

Untersuchungen über die Biosynthese der Anthocyane und der Flavonoide bei der Levkoje, *Matthiola incana*

EN WILLWEBER-KISHIMOTO *

Untersuchungen über die Wirkung von Blütenfarbgenen sind an verschiedenen Mutanten von Levkoje häufig durchgeführt worden. Sie erklären, daß die Gene auf die Molekülstruktur von Anthocyanen und Flavonoiden leitend wirken. Der Zusammenhang zwischen Genotyp, Pigmentstruktur und Phänotyp wurde aufgeklärt und die Biosyntheseschritte sind verfolgt worden.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Aufklärung des Biosyntheseweges der Farbbildung weißer Blüten der drei rezessiven Gene e, f und g von den drei Variationen, je Nr. 17, 18 und 19. Wie durch die bisherigen Untersuchungen festgestellt worden ist, sind die Grundfaktoren der Pigmentbildung E, F und G, von denen E und G pleiotropisch wirkende Behaarungsfaktoren sind. Die weiße Blütenfarbe wird durch die rezessiven Allele e, f und g erzeugt. Der Zusammenhang und der Unterschied der drei rezessiven Gene in der Wirkung auf die Biosynthese der weißen Blütenfarbe könnte durch die Untersuchung aufgeklärt werden, wie der Biosyntheseweg durch die Einführung rezessiver Allele der komplementär wirkenden Gene e, f und g, selektiv blockiert wird, so daß Verbindungen, die bis zum Blockpunkt synthetisiert worden sind, angereichert und erkannt werden können. Es gibt noch andere Grundfaktor, g' (schwachfarbig semiincana), und Modificatoren, z (zentralaufhellend) und b (karmin). Material mit diesen Faktoren wurde ebenfalls zu diesen Untersuchungen genommen, um die weiteren Einflüsse von diesen Genen auf die Biosynthese zu untersuchen (Tabelle 1). Die Mutanten sind aus dem Versuchsmaterial von Herrn Prof. Dr. W. SEYFFERT zur Verfügung gestellt worden.

* Biological Laboratory, Otemae Women's University, Nishinomiya-shi, Japan.

Received 20 Februar 1968

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

Die Kreuzungen wurden auf dem Versuchsfeld des Instituts für Genetik der Universität Tübingen zwischen Nr. 18 und 201-206 oder 221-224, und zwischen 17 oder 19 und 517, 2717, 2719 oder 1719 durchgeführt.

Tabelle 1. Zur Untersuchung gebrauchten Individuen.

Pflanzen Nr.	Genotyp	Blütenfarbe	Behaarung
17	ee	weiß	glabra
18	ff	weiß	incana
19	gg	weiß	glabra
201 - 206	eeff	weiß	glabra
221 - 224	ffgg	weiß	glabra
517	eegg	weiß	glabra
2717	eegg	weiß	glabra
2719	Eegg	weiß	glabra
1719	eegg ?	weiß	glabra

Methode

Die Untersuchung des Pigmentmusters der drei Genotypen ee, ff und gg wurde papierchromatographisch vorgenommen.

1. Extraktion: Die frisch gepflückten Petalen gefüllter und ungefüllter Blüten wurden in Papierbeuteln sofort in den Kühlraum gebracht und gleich von chlorophyllhaltigen Teilen befreit (mit der Schere abgeschnitten). Da diese Arbeit zeitnehmend war, lagen die Blüten $1\frac{1}{2}$ — 1 Tag im Kühlraum. Um festzustellen, ob das lang im Kühlraum gelegene Material bei der Analyse unterschiedliche Resultate durch eventuelle Abbauprodukte zeigen würde, wurden die Blüten Nr. 20 (bbzz) je nach der Aufbewahrungszeit von 12, 24 und 48 Stunden in Methanol-Aceton (5%) eingelegt. Die Nr. 20 war am reichlichsten vorhanden. Die Petalen wurden mit dem Homogenisator Ultra Turrax zerkleinert, so daß der Methanol-Aceton Extrakt eine hohe Konzentration erreichte. Je nach dem Gebrauch für das nachfolgende Bandchromatogramm wurde die Extraktlösung mit Hilfe des Vakuum-Rotationsverdampfers zum trüben Zustand eingengt.

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

2. Trennung: Die Trennung wurde auf Chromatographiepapier, Schleicher und Schüll Nr. 2043 a und b, absteigend bei einer Temperatur von 18°C bis 20°C vorgenommen. Hierzu wurde das Lösungsmittelgemisch n-Butanol-Eisessig-Wasser (BEW 4-1-5 Oberphase) verwendet. Für die Untersuchung der aliphatischen und aromatischen Aminosäuren wurden der ganze quadratische Bogen zum zweidimensionalen Entwickeln genommen. Als Lösungsmittel für die aliphatischen Aminosäuren wurde n-Butanol-Eisessig-Wasser 4-1-5 einerseits und Phenol-m-Kresol-Boratpuffer pH 8,3 (15-30-7,5 ggv) andererseits absteigend verwendet. Nach der ersten Entwicklung in n-Butanol-Eisessig-Wasser wurde das Filtrierpapier zur Imprägnierung mit Boratpuffer pH 8,3 besprüht und nach dem Trocknen in die zweite Richtung mit Phenol-m-Kresol-Boratpuffer pH 8,3 weiter entwickelt. Danach wurde eine Lösung von 0,1 g Ninhydrin zur Analyse Merk (Art. Nr. 6762) in 95 ml absolutem Äthylalkohol aufgesprüht und das Papier eine halbe Stunde lang im Trockenschrank bei etwa 80°C getrocknet. Als Lösungsmittel für die aromatischen Aminosäuren wurde Phenol-Wasser (8-2) einerseits und wassergesättigtes Collidin-Lutidin (1-1) andererseits absteigend verwendet.

Für die Untersuchung der Aglykone, der Zucker und der Säuren dienten die Lösungsmittel, Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (IAW 2-5-5), Butanol-Pyridin-Wasser (BPW 6-4-3) und 15%ige Essigsäure.

3. Elution: Die präparative Trennung auf dem Bandchromatogramm war durch Auftragen als Streifen entlang der Startlinie zu erhalten. Nach dem Entwickeln wurden die verschiedenen durch die Trennung erhaltenen Bänder ausgeschnitten, zwischen zwei Objektträger eingespannt, in eine erhöht aufgestellte Photoschale mit dem Elutionsmittel Methanol-Eisessig (5%) eingelegt und mit dem freien Ende in einen Becher eingehängt. Unter einem dicht schließenden Glastrog wurden die Streifen innerhalb von 24 bis 31 Stunden fast vollständig eluiert. Die Eluate wurden im Vakuum eingeeengt. Zum Reinigungszwecke wurde diese Behandlung 2 bis 3 mal wiederholt. Da HCl die Komponenten bei diesen drei Mutanten hydrolysiert, konnte nur Essigsäure benutzt werden.

Wenn eine größere Quantität der Substanz nötig war, wurden die Bänder klein geschnitten und mit Methanol kurz gekocht und in dieser Weise 5-10 mal extrahiert. Die Eluate wurden im Vakuum eingeeengt.

4. Säurenachweis: Da die Anthocyane in den weißen Blüten nicht enthalten sind, war die Existenz von den verschiedenen Säuren, deren weiteren

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

Verbindungen auf dem Biosyntheseweg blockiert sein sollten, zu erwarten. Der methanolische Blütenextrakt wurde eingeeengt und mit Vergleichssubstanzen auf Papier 2034 a und b in BEW oder in 15%iger Essigsäure chromatographiert. Da die frischgepflückten Petalen der Blüten wasserhaltig sind, enthielt der Extrakt auch eine ausreichende Menge Säuren, die die verschiedenen Genotypen charakterisieren. Das Chromatogramm wurde, im UV-Licht, im UV-Licht-Ammoniakdampf und durch besprühen mit Naturstoffreagenz (Diphenylborsäure-3-aminoäthylester), ZrOCl_2 , PbAc_2 (25%ige basische Bleiacetatlösung), Anilinphtalatlösung (1,66 g 0-Phtalsäure und 0,93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem Butanol gelöst und kühl gehalten. Nach dem Besprühen wurden die Chromatogramme im Trockenschrank bei 105°C entwickelt) und FeCl_3 (1% wässrige Eisen-III-chloridlösung) auf Farbreaktionen untersucht.

5. Dünnschichtchromatographie: Die Adsorbentien, Kieselgel und Polyamid, wurden auf Glasplatten von $20 \times 12 \text{ cm}^2$ aufgebracht. Als Kammern dienten dickwandige Gläser mit einer Höhe von 26 cm und einem Durchmesser von 15 cm. Sie wurden mit eingeschliffenen Glasplatten abgedeckt.

6. Säulenchromatographie: Für Säulenchromatographie waren Polyamid- und Cellulosepulver geeignet. Das Füllmaterial wurde mit dem jeweiligen Elutionsmittel angerührt und in die Säule eingeschlemmt. Als Adsorbens gelangten zur Anwendung:

Cellulosepulver "Ederol" für die Säulenchromatographie der Fa. J. C. Binzer, Hatzfeld/Eder;

Polyamidpulver "Ultrim K 228 BM" für die Chromatographie, BASF, Ludwigshafen.

7. Untersuchung auf Acylverbindungen: Zu der alkalischen Hydrolyse wurde 0,5n-Natronlauge genommen. Das Hydrolysat wurde mit HCl neutralisiert und mit Äther geschüttelt. Die Ätherphase wurde auf ein Papierchromatogramm aufgetragen.

8. Hydrolysen: Die Hydrolyse der Fraktionen erfolgte mit 10%-methanolischer Salzsäure auf dem Dampfbad am Rückfluß für 2 Stunden. Nach Abkühlung wurden die Niederschläge säurefrei gewaschen und im Exikator mit Phosphopentoxid 24 Stunden lang getrocknet. Das Filtrat wurde zur weiteren Untersuchung benutzt.

9. Partielle Hydrolyse: Die Lösung der Fraktion wurde mit dem gleichen Volumen 10%iger HCl versetzt und zwei Stunden lang schonend hydrolysiert. In Abständen von 1, 2, 3, 5, 10, 20 und 30 Minuten, 1 und 2 Stunden bezogen auf den Hydrolysenbeginn, wurden die Proben auf einen Chromatographiebogen aufgetragen und in IAW absteigend chromatographiert. Hierbei traten die Glykosidstufen deutlich hervor. Nach zweistündiger Dauer der Hydrolyse befinden sich nur noch die Aglyka im Hydrolysat. Das Chromatogramm wurde dann mit PbAc₂ besprüht.

10. Behandlung der Hydrolyselösungen zum Nachweis von Zucker: Nach der Hydrolyse wurde das ausgefallene Aglykon abgenutscht, die Lösung mit Wasser auf das 10-fache verdünnt und zu 20 ml etwa 2 g Anionenaustauscher Dowex 2 oder Amberlite IRA-410 gegeben. Nach 10 minutigem Schütteln wies die Lösung einen pH 6,5 auf und wurde dann auf etwa 1/10 ihres Volumens eingeeengt und in BPW absteigend chromatographiert. Für die Bestimmung der Existenz von Glucose wurde auch das Reagenz-Papier "Tes-Paper" (Lilly-Shionogi) benutzt.

11. Acetylierung des Aglykons: Der Niederschlag, das Aglykon, wurde nach dem Trocknen mit 5 ml Essigsäureanhydrid und 5 ml Pyridin versetzt, etwas angewärmt, und für 24 Stunden stehen gelassen. Diese Mischung wurde dann in Eiswasser hineingegossen, gut umgerührt und im Kühlraum (10°C) 24 Stunden stehen gelassen. Der Niederschlag wurde dann abgenutscht und mit wenig Wasser gesprüht. Die Umkristallisierung wurde mit Äthanol gemacht.

12. Schmelzpunkt: Der Schmelzpunkt wurde in dem Apparat nach TOTTOLI der Fr. Büchi, Flawil, Schweiz, bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.

13. Spektren: Die Messung der UV-Spektren wurde in Quartzküvetten von 1 cm Schichtdicke mit dem Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q durchgeführt. Die Eluate der entsprechenden Substanzen aus Papierchromatogrammen wurden benutzt. Für die Natriumacetat-Verschiebungen wurden die Lösungen in Methanol p. a. mit frisch geschmolzenen Natriumacetat bis zur Sättigung versetzt. Nach 10 Minuten wurden die Spektren gemessen.

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

Ergebnisse

1. **Kreuzungen:** Die Fertilität der Kreuzung war sehr unterschiedlich und im Durchschnitt niedrig (4.67%) (Tabelle 2). Wie in der Tabelle 3 ersichtlich

Tabelle 2. Durchgeführte Kreuzungen

Kombinationen	bestäubte Blüten	Schoten mit Samen
201 (eeff) × 18 (ff)	32	9
202 " × "	30	12
203 " × "	23	1
204 " × "	31	10
205 " × "	44	4
206 " × "	28	9
221 (ffgg) × 18 (ff)	29	1
222 " × "	18	5
223 " × "	32	5
224 " × "	27	11
517 (eegg) × 17 (ee)	33	9
" × 19 (gg)	40	10
2717 " × 17 (ee)	18	12
" × 19 (gg)	27	7
2719 (Eegg) × 17 (ee)	19	10
" × 19 (gg)	30	18
1719A (eegg?) × 17 (ee)	16	6
" × 19 (gg)	32	8
B " × 17 (ee)	10	7
" × 19 (gg)	21	2
C " × 17 (ee)	24	9
" × 19 (gg)	28	17
Total	592	182

Tabelle 3. Fertilität bei Selbstung

Pfl.	August		September						Oktober						
Nr.			8,	9	13,	15	22,	23	3,	7,	9	14,	15,	18	25
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
201	-	-	0,1	-	-	-	4,0	0,77	11,0	0,22	2,9	0,33	5,9	0,67	
202	-	-	5,74	0,35	8,3	0,43	9,7	0,36	12,5	0,10	8,5	0,24	7,5	0,24	
203	-	-	1,1	0,40	17,0	-	0,0	-	9,6	-	12,6	0,17	6,0	-	
204	-	-	0,0	-	6,5	-	3,5	-	9,9	0,12	11,8	0,33	0,0	-	
205	-	-	1,0	0,80	-	-	8,6	-	-	-	-	-	7,0	0,22	
206	-	-	2,5	0,46	-	-	4,8	0,44	21,5	-	11,3	0,18	17,8	-	
221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
222	-	-	1,3	0,43	0,0	-	0,8	0,44	17,0	-	11,8	0,23	7,7	0,29	
223	-	-	0,0	-	0,5	0,33	-	-	13,5	0,20	0,0	-	9,4	0,30	
224	-	-	2,3	0,50	0,0	-	16,3	-	19,9	0,06	13,3	0,20	7,8	0,31	
517	-	-	3,1	0,32	2,1	0,30	4,4	0,14	17,6	0,08	8,0	0,21	6,6	0,15	
2717	-	-	0,0	-	0,0	-	-	-	22,3	-	0,0	-	8,0	0,20	
2719	-	-	1,3	0,44	-	-	3,0	0,45	8,0	0,22	7,8	0,20	7,9	0,24	
1719 A	-	-	0,88	0,41	2,4	0,39	8,8	-	6,0	0,22	7,6	0,27	3,5	0,36	
1719 B	-	-	0,0	-	-	-	0,0	-	6,7	0,30	4,6	0,40	0,0	-	
1719 C	-	-	0,6	0,45	0,0	-	3,0	0,42	9,4	0,28	3,2	0,35	0,0	-	
17	0,8	0,43	-	-	-	-	8,0	0,30	-	-	-	-	0,0	-	
18	-	-	28,7	-	25,6	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	1,3	0,46	7,8	0,27	12,9	0,1	20,3	0,14	11,3	0,12	17,7	0,04	11,4	0,13	

A: Samen/Schoten

B: % leere Schoten

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

ist, zeigt die Selbstung von den durch Kreuzung erzeugten Individuen, 201-206, 221-224, 517, 2717, und 1719, auch keine hohe Fertilität. Die Fertilität scheint im Allgemeinen vom Wetter beim Aufblühen, besonders bei der Bestäubung, abhängig zu sein. Vor allem Regen bzw. hohe Luftfeuchtigkeit scheint die Fertilität zu beeinflussen.

2. Chromatographische Untersuchungen: Die Chromatogramme des methanolischen Extrakts der frischgepflückten Blüten von Nr. 20 zeigten nach der Aufbewahrungszeit von 12, 24 und 48 Stunden im Kühlraum 10°C keine Unterschiede von einander. Danach kann man die Methode benutzen, die Blüten in großer Menge auf dem Versuchsfeld zu pflücken und gleich im Kühlraum (10°C) noch über Nacht aufzubewahren. In dieser Weise kann man die chlorophyllhaltigen Teile von den Petalen nicht auf dem Feld sondern im Labor leichter entfernen.

Abb. 1 Übersichtschromatogramm der drei Mutanten, ee, ff und gg, Lösungsmittel: BEW (4-1-5)

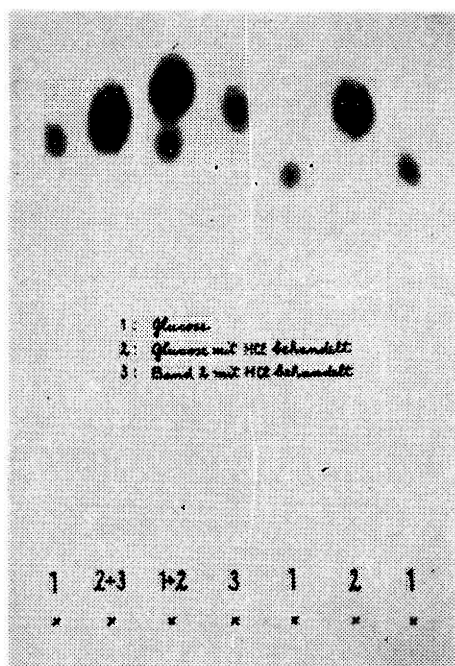
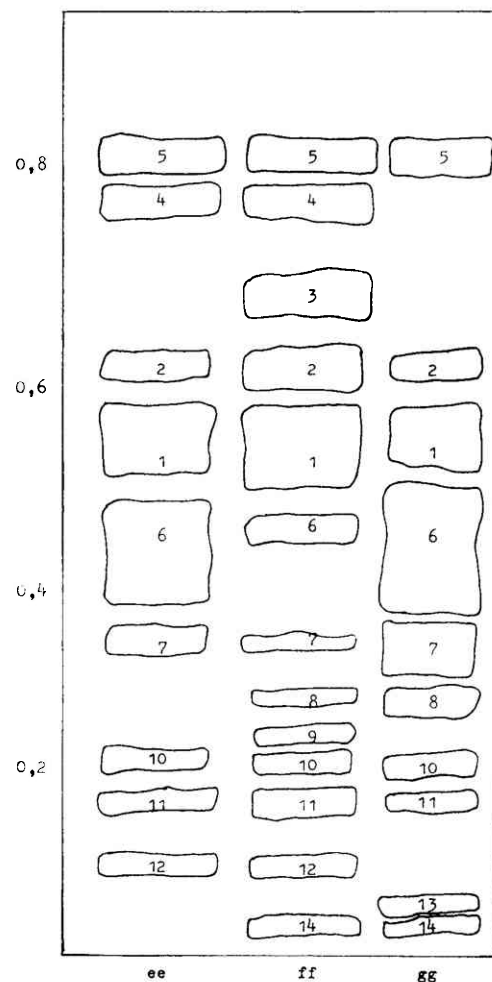


Abb. 3
Papierchromatogramm von Glucose, mit HCl behandelter Glucose und mit HCl behandelter Stoff im Band 2



Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

Die Analyse des Pigmentmusters der drei Genotypen ee, ff und gg ergab ein unterschiedliches Bild (Abb. 1). Wie das Übersichtschromatogramm zeigt, unterscheiden sich die drei Genotypen in der Menge der enthaltenen Stoffe (Tabelle 4). In Wirklichkeit ist jedoch die Zahl der vorhandenen Substanzen noch größer, als die Zahl in diesem Übersichtschromatogramm angibt, da Stoffe, die durch UV-Licht-Ammoniakdampf und die anderen Reagenzmittel nicht sichtbar werden, neben den obigen Substanzen existieren können. Außerdem wurden die nur in schwacher Konzentration vorkommenden Substanzen nicht berücksichtigt. Das Band auf dem Chromatogramm ($R_f=0,53$) (Tab. 4), das die gemeinsam und in grosser Menge in jedem Genotype enthaltenen Substanz zeigt, wurde als Band 1 nummeriert. Jedes weitere Band bis Nr. 5 ($R_f=0,88$) aufwärts wirkt unter dem UV-Licht bläulich oder grünlich fluoreszierend. Die zweidimensionalen Papierchromatogramme BEW-IAW oder BEW-BPW zeigten keine weitere Trennung durch das zweite Laufmittel weder bei Säuren oder Estern noch bei Flavonoiden.

Die Bänder 2 und 5 zeigen, daß die Stoffe gemeinsam in jedem Genotyp enthalten sind, obwohl ihre Mengen unterschiedlich sind. Der Stoff vom Band 2 kam im Genotyp ff am meisten und in dem gg am wenigsten vor. Die drei Bänder, 1, 2 und 5, zeigen im NH_3 -Dampf ähnliche Farbreaktion, von bläulicher bis grünlicher Fluoreszenz. Das Band 3 war im UV-Licht nicht sichtbar, wenn die Menge des Stoffes nicht reichlich war, und gab erst im NH_3 -Dampf blaue Farbreaktion.

Die Substanz im Band 6 ($R_f=0,45$) ist in den Genotypen ee und gg gemeinsam in großer Menge enthalten, im Genotyp ff nur in geringer Menge. Sie ist im UV-Licht dunkel rot-braun in großer Menge und gelb in kleiner Menge, und durch Bleiacetat stark gelb, und im Tageslicht etwas gelblich. Nächste zu diesem Band folgt das Band 7, das im UV-Licht braun ist und auf Bleiacetat gelblich reagiert. Das Band 8 ist im UV-Licht bläulich und im Ammoniakdampf gelblich fluoreszierend. Der Stoff im Band 9 kann man fast nur bei dem Genotyp ff sehen, und ist im UV-Licht schwach bläulich. Das Band 10 ist sehr schmal aber im UV-Licht reagiert es kräftig dunkelbraun und auf Bleiacetat gelb. Die vier Bänder, 7, 8, 9 und 10 sind sehr wenig in der Menge verglichen mit den Hauptsubstanzen von den Bändern 1, 2, 3 und 6. Die Bänder von 11 ab bis zum Band 14 waren nicht klar genug, daß man sie charakterisieren konnte.

Tabelle 4. Chromatogrammergebnisse im Tageslicht, UV-Licht, NH₃-Dampf und mit
Naturstoffreagenz, Sirkonoxychlorid, Eisen (III) chlorid und Bleiacetat

Band Nr.	1			2			3			4			5		
Genotyp	ee	ff	gg	ee	ff	gg	ee	ff	gg	ee	ff	gg	ee	ff	gg
TL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NH ₃	h g	h g	h g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UV	(bl) 1	bl 1	(bl) 1	bl 1	bl 1	bl 1	-	bl v	-	-	-	-	bl 1	bl 1	bl 1
UV-NH ₃	gr 1	gr 1	gr 1	(bl) (w) (1)	gr w 1	(bl) (w) (1)	-	bl w	-	-	-	-	gr 1	gr 1	gr 1
NR	gr 1	gr 1	gr 1	w br	bl 1	w br	w br	w br	w br	w r	w v	w r	w gr	w gr	w gr
ZrOCl ₂	gr 1	gr 1	gr 1	-	bl 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FeCl ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R _F	0.53			0.63			0.69			0.78			0.86		
Pb Ac ₂	hh g	hh g	hh g	-	-	-	-	-	-	hh g	hh g	hh g	-	-	-

Tablle 4. Fortsetzung

Band Nr.	6			7			8			9			10		
Genotyp	ee	ff	gg	ee	ff	gg	ee	ff	gg	ee	ff	gg	ee	ff	gg
TL	h g	hh g	h g	-	-	(g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NH ₃	g	h g	g	-	(g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UV	g	w g	g	(v)	(bl) (w)	v w	-	-	bl	-	bl	-	br	br	br
UV-NH ₃	br	(br)	br	(v) (w)	(bl) (w)	v w br	(w)	(g) l	g l	(w) (g)	w	(w) (g)	br	br	br
NR	g	g	g	(hh) (br)	(hh) (br)	or l	(w)	(w)	w	w	w	w	br	br	br
ZrOCl ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(w)	-	(r)	br	br	br
FeCl ₃	(d)	(d)	(d)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R _F	0,45			0,32			0,29			0,26			0,24		
Pb Ac ₂	g	h g	g	or	or	or	-	-	-	-	-	-	g	g	g

Tabelle 4. Fortsetzung

Band Nr.	11			12			13			14		
Genotyp	ee	ff	gg	ee	ff	gg	ee	ff	gg	ee	ff	gg
TL	-	-	-	-	-	x	x	x	-	x	-	-
NH ₃	-	-	-	-	-	x	x	x	-	x	-	-
UV	w	w	w	(w) (g)	(w) (g)	x	x	x	w g	x	(v)	(v)
UV-NH ₃	w g	w	w	(w) (g)	(w) (g)	x	x	x	w	x	(v)	(v)
NR	w g	w	w	(w) (g)	(w) (g)	x	x	x	w g	x	-	-
ZrOCl ₂	-	w	w	(w) (g)	(w) (g)	x	x	x	-	x	-	-
FeCl ₃	-	-	-	-	-	x	x	x	-	x	-	-
R _F	0,19			0,12			0,09			0,07		
Pb Ac ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : keine Änderung

h : hell

w : weiß

g : gelb

l . fluoreszierend

x : nicht existierend

gr : grün

bl : blau

br : braun

or : orange

() : wenig

d : dunkel

TL : Tageslicht

NR : Naturstoffreagenz

v : violett

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

Flavonoide:

1. **Band 6:** Nach der Beobachtung des Papierchromatogramms im UV-Licht und der Farbreaktion bei Bleiacetat kam der Stoff im Band 6 zuerst für eine Untersuchung in Frage, der im Genotyp gg und ee in erheblich großer Menge vorhanden ist. Der biosynthetische Unterschied zwischen den Genotypen ff und ee oder gg können dadurch aufgeklärt werden.

Das durch Hydrolyse gewonnene Aglykon zeigte die Identität mit Kämpferol im Papierchromatogramm (IAW). Das Aglykon wurde weiter acetyliert und das Acetat wurde umkristallisiert. Die Kristalle waren gelblich und nadelförmig. Der Schmelzpunkt wurde gemessen: Smp. : 179°-181°C, Literatur-Smp. : 179°-181°C Misch-Smp. : 179°-182°C. Bei der partiellen Hydrolyse traten die Glykosidstufen deutlich hervor, und aus den entstandenen Zwischenprodukten konnte die Substanz auf die Flavonoidstruktur rückgeschlossen werden. Eine Minute nach Hydrolysebeginn trat die erste Trennung zwischen einem Zucker und dem Restglykosid auf. Diese Spaltung ging in 5 Minuten zu Ende. In 2 Minuten nach dem Hydrolysebeginn trat auch die nächste Trennung zwischen dem zweiten Zucker und der Reststruktur teilweise gleichzeitig auf. Die zweite Trennung ging in einer Stunde vollkommen zu Ende.

Durch die alkalische Hydrolyse hat man kein Acyl festgestellt. Um den Zucker bei der ersten Trennung zu untersuchen, wurde das Hydrolysat eine Minute nach dem Hydrolysebeginn, wie in der Methode beschrieben ist, behandelt. 10 Minuten nach dem Hydrolysebeginn wurde der zweite Zucker untersucht. Der erste Zucker war identisch mit Arabinose und der zweite mit Rhamnose im Papierchromatogramm (BPW).

Die Kurve des UV-Spektrums wies Maxima bei 266m μ und 350 m μ auf. Die Kurve war eine charakteristische der Flavone, d. h., das zweite Maximum war niedriger als das erste. Bei der Natriumacetat-Verbindung wurde nur an dem zweiten Maximum eine Verschiebung, 355 m μ , beobachtet. Danach kann man das Glykosid als Biosid bezeichnen. Die gelbe Farbreaktion mit Bleiacetat bedeutet, daß die 3-Stelle in der molekularen Struktur nicht mit Zucker sondern mit einer Hydroxyl-Gruppe besetzt ist. Der Stoff im Band 6 ist also Kämpferol-7-arabino-rhamnosid.

2. **Band 7:** Die im Band 7 vom Genotyp gg am meisten und im Genotyp ee sehr wenig vorhandene Substanz war im UV-Licht braun und auf Bleiacetat gelb-orangenfarbig. Die partielle Hydrolyse gab ein eigenartiges Bild; in einer Minute trat die Trennung auf einmal in die vierstufige, in 3 Minuten in die dreistufige und in 30 Minuten in die zweistufige Spaltung auf, und in

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

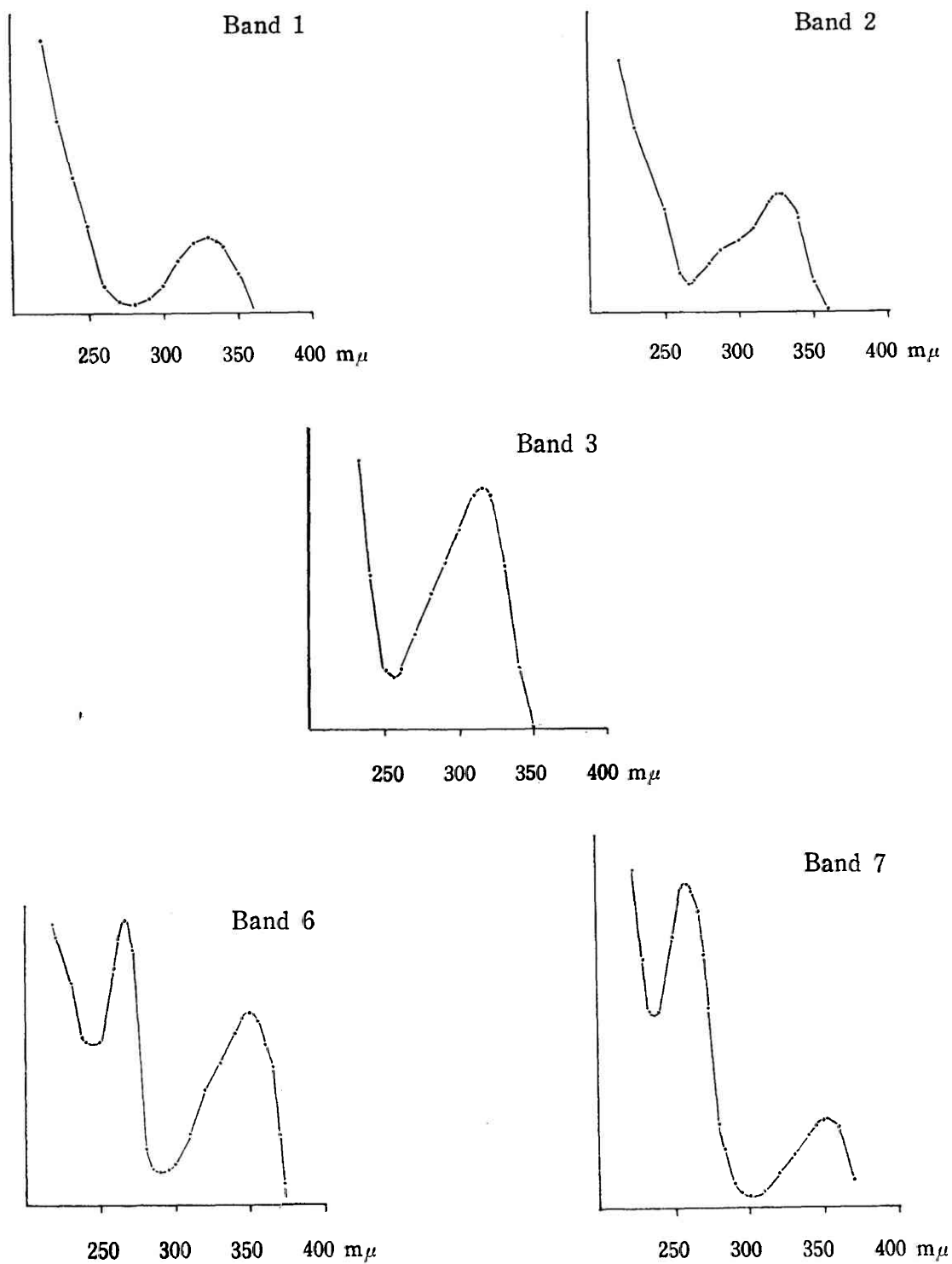


Abb. 2. UV-Absorptionskurven der Verbindungen
aus den Bändern 1, 2, 3, 6 und 7

einer Stunde verschwand die letzte Fraktion und nur die zweitletzte Fraktion blieb übrig. Diese Fraktion war mit Kämpferol identisch und verschwand nach 2 Stunden. Die letzte Fraktion reagierte auf Bleiacetat etwas orangefarbig, während die anderen Flecke gelb reagierten. Durch die Zucker-Untersuchung wurden Rhamnose, Arabinose und Glucose festgestellt. Es war nicht möglich, den einzelnen Zucker in jeder Stufe zu untersuchen, weil das Material nicht ausreichte. Es war deutlich zu sehen, daß das letzte Aglykon Kämpferol war. Aber was für eine Substanz die letzte Fraktion enthielt, die bis zur einstündigen Hydrolyse vorhanden war, konnte nicht festgestellt werden. Kämpferol, Kämpferid, Chrysin und Tectochrysin waren als Testsubstanzen zu bekommen. Anscheinend zersetzt sich das Aglykon im Band 7 nach zweistündiger Hydrolyse vollkommen. Da die Kurve vom UV-Spektrum das erste Maximum 258 m μ und das zweite Maximum 350 m μ zeigte, kann man annehmen, daß der Stoff ein Flavonol sein wird. Die Natriumacetat-Verschiebung war bei dem ersten Maximum 263 m μ und bei dem zweiten Maximum 375 m μ . Die Zucker sind vermutlich an der 3-Stelle und der 7-Stelle verbunden. Da die Menge dieses Stoffes im Übersichtschromatogramm sehr gering ist, kann er ein weiteres Produkt aus dem Stoff von Band 6, Kämpferol-7-arabino-rhamnosid, sein, d. h. Kämpferol-oligosid mit Arabinose, Rhamnose und Glucose als Zuckeranteil. Der Laufhöhe nach muß ein Tri- oder Tetrasaccharid vorliegen. Die Zuckerhaftstellen sind danach sehr wahrscheinlich C₈- und C₇-OH. Die alkalische Hydrolyse mit 0,5n NaOH zeigte, daß keine Acylgruppe in der Substanz vorhanden ist.

3. **Band 10:** Der Stoff vom Band 10 war offensichtlich auch ein Glykosid, denn es war im UV-Licht dunkelbraun und wurde gelb durch Besprühen mit Bleiacetat. Die partielle Hydrolyse zeigte eine dreistufige Trennung; in einer Minute trat die dreistufige Trennung, in fünf Minuten die zweite und in 30 Minuten die letzte auf. Die letzte Fraktion, das Aglykon, wurde mit Kämpferol identifiziert. Arabinose und Rhamnose wurden als Zucker festgestellt, der Fleck von Arabinose bestand allerdings aus zwei Flecken. Die Kurve des UV-Spektrums zeigte das erste Maximum bei 266 m μ und das zweite bei 310 m μ . Die Natriumacetat-Verschiebung war bei dem ersten Maximum 271 m μ , das zweite Maximum war nicht zu sehen. Die Kurve fiel schnell ab. Beim Eluieren des Stoffes vom Band 6 wurden fast immer die schmalen Bänder von 7, 8 und 10 neben dem Band 6 beobachtet. Man kann annehmen, daß dieser ein Abspaltungsprodukt vom Stoff im Band 6, Kämpferol-oligosid mit Arabinose und Rhamnose, sein wird. Die Zuckerhaftstelle ist sehr wahrscheinlich C₇-OH. Die alkalische Hydrolyse wies auf keine Acylgruppe.

Säuren :

Die säurehaltigen Bänder waren Band 1 bis Band 5 und Band 8 und 9. Darunter zeigten nur die Bänder 1, 2 und 3 in UV-Spektrumkurven deutliche Maxima, je 330 m μ , 325 m μ und 315 m μ . Die Bänder 4 und 5 hatten keine erhebliche Maxima, je 258 m μ , und 273 m μ . Die Bänder 8 und 9 hatten kein Maximum und die Kurven fielen schnell ab. Als Testsubstanzen wurden Zimt-, Dimethoxyzimt-, p-Cumar-, Kaffee-, Sinapin-, Chlorogen-, Isochlorogen-, Ferula-, Isoferula- und Chinasäure verwendet.

1. **Band 1:** Der Stoff vom Band 1 hatte denselben Rf-Wert wie Chlorogensäure (0,53). Durch die Hydrolyse entstanden zwei Flecke, die im UV-Licht-Ammoniakdampf blau-grün fluoreszierten und von denen der tiefer liegende mit Kaffee- oder Sinapinsäure im Rf-Werte identisch war. Um Kaffeesäure und Sinapinsäure zu unterscheiden, wurde das Polyamid-Dünnschichtchromatogramm genommen. Als Laufmittel wurde 2%iges Essigsäure-Methanol verwendet. Kaffeesäure hatte Rf-Wert 0,5 und Sinapinsäure hatte 0,75. Auch die Farbreaktion war im UV-Licht deutlich zu unterscheiden; Kaffeesäure war rötlich weiß und Sinapinsäure war blaufluoreszierend. Die Existenz der Chinasäure war negativ. Durch die Zuckeruntersuchung nach der Hydrolyse wurde die deutliche Existenz von Glucose festgestellt. Danach kann der Stoff im Band 1 Sinapinoyl-D-glucose-ester sein. Der Fleck der Glucose vom Band 1 im Papierchromatogramm lag immer höher als die Testsubstanz Glucose. Die Ursache wäre auf den Unterschied der molekularen Struktur der Glucose zwischen der D-Glucose-Form und D-Glucopyranose-Form zurückzuführen. In der Tat zeigte die Glucose, die mit HCl in der selben Weise wie bei dem Stoff vom Band 1 behandelt wurde, dieselbe Laufhöhe im Papierchromatogramm wie die Glucose vom Band 1 (Abb. 3).

2. **Band 2:** Das Papierchromatogramm der nach der Hydrolyse aufgetragenen Probe zeigte zwei Flecke. Der eine von denen hatte gleichen Rf-Wert mit Sinapinsäure. Die Farbe der beiden Flecke änderte sich im Ammoniakdampf von blau zu blaugrün. Die Existenz von Chinasäure war negativ. Im Hydrolysat konnte Glucose festgestellt werden. Der Stoff im Band 2 wird Sinapinoyl-D-glucoseester sein. Ferner könnten die Säuren im Band 1 und Band 2 cis-trans-isomere Sinapinsäuren sein.

3. **Band 3:** Der Stoff in diesem Band war im UV-Licht-Ammoniakdampf tief blau fluoreszierend. Allein im UV-Licht war er schwach blau, wenn er in großer Menge vorhanden war; in kleiner Menge war er nicht sichtbar. Durch Hydrolyse konnte nur p-Cumarsäure festgestellt werden, die als zwei Flecke vorkam. Das Hydrolysat enthielt also p-Cumarsäure und vielleicht deren Iso-

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

mere. Die Existenz von Glucose und von Chinasäure war negativ. Der Stoff in diesem Band wird aus den cis-trans-isomeren p-Cumarsäureverbindungen bestehen.

4. **Band 4 und Band 5:** Die beiden Bänder zeigten bei der Hydrolyse keine Spaltung. Die UV-Spektren der Substanzen der beiden Bänder gaben keine Maxima und die Kurven fielen nur abwärts. Keine von den Testsubstanzen war mit den beiden Substanzen identisch. Sie traten immer nebenbei auf, wenn der Stoff vom Band 1 gereinigt wurde. Daher müssen sie irgendwie Spaltungsprodukte von den drei Verbindungen der Bänder 1, 2 und 3 sein.

5. **Band 8:** Das Band 8 war im UV-Licht sehr schwach weißlich, aber im Ammoniakdampf reagierte es leuchtend gelb. Die Kurve des UV-Spektrums hatte den Typ von Säuren, d. h. abwärts fallende Linie. Der Stoff hatte aber keine Identität mit den Testsubstanzen, die vorher angegeben wurden. Da dieser Stoff auch beim Eluieren des Stoffes im Band 6, Kämpferol-7-arabinorhamnosid, nebenbei auftrat, kann diese Säure irgendein Spaltungsprodukt vom Band 6 sein.

6. **Band 9:** Der Stoff im Band 9 wurde beim Genotyp ff in der größten Menge, verglichen mit den anderen Genotypen, ee und gg, beobachtet. Es leuchtete schwach blau im UV Licht und weiß im Ammoniakdampf. Da die Kurve des UV-Spektrums abwärts fiel und der Stoff keine Identität mit den Testsubstanzen zeigte, könnte er ein Abspaltungsprodukt von den in den Bändern 1, 2 und 3 erscheinenden Verbindungen sein.

Aminosäuren:

Die aliphatischen Aminosäuren wurden gemeinsam in jedem Genotyp gefunden. Die festgestellten Säuren sind Asparagin, Serin, Lysin, Glutamin, Threonin, Arginin, Valin und Leucin. Sie waren in ihren Mengen unterschiedlich (Tab. 5). Aber die drei Genotypen ließen sich dadurch nicht charakterisieren.

Tabelle 5.

Aminosäuren

	Asp.	Ser.	Lys.	Glu.	Thr.	Al.	Val.	Leu.	Dopa.	Tyr.	Ph-al.
ee	v	v	v	v	w	w	w	w	—	—	—
ff	m	v	v	v	w	w	w	w	—	—	w
gg	m	m	m	m	w	w	w	w	—	—	w

v : viel m : mittelmäßig w : wenig — : keine

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

Um die aromatischen Aminosäuren zu untersuchen, wurden Tyrosin, Phenylalanin und Dihydroxyphenylalanin als Testsubstanzen verwendet. Hiernach wurde festgestellt, daß der Genotyp ee keine von den drei Säuren enthält, während der Genotyp ff und der Genotyp gg die Existenz von sehr geringer Menge Phenylalanin zeigten.

Nachweis der Chinasäure: Da die Chinasäure keine Farbreaktion im UV-Licht und auf irgendeinen Reagenzstoff zeigt, ist es sehr schwer, die Existenz der Chinasäure auf dem Chromatogramm festzustellen. Die Methode nach NEU, mit 3,5,7,2',4'-Pentahydroxyflavon das Chromatogramm zu besprühen, zeigte keine Farbreaktion. Chinasäure war auf dem Chromatogramm im UV-Licht als weißer Fleck zu sehen. Er war aber sehr schwach und schwer zu erkennen, wenn die Menge der Chinasäure in der Probe nicht reichlich war oder mit einer Substanz zusammen war, die denselben Rf-Wert wie den von Chinasäure hat. Eine andere Methode war erfolgreich. Nämlich, ein Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm mit dem Lösungsmittel 53%iger Essigsäure nachher mit H₂SO₄ c. zu besprühen und bei 120°C eine Stunde zu erhitzen. Chinasäure wurde dann rotbraun, während die Kaffee-, Sinapin-, p-Cumar-, Ferula-, Isoferula- und Zimtsäure dunkelfarbig oder schwarz wurden. Der Rf-Wert von Chinasäure war 0,5 und der von den anderen Säuren ungefähr 0,75. Durch diese Differenz und durch die rotbraune Farbreaktion konnte die Existenz von Chinasäure festgestellt werden.

Für das Papierchromatogramm (2043b) war 30%ige Essigsäure als Fließmittel (absteigend) geeignet. Dabei konnte man einen weißen Fleck von Chinasäure nicht verlaufend sondern konzentriert am deutlichsten im UV-Licht sehen. Aber diese Methode war nicht günstig für die Identifizierung, weil man eine große Menge zum auftragen braucht und dadurch unreine oder mitvorhandene andere Substanz die genaue Existenz des weißen Flecks von Chinasäure unerkennbar macht.

Noch eine andere Methode war das Lösungsmittel, Tertiärer Butylalkohol + 1,5n-Ammoniakwasser 1:1, für das Papierchromatogramm aufsteigend zu benutzen (ROTН). Chinasäure zeigte Rf-Wert 0,58, während die anderen obigen Säuren 0,27 — 0,38 zeigten. Aber der Nachteil war die Schwierigkeit, den weißen Fleck von Chinasäure von den anderen Substanzen mit dem Rf-Wert von 0,58 zu unterscheiden.

Auf der Fluoreszenz-Platte (Lösungsmittel 53%ige Essigsäure) reagierten China-, p-Cumar- und Zimtsäuren im UV-Licht (360 m μ) nicht, während die anderen obigen Säuren verschiedene Farben zeigten. Und im UV-Licht (254 m μ)

wurden alle Säuren als dunkle Flecke beobachtet. Allein der dunkle Fleck von Chinasäure lag tiefer ($R_f=0,5$), während die anderen Säuren alle in der Höhe von $R_f=0,75$ waren.

Diskussion

Wie das Übersichtschromatogramm zeigt, unterscheiden sich die drei Genotypen ee, ff und gg offensichtlich voneinander (Abb. 1). Die Typen ee und gg sind in der Menge von Kämpferolglykosid unterschiedlich. Der Typ ff enthält dagegen in großer Menge Ester und Säuren. Darunter sind Sinapin- und p-Cumarsäure und Glucose als alkoholische Komponente festgestellt worden. Der Typ gg zeigte Ester und Säuren in sehr geringer Menge. Die Kaffeesäure wurde in keinen von den drei Genotypen gefunden. Das Ergebnis vom Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm (mit H_2SO_4 c. besprüht) zeigte die rötlich braune Farbreaktion nicht, die charakteristisch bei Chinasäure ist. Die Hydrolysate vom Stoff vom Band 1 und 2 enthielten Sinapinsäure und Glucose, derer Existenz durch das Papierchromatogramm (BPW) und das Tes-Paper nachgewiesen wurde. Aus diesen Tatsachen könnte man sagen, daß die Substanz vom Band 1 und 2 keine Depside ist, sondern Ester von Sinapinsäure und Glucose. Die Substanz zeigte nach der Hydrolyse zwei Flecke nebeneinander, die im UV-Licht blau und im UV-Licht-Ammoniakdampf blau grün fluoreszierten und beinahe gleiche R_f -Höhe wie bei Sinapinsäure zeigte. Die Flecke können cis-trans-isomere Sinapinsäuren sein. Der Stoff vom Band 3 fluoreszierte schwach bläulich im UV-Licht, wenn er in großer Menge enthalten war. Aber im UV-Licht-Ammoniakdampf leuchtete er stark violett blau. Nach der Hydrolyse wurden zwei Flecke in der R_f -Höhe von p-Cumarsäure beobachtet. Sie könnten cis-trans-isomere p-Cumarsäuren sein. Aus dem Band wurde weder Zucker noch Chinasäure festgestellt. In welcher Form der Verbindung die Stoffe vom Band 3 in der natürlichen Blüte von Levkoje sich befinden, konnte nicht festgestellt werden. Vielleicht befinden sie sich als Ester-Verbindung in der Natur.

Die Tatsache, daß man im Typ ff sehr wenig Kämpferolglykosid findet, dagegen aber in größter Menge Ester und Säuren, könnte bedeuten, daß das rezessive Gen f die Synthese von Kämpferolglykosid blockiert und dadurch die Substanzen als Ester und teilweise als freie Säuren akkumuliert sind. Die Verbindungen von Sinapinsäure (Band 1 und 2) sind auch beim Typ gg in ver-

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

hältnismäßig großer Menge zu sehen. Da Kämpferolglykosid als das einzige Flavon in den Blüten von den drei Typen, ee, ff und gg, gefunden worden ist, könnte man eine biosynthetische Erklärung dafür geben, daß p-Cumarsäure für Kämpferolglykosid-Bildung gebraucht wird und deshalb als Ester oder freie Säure beim Typ gg sehr wenig in der Blüte existiert. Das Aglykon, Myricetin, wurde dagegen nicht gefunden. Dies bedeutet, daß die Sinapinsäure zum Aufbau der Myricetinglykosid nicht verbraucht wird, sondern die Biosynthese aus Sinapinsäure zum Glykosid blockiert wird. Diese Blockierung besteht aber gemeinsam in den drei Mutanten. Ob vielleicht die Sinapinsäure zum anderen Biosyntheseweg verbraucht wird, muß noch untersucht werden.

Der Unterschied zwischen den Genotypen ee und gg beruht auf der Existenz von dem Kämpferolglykosid in Band 7 beim Typ gg. Obwohl das Glykosid auch im Typ ee sich in geringer Menge befindet, ist die Reaktion von Naturstoffreagenz erheblich unterschiedlich. Das Band des Typs gg zeigt nämlich die leuchtende Orangefarbe, während es der Typ ee in sehr geringer Menge und der Typ ff nicht zeigten. Da das Band im UV-Licht dunkel braun war, muß der Zucker an der 3-Stelle gebunden sein. Die partielle Hydrolyse beim Glykosid vom Band 7 zeigte die vierstufige Trennung und bei der dritten Trennung war das Hydrolysat dem Kämpferol in Rf-Wert und auch in der Bleiacetatreaktion identisch. Das letzte Hydrolysat reagierte auf Bleiacetat etwas Bräunlich. Als Zucker sind Rhamnose, Arabinose und Glucose festgestellt worden. Daher kann man vermuten, daß ein Zucker bei der letzten Trennung abgespaltet worden ist, und zwar war es Glucose an der 3-Stelle. Der Stoff im Band 10 wird Kämpferol-oligosid mit Rhamnose und Arabinose sein, und der Stoff im Band 7 kann Kämpferol-oligosid mit Rhamnose, Arabinose und Glucose sein.

Catechin-Verbindungen und Leukoanthocyane sind in keinem der Typen ee, ff und gg festgestellt worden. Hieraus könnte man schließen, daß das Gen f die Synthese von Estern und Säuren zu Flavonoiden, Kämpferolglykosiden, oder eher in der Stufe vor Chalkon-Bildung, blockiert, und das Gen g die Synthese von Flavanon zu Flavon und von Flavanonol zu Catechin völlig blockiert. Das Gen e blockiert nicht völlig in den obigen Stellen, sondern teilweise bei den Synthesen von Flavanonol zu Flavonol und völlig die Synthese von Flavanon zu Flavon und von Flavanonol zu Catechin. Folglich akkumulieren sich die Ester und Säuren beim typ ee und zu gleicher Zeit wurde auch eine ziemliche Menge von Kämpferolglykoside (Band 6, 7 und 9) gefunden. Bei dem Typ ff akkumulieren sich die Ester und Säuren, und folglich sind die Abspaltungsprodukte von den Estern (Band 4, 5, 8 und 9) auch im Chromatogramme zu sehen. Beim Typ gg akkumuliert sich Kämpferol-7-arabino-rhamnosid (Band 1) in er-

heblicher Menge und auch die anderen Kämpferolglykoside (Band 7 und 10) sind in diesem Typ am meisten enthalten. Der Biosyntheseweg geht in der Reihe ff—ee—gg vor, d.h. am frühesten bei ff wird er auf der Stufe von Estern und am spätesten beim Typ gg an der Stufe von Flavanonol blockiert.

Zusammenfassung

Das Ziel der vorstehenden Untersuchungen war, die Wirkung dreier verschiedener rezeßiver Blütenfarbgene der Levkoje zu untersuchen und den Beitrag der weißen Blütenfarbe aufzuklären. Hierzu wurde das Pigmentmuster der drei Genotypen ee, ff und gg chromatographisch analysiert.

1. Die Hauptbestandteile in der Blütenblättern der drei Genotypen ee, ff und gg, waren Kämpferol-7-arabino-rhamnoside, Sinapinoyl-D-glucoseester und p-Cumarsäureester.

2. Der Genotyp ff enthält Sinapinsäureester und p-Cumarsäureester in der größten Menge. Der Genotyp gg enthält Kämpferolglykoside in der größten Menge und die Ester in sehr kleiner Menge. Der Genotyp ee enthält Kämpferolglykoside und Ester in mittlerer Menge.

3. Daraufhin kann man sagen, daß 1) das Gen e die Biosynthese von Flavanon teilweise und von Catechin völlig blockiert und sich die Substanzen als Kämpferolglykoside und Ester akkumulieren, 2) das Gen f die Bildung von Flavonoiden blockiert, vielleicht eher vor der Bildung von Chalkon. Die Substanzen akkumulieren sich als Ester, 3) das Gen g die Bildung von Flavon und Catechin blockiert und die Substanzen als Kämpferolglykoside und Ester akkumuliert bleiben.

4. Die Wirkungen der drei rezessiven Gene für die weiße Blütenfarbe auf dem Biosyntheseweg müssen in der Reihenfolge f—e—g vor sich gehen.

5. Die aliphatischen Aminosäuren waren Asparagin, Serin, Lysin, Threonin, Glutamin, Alginin, Valin und Leucin. Phenylalanin war in sehr geringer Menge als eine aromatische Aminosäure bei den Genotypen ff und gg festgestellt worden.

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

6. Der Nachweis der Chinasäure ist die rötlich braune Farbreaktion (Rf-Wert 0.5) im Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm mit dem Lösungsmittel 53%iger Essigsäure und durch besprühen mit H_2SO_4 c..

Danksagung

Diese vorliegende Arbeit wurde ermöglicht durch die großzügige Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) und der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft (DFG) unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Seyffert am Institut für Genetik der Universität Tübingen in Angriff genommen. Da dort nur eine terminierte Arbeitsmöglichkeit vom 1. 5. 1966 bis 31. 3. 1967 zur Verfügung stand, wurde die weitere Untersuchung bei Herrn Professor Dr. L. Hörhammer am Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München vom 18. 4. bis 31. 7. 1967 fortgeführt und zum Abschluss gebracht im Biologischen Institut der Otemae Frauen Universität, Nishinomiya Japan, 9. 1. 1968 bis 20. 2. 1968.

Die ergänzenden Resultate der genetischen und biochemischen Untersuchung über *Matthiola incana* werden durch Professor Dr. Seyffert veröffentlicht. Dieser Bericht beschränkt sich darauf über eine Methode des Nachweises der Chinasäure und die Existenz von D-Glucose als alkoholische Komponente der aromatischen Zimtsäuren, die in den Mutanten mit weißen Blüten enthalten sind, zu berichten.

Hier möchte ich meinen aufrichtigen Dank zum Ausdruck bringen: Dem DAAD, der DFG und Herrn Professor Dr. W. Seyffert, welcher diese Untersuchung angeregt hat, Herrn Professor Dr. L. Hörhammer und Herrn Professor Dr. H. Wagner, für ihre ständige Beratung, sowie auch den Mitarbeiter am Institut für Genetik, Universität Tübingen und am Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre, Universität München. Auch den Herrn Direktor N. Asao, Herrn Dr. Y. Hashitani und Herrn Dr. M. Shimamoto von der Ebios pharmazeutischen Industrie, Osaka, welche mir die Fazilität ihres Laboratoriums zur Verfügung stellten, bin ich zu großem Dank verpflichtet. Auch für manche Ratschläge von Herrn Prof. Dr. K. Yamashita am biologischen Laboratorium der Universität Kyoto möchte ich an dieser Stelle danken. Und nicht zuletzt gebührt mein Dank Herrn Kapitän W. Hoops (MS Travestein), welcher mir verständnisvoller Weise die Ungestörtheit seiner Kabine zur Verfügung stellte, um diesen Bericht auszuarbeiten.

LITERATURVERZEICHNIS

- AKABORI, S., Methode der Untersuchung der Enzyme (1956)
- BATE-SMITH, E. and N. H. LERNER, Leuco-Anthocyanins 2. Systematic Distribution of Leuco-Anthocyanins in Leaves. The Biochemical Journal, Vol. 58, No. 1, 126—132 (1954)
- BIRKOFER, K., Zeitschrift für Naturwissenschaft (1965)
- E. MERCK AG., Darmstadt, Chromatographie
- FRANK, U., Dissertation München (1966)
- FUNAKUBO, E., Feststellung der organischen Verbindungen (1956)
- GEISSMAN, T. A., The Chemistry of Flavonoid Compounds 328 (1962)
- GROLL, N., Zur Biogenese der Flavone und Anthocyanidine von *Petunia hybrida* var. *nana*, Dissertation München, s. 16 (1959)
- HÄIS, I. M. und K. MACEK, Handbuch der Papierchromatographie, Band I, (1963)
- HASLAM, E., Chemistry of Vegetable Tannins (1966)
- HEIN, K., Dissertation München (1965)
- HERRMANN, K., Über Kaffeesäure und Chlorogensäure, Die Pharmazie 7 11 jrg. (1956)
- HÖRHAMMER, L., H. WAGNER und H. SCHILCHER, Isolierung und Identifizierung der organischen Säuren, Arzneimittelforschung 12 1—7, s. 17 (1962)
- HÖRHAMMER, L., H. WAGNER und E. KHALIL, Über die Flavonolglykoside der Früchte des Sanddorns (*Hippophae rhamnoides*)
- HÖRHAMMER, L., L. STICH und H. WAGNER, Über die Flavonolglykoside der Lindenblüten I, 2036. Archiv der Pharmazie 249/66 Band, Heft 11, s. 687—692 (1964)
- JURD, L., The Detection of Aromatic Acids in Plantextracts by the Ultraviolet Absorption Spectra of Their Ions, Archives of Biochemistry and Biophysics 66, 284—288 (1957)
- KARLSON, P., Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler
- KARRER, W., Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, (1961)
- KLAGES, F., Oberbuch der organischen Chemie (1958)
- LINSKENS, H. F., Papierchromatographie in der Botanik
- NEU, R., Ein Nachweis für Chinasäure, Die Naturwissenschaften, 45 286 (1958)
- REZNIK, H. und ROSMARIE URBAN, Über den Metabolismus ¹⁴C-markierter Ferulasäure im Pflanzenversuch, Naturwissenschaften, 44 Heft 1 s. 13 (1957)

Biosynthese der Anthocyane und Flavonoide in *Matthiola incana*

- ROTH, C., Seltene Naturstoffe, 5 (1961)
- SCHILCHER, H., Dissertation München (1959)
- SCHMIDT, H., Chemische Untersuchungen über den Biosyntheseweg der Blütenfarbstoffe in Mutanten von *Antirrhinum majus*, Biologisches Zentralblatt, Band 81 Heft 1/2, 213—224 (1962)
- SEYFFERT, W., Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei der Levkoje Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, Band 44, Heft 1, 4—29 (1960)
- SEYFFERT, W., Genetische Untersuchungen *Matthiola incana*, Biologisches Zentralblatt, Band 81, Heft 1/2, 253—265 (1962)
- SEYFFERT, W., Über Geninteraktion bei der Ausbildung von Blütenfarben. XVth International Horticultural Congress—1962