch ausstehende Nachweis eines Zimtsäurederivates, das einem vorhandenen Flavonol oder Anthocyanidin in der Substitution entspräche, muß demnach der umgekehrte Fall sein: die Existenz einer bestimmten Zimtsäure gegenüber dem Fehlen des entsprechenden Flavonols oder Anthocyanidins.

Aber auch unter Berücksichtigung dieses Gesichtspunktes entsprechen sich Zimtsäuren, Flavonole und Anthocyanidine der untersuchten Linien in ihrer Substitution nicht. So sind in den Blüten und Knospen aller drei Genotypen p-Cumarsäure und Kaffeesäure enthalten. Dennoch findet sich das der p-Cumarsäure entsprechende Pelargonidin in keinem Fall und obwohl Kaffeesäure die mengenmäßig vorherrschende

Zimtsäure ist, fehlt im Delphinidintyp das ihr entsprechende Cyanidin. Ähnliche Vergleiche wie zwischen dem Hydroxylierungsmuster der Zimtsäuren und Anthocyanidine lassen sich auch für die Methylierung der Anthocyanidine und für die Substitution der Flavonole durchführen. Die Daten ließen sich mit einer Veränderung des Ringes B erst auf der Stufe des C₆-C₃-C₆-Systems erklären. Für diese Möglichkeit sprechen besonders auch Befunde von GRISEBACH und PATSCHKE (1961), nach denen Buchweizen und Rotkohl in ein in 4'-Stellung hydroxyliertes Chalkon ein weiteres Hydroxyl in o-Stellung einfügen können, so daß schließlich Quercetin und Cyanidin resultieren. Allerdings bleibt zu klären, ob das eingesetzte Chalkon auch hinsichtlich der Substitution des Ringes B eine Zwischenstufe ist oder nur eine Vorstufe, die die Pflanze in einer Art Notfallmechanismus eben auch verwerten kann.

Nach der üblichen Betrachtungsweise lassen sich die Ergebnisse an den drei Linien von *Petunia* mit einer Substitution von C₆-C₃-C₆-Zwischenstufen erklären. Doch sei noch eine weitere Möglichkeit zur Diskussion gestellt, die an die Vorstellungen über den Mechanismus der Flavonoidsynthese anknüpft: Es darf angenommen werden, daß die Biosynthese von Flavonolen und Anthocyanidinen ebenso mit Zimtsäure-CoA-Verbindungen gestartet wird wie die von Fettsäuren und Aromaten mit Acetyl-CoA (Lit. LYNEN und TADA 1961). Falls die an der Startreaktion beteiligten Enzyme jeweils eine besonders hohe Affinität nur zu einem ganz bestimmten Zimtsäure-CoA-Derivat besitzen, läßt es sich verstehen, warum sich Zimtsäuren und Flavanderivate in ihrem Substitutionsmuster zwar entsprechen können, aber nicht entsprechen müssen. Es wäre dabei unnötig, den Zeitpunkt der Substitution auf C₆-C₃-C₆-Zwischenstufen zu verschieben. Denn aus einem „pool“ an C₆-C₃-Einheiten würden nur diejenigen zur Flavonol- und Anthocyan-synthese herangezogen, für deren Verwertung die Zelle Enzymsysteme mit entsprechender Spezifität ausbildet. Als Konsequenz dieser Vorstellung wäre auch der Mechanismus der den Seitenring verändernden Gene unter einem neuen Aspekt zu betrachten. Die Wirkung dieser Gene bestünde nicht in der Bildung von Enzymen, die Hydroxyl- und Methylgruppen in bestimmte Zwischenstufen einfügen, sondern in der Bereitstellung von Enzymen, die auf Grund ihrer Substratspezifität die Flavonoidsynthese mit dem CoA-Derivat jeweils nur einer bestimmten Zimtsäure einzuleiten vermögen.

Wie Analysen und Isotopenversuche zeigten, sind in den untersuchten Linien von *Petunia* die Mechanismen zur Bereitstellung eines Zimtsäurepools in den Blättern und allen Entwicklungsstadien der Blüten gleichermaßen vorhanden. Genabhängig könnte dann der Cyanidintyp eine „Cyanidinsynthetase“ ausbilden, die Kaffeesäure-CoA zur Startreaktion verwenden kann, der Delphinidintyp dagegen nicht.

Unsere Ergebnisse lassen die Wahl zwischen den beiden Möglichkeiten: Substitution des Seitenphenylringes auf der Stufe von $C_6-C_3-C_6$ -Körpern oder Selektion nur bestimmter Zimtsäuren zur Flavonoidsynthese durch Enzyme entsprechender Spezifität. Die Entscheidung fällt mit der Ermittlung des Zeitpunktes, zu dem der Ring B substituiert wird. Untersuchungen in dieser Richtung sind im Gange.

Zusammenfassung

1. In den Blüten und Blütenknospen von *Petunia hybrida* wird Phenylalanin ($1-^{14}C$) in Zimtsäuren, Flavonolaglyka und alle vorhandenen Anthocyanidine (Cyanidin, Päonidin, Delphinidin, Petunidin, Malvidin) überführt. C_6-C_3 -Einheiten werden also nicht nur in vegetativem Material zur Synthese des Cyanidins, sondern ebenso in Blüten zur Bildung der dort auftretenden Anthocyanidine verwendet.

2. Während der Blütenentwicklung treten die einzelnen Anthocyanidine nacheinander auf. In Untersuchungen an drei reinen Linien ließ sich die Reihenfolge Cyanidin, Delphinidin, Päonidin, Petunidin, Malvidin ermitteln. Einfacher substituierte Anthocyanidine finden sich somit früher als formell von ihnen ableitbare Anthocyanidine.

3. Versuche mit Phenylalanin ($1-^{14}C$) lieferten keinerlei Anhaltspunkte dafür, daß die Verzögerung im Auftreten der komplizierter substituierten Anthocyanidine auf den längeren Syntheseweg über entsprechend substituierte Zwischenstufen (C_6-C_3 - oder auch $C_6-C_3-C_6$ -Einheiten) zurückzuführen sein könnte. Als Ursache für die Reihenfolge im Auftreten der Anthocyanidine muß eine zeitlich differentielle Aktivität der die Substitution bestimmenden Gene angenommen werden.

4. Während der gesamten Blütenentwicklung, auch zum Zeitpunkt stärkster Anthocyaninsynthese in einem mittleren Knospenstadium, werden Flavonole gebildet. Flavonol- und Anthocyaninsynthese sind also unabhängiger voneinander, als gerade für *Petunia* angenommen wurde.

5. In drei reinen Linien finden sich die gleichen Zimtsäuren und Flavonole, die Anthocyanausstattung dagegen ist je nach dem Genotyp verschieden. In keiner der drei Linien stimmen Zimtsäuren, Flavonole und Anthocyanidine in der Substitution ihres Phenyl- bzw. Seitenphenylringes miteinander überein. Die Befunde führen zu zwei Erklärungsmöglichkeiten: entweder wird der Ring B erst nach der Bildung von $C_6-C_3-C_6$ -Zwischenstufen substituiert oder es werden nur bestimmte Zimtsäuren aus dem Gesamtbestand an Zimtsäuren zur Flavonoidsynthese herangezogen.

Herrn Prof. Dr. J. STRAUB und Herrn cand. rer. nat. C. MEYER danke ich für die Überlassung von Petunienmaterial, Frl. H. RÜHR für ihre wertvolle technische Assistenz. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

- BEERMANN, W.: Chromosomenstruktur und Zelldifferenzierung in der Speicheldrüse von *Trichocladus vitripennis*. Z. Naturforsch. 7b, 237—242 (1952).
- BIANCHI, F.: Genetisch-chemisch bloemkleuronderzoek bij *Petunia*. Genen en Phaenen 5, 33—45 (1960).
- BIRCH, A. J.: Biosynthesis of flavonoids and anthocyanins. In T. A. GEISSMAN, The chemistry of flavonoid compounds. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press 1962.
- BIRKOFER, L., u. CH. KAISER: Neue Flavonglykoside aus *Petunia hybrida*. Z. Naturforsch. 17b, 359—368 (1962).
- — u. H. KOSMOL: Zuckerester von Hydroxyzimtsäuren in *Petunia hybrida*. Naturwissenschaften 47, 469—470 (1960).
- BOGORAD, L.: The biogenesis of flavonoids. Ann. Rev. Plant Physiol. 9, 417—448 (1958).
- BOFF, M., u. B. MATTHIS: Über den Zusammenhang von Anthocyan und Leukoanthocyan. Z. Naturforsch. 17b, 811—818 (1962).
- DAVIS, B. D.: Intermediates in amino acid biosynthesis. Advanc. Enzymol. 16, 247—312 (1955).
- FEIGL, F.: Spot tests in organic analysis. Amsterdam-London-New York-Princeton: Elsevier 1960.
- GEISSMAN, T. A., and T. SWAIN: Biosynthesis of flavonoid compounds in higher plants. Chem. and Ind. 1957, 984.
- GRISEBACH, H.: Die Biosynthese der Anthocyane. Vorabdruck einer Mitteilung des IV. Internat. Kongr. für Biochemie, Wien 1958.
- , u. M. BOFF: Untersuchungen über den biogenetischen Zusammenhang zwischen Quercetin und Cyanidin beim Buchweizen mit Hilfe ¹⁴C-markierter Verbindungen. Z. Naturforsch. 14b, 485—490 (1959).
- , and W. D. OLLIS: Biogenetic relationships between coumarins, flavonoids, isoflavonoids and rotenoids. Experientia (Basel) 17, 4—12 (1961).
- , u. L. PATSCHKE: Zur Biogenese der Flavonoide IV.: 2'.4.4'.6'-Tetrahydroxychalkon-2'-glucosid-(β-¹⁴C) als Vorstufe für Quercetin und Cyanidin. Z. Naturforsch. 16b, 645—647 (1961).
- HÄNSEL, R.: Zellsaftlösliche Pigmente (Anthocyane und Flavonoide). In H. F. LINKSENS, Papierchromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- HATS, I. M., u. K. MACEK: Handbuch der Papierchromatographie, Bd. 1. Jena: Gustav Fischer 1958.
- HARBORNE, J. B.: Genetic variation of anthocyanin pigments in plant tissues. In J. B. PRIDHAM, Phenolics in plants in health and disease. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press 1960.
- Chemogenetical studies of flavonoid pigments. In T. A. GEISSMAN, The chemistry of flavonoid compounds. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press 1962.
- Anthocyanins and their sugar components. Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 20, 165—199 (1962).
- HESS, D., u. C. MEYER: Dünnschichtchromatographie von Anthocyanen. Z. Naturforsch. 17b, 853—854 (1962).
- IBRAHIM, R. K., and G. H. N. TOWERS: The identification, by chromatography, of plant phenolic acids. Arch. Biochem. 87, 125—128 (1960).
- LAWRENCE, W. J. C., and J. R. PRICE: A survey of anthocyanins. Biol. Rev. 15, 35—58 (1940).

- LYNEN, F., u. M. TADA: Die biochemischen Grundlagen der „Polyacetatregel“. *Angew. Chem.* **73**, 513—519 (1961).
- MACOVSCI, E.: Die Verwendung der Kapillarmethode zur Einführung chemischer und biologischer Stoffe in den Pflanzenkörper. *Preslia* **30**, 252—255 (1958).
- MECHELKE, F.: Spezielle Funktionszustände des genetischen Materials. In Symp. d. Ges. d. dt. Naturforscher und Ärzte 1962. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963.
- MOSIG, G.: Zur Genetik von *Petunia hybrida*. II. Die Analyse von Genen der Anthoxanthin- und Anthocyan-Bildung in der Blüte. *Z. Vererb.-Lehre* **91**, 164—181 (1960).
- NEISH, A. C.: Biosynthetic pathways of aromatic compounds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **11**, 55—80 (1960).
- PARIS, C. D., and W. J. HANEY: Genetic studies in *Petunia*. I. Nine genes for flower color. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **72**, 462—472 (1958).
- REZNIK, H.: Vergleichende Biochemie der Phenylpropane. *Ergebn. Biol.* **23**, 14—46 (1960).
- Pigmentierungsphasen während der Blütenentwicklung von *Primula obconica* Hance. *Flora (Jena)* **150**, 454—473 (1961).
- SCHMIDT, H.: Chemische Untersuchungen über den Biosyntheseweg der Blütenfarbstoffe in Mutanten von *Antirrhinum majus*. *Biol. Zbl.* **81**, 213—226 (1962).
- SCOTT-MONCRIEFF, R.: A biochemical survey of some mendelian factors for flower colour. *J. Genet.* **32**, 117—170 (1936).
- SEYFFERT, W.: Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei *Cyclamen*. *Z. Vererb.-Lehre* **87**, 311—334 (1955).
- STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.
- , u. P. J. SCHORN: Hydrophile Pflanzeninhaltsstoffe. In: E. STAHL, Dünnschichtchromatographie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.
- STÖRMER, I., u. H. v. WITSCH: Chemische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über das Blütenfarbmuster der Gartenpetunie. *Planta (Berl.)* **27**, 1—9 (1937).
- SWAIN, F., and E. C. BATE-SMITH: Flavonoid compounds. In: M. FLORKIN and H. S. MASON, *Comparative Biochemistry*, Bd. 3. New York-London: Academic Press 1962.
- WYK, D. v.: Genetisch-biochemische Untersuchungen über die Flavonole bei *Petunia hybrida*. *Naturwissenschaften* **49**, 396—397 (1962).

Priv.-Doz. DR. DIETER HESS,
Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abteilung Genetik,
5 Köln-Vogelsang