

GIBBERELLINE—IV.¹

ÜBER DIE GIBBERELLINE VON *NICOTIANA TABACUM* L.

G. SEMBDNER und K. SCHREIBER

Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

(Eingegangen 16 Juni 1964)

Abstract—In shoot apices and flower buds of *Nicotiana tabacum* L. cv. "Virgin Gold A" the occurrence of endogenous gibberellins has been investigated. In addition to gibberellin A₁ and A₃ three, as yet unknown, polar gibberellin-like substances were found, provisionally named "Nicotiana α - γ ". By acid hydrolysis "Nicotiana γ " yields the gibberellin degradation product gibberic acid as well as carbohydrates and various amino acids. The native diterpene component of "Nicotiana γ " may be gibberellin A₁ and/or A₃.

IM VERLAUF unserer Arbeiten über die Aktivierung bzw. Hemmung des Schlüpfvorganges beim Kartoffelnematoden, *Heterodera rostochiensis* Woll., wurden im Wurzeldiffusat von Tabakpflanzen Substanzen mit gibberellinartiger Wirkung nachgewiesen.² Die nähere Untersuchung dieser Verbindungen ist in Angriff genommen worden. Da im Schrifttum bisher nur wenige Mitteilungen über den Nachweis gibberellinwirksamer Substanzen in *Nicotiana*-Arten vorliegen,³ erschien uns eine weitere Bearbeitung der in diesen Pflanzen vorkommenden endogenen Gibberelline notwendig.

Als geeignetes Ausgangsmaterial erwiesen sich Sprossspitzen und Blütenknospen von *Nicotiana tabacum* L. cv. "Virgin Gold A", von denen 2.9 kg Frischmaterial nach einem im "Experimentellen Teil" ausführlich beschriebenen Verfahren aufgearbeitet wurden. Dieses zeichnet sich dadurch aus, dass der methanolische Pflanzenextrakt nach der üblichen Essigesterextraktion zusätzlich mit n-Butanol ausgeschüttelt wird, um auch die stärker polaren Gibberelline zu gewinnen. Der n-Butanol-Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselsäuregel vorgereinigt. Die anschließende Isolierung und Identifizierung bzw. Charakterisierung der Gibberelline erfolgte im Mikromassstab. Die methodischen Voraussetzungen hierzu lieferte die Dünnschichtchromatographie, die sich auf dem Gibberellin-gebiet sowohl für analytische Zwecke^{4,5} als auch bei der mikropräparativen Reinigung und Gewinnung der nachgewiesenen Substanzen für die biologische Testung, für die Feststellung der physikalischen Konstanten sowie für die molekulmassenspektrographische Untersuchung⁶ sehr bewährt hat. Für den analytischen Nachweis wurden Parallelchromato-

¹ III. Mitteil.: G. SEMBDNER, *Tagungsber. Int. Symp. "Physiologie, Ökologie und Biochemie der Keimung"*, Greifswald (1963) (im Druck).

² G. SEMBDNER, G. OSSKE und K. SCHREIBER, *Ber. deut. botan. Ges.* 74, 370 (1961).

³ C. A. WEST und B. O. PHINNEY, *Plant Physiol.* 31 (Suppl.) 20 (1956) [unreife Tabaksamen].—K. CHAILAKHIAN und V. N. LOZHNIKOVA, *Ber. Akad. Wiss. UdSSR* 128, 1309 (1959). H. E. G. BUDAGYAN, V. N. LOZHNIKOVA, M. J. GOLDIN und K. CHAILAKHIAN, *Ber. Akad. Wiss. Armen. SSR* 36, 111 (1963) [Blätter von *N. tabacum* und *N. silvestris*].

⁴ G. SEMBDNER, R. GROSS und K. SCHREIBER, *Experientia* 18, 584 (1962).

⁵ J. MACMILLAN und P. J. SUTER, *Nature* 197, 790 (1963); M. KUTÁČEK, J. ROSMUS und Z. DEYL, *Biol. Plant.* 4, 226 (1962); T. KAGAWA, T. FUKINBARA und Y. SUMIKI, *Agric. biol. Chem. (Tokyo)* 27, 598 (1963).

⁶ M. VON ARDENNE, G. SCHNEIDER, K. SCHREIBER, G. SEMBDNER, K. STEINFELDER und R. TÜMLER, Veröffentlichung in Vorbereitung.

gramme an Kieselgel G mit 3 unterschiedlichen Entwicklungsgemischen angefertigt und die festgestellten R_f -Werte mit denen von authentischen Gibberellinen A_1 , A_3 , A_9 ⁷ verglichen (vgl. Tab. 1). Die Sichtbarmachung erfolgte mit 85-proz. Schwefelsäure, wobei die im UV-Licht auftretende Fluoreszenz als weiteres Charakterisierungsmerkmal herangezogen

TABELLE 1. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE IDENTIFIZIERUNG BZW. CHARAKTERISIERUNG VON GIBBERELLINEN AUS *Nicotiana tabacum* L.

	R_{Standard} -Werte (R_f von $A_1 = 1.00$) [†]			Fluoreszenzfarbe nach H_2SO_4 -Behandlung
	I	II	III	
Aus <i>N. tabacum</i> :				
A_1	1.00	1.00	1.15	blau
A_3	1.00	1.00	1.00	leuchtend türkis-blau
" <i>Nicotiana</i> α "	0.95	0	0	leuchtend blau
" <i>Nicotiana</i> β "	0.25	0	0	leuchtend blau
" <i>Nicotiana</i> γ "	0	0	0	leuchtend blau
Vergleichssubstanzen:				
A_1	1.00	1.00	1.15	blau
A_3	1.00	1.00	1.00	leuchtend türkis-blau
A_4	1.20	1.74	✓	rötl.-violett m. braunem Rand
A_5	1.30	1.68	✓	matt grün-grau
A_6	1.15	1.57	✓	blau
A_7	1.25	1.74	✓	blau-grau m. gelb-braunem Rand
A_8	0.70	0.60	0.48	leuchtend grün-blau
A_9	1.55	2.22	✓	violett

[†] Entwicklungsgemisch I: n-Propanol:5 N NH_3 (5:1), ~ 10 Stdn. ($R_f A_1 = 0.42$), II: Chloroform:Essigester:Eisessig (5:4:1), ~ 3 Stdn. ($R_f A_1 = 0.39$), III: Chloroform:Essigester:Eisessig (70:30:5), 15 Stdn. durchlaufend, (Laufstrecke von $A_1 = 8$ cm); 0 = Substanz am Startpunkt, ✓ = in der Nähe der Lösungsmittelfront. Gemisch II ermöglicht eine ähnliche Trennung auf aktivierten Kieselgel-G-Schichten wie das früher⁴ für nichtaktivierte Schichten verwendete Gemisch Chloroform:Essigester:Eisessig (60:40:5).

wurde. Für mikropräparative Zwecke verwendeten wir dickere Kieselgel-G-Schichten und eluierten die nach Streifendetektion erhaltenen Zonen mit Methanol. In Voruntersuchungen wurde geprüft, ob hierbei Gibberellinverluste auftreten. Dazu wurden bekannte Mengen Gibberellin A_3 mit Gemisch I bzw. II (vgl. Tab. 1) chromatographiert und nach Elution im Biotest quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass Aktivitätsverluste praktisch nicht auftreten. Für den Nachweis der Gibberellinwirksamkeit der dünnschichtchromatographisch einheitlichen Präparate verwendeten wir im allgemeinen den Zwergerbsen-Test.⁸

Im Essigesterextrakt liessen sich gibberellinartige Substanzen nicht mit Sicherheit nachweisen. Hingegen konnten wir im n-Butanolextrakt folgende Gibberelline feststellen (vgl. Tab. 1): Gibberellin A_1 und A_3 , die durch dünnschichtchromatographischen Vergleich der freien Säuren bzw. ihrer Methylester (Tab. 2) mit authentischen Verbindungen identifiziert wurden, sowie 3 weitere, starker polare Gibberelline, die sich mit keinem der bisher bekannten als identisch erwiesen und die vorläufig als "*Nicotiana* α , β , γ " bezeichnet werden. Auch

⁷ P. W. BRIAN, J. F. GROVE und J. MACMILLAN, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* **18**, 350 (1960); J. F. GROVE, *Quant. Rev. (London)* **15**, 56 (1961).

⁸ B. O. PHINNEY und C. A. WEST in: W. RUHLAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. 14, S. 1185, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1961); R. KNAPP in: H. F. LINSEN und H. V. TRACY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. 6, S. 203, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1963).

die von uns in *Phaseolus coccineus* L. nachgewiesenen polaren Gibberelline "Phaseolus α - δ "⁹ unterscheiden sich von den in *Nicotiana* neu aufgefundenen Substanzen; lediglich "Nicotiana β " und "Phaseolus ϵ " zeigen ein chromatographisch ähnliches Verhalten.

TABELLE 2. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE IDENTIFIZIERUNG VON GIBBERELLIN-METHYLESTERN

Gibberellin-methylester	R_f -Wert*	
	I	II
Dargestellt aus		
<i>Nicotiana</i> -Gibberellinen:		
A ₁ -Methylester	0.12	0.32
A ₃ -Methylester	0.10	0.25
Vergleichssubstanzen:		
A ₁ -Methylester	0.12	0.31
A ₃ -Methylester	0.10	0.25

* Entwicklungsgemisch I: Di-isopropyläther: Eisessig (98: 2);⁹

II: Benzol: Eisessig: Wasser (8: 3: 5)⁵.

Bei parallel geprüften grünen Tabakfrüchten mit unreifen, weissen Samen (800 g Frischgewicht) konnte nach entsprechender Aufarbeitung nur geringe Gibberellinwirksamkeit in wenigen dünnsschichtchromatographischen Fraktionen festgestellt werden.

"Nicotiana γ " ist das Hauptgibberellin im n-Butanolextrakt aus Sprossspitzen und Blütenknospen, so dass Material für einige zusätzliche Untersuchungen zur Verfügung stand. Die sehr polare Substanz besitzt starke biologische Wirksamkeit ausser bei Zwergerbbsen auch im Mais-Test⁸ mit der Zwergmutante d-1. Bei der Dünnschichtelektrophorese¹⁰ wandert "Nicotiana γ " sowohl im sauren (pH 4.0) als auch im alkalischen Bereich (pH 8.0) eine kurze Strecke in kathodischer Richtung, wogegen die bekannten Gibberelline A₁-A₉ stets eine anodische Wanderung zeigen. Das chromatographische und elektrophoretische Verhalten von "Nicotiana γ " sowie die im folgenden ausführlich dargestellten Untersuchungen lassen erkennen, dass es sich hier, ähnlich wie bei "Phaseolus ϵ ",⁹ um ein gebundenes Gibberellin handelt.

Nach Hydrolyse von chromatographisch einheitlichem "Nicotiana γ " mit 6 N HCl (6 Std. unter Rückfluss) liessen sich mit Essigester Gibberellin-Abbauprodukte extrahieren, von denen eines als Gibberinsäure¹¹ durch dünnsschichtchromatographischen Vergleich der freien Säure bzw. ihres Methylesters mit authentischen Verbindungen identifiziert wurde (Tab. 3). In der wässrigen Phase wurden durch ein- und zweidimensionale Papierchromatographie sowie durch Dünnschichtchromatographie die in Abbildung 1 angeführten ninhydrinpositiven Substanzen sowie mindestens 2 Kohlenhydrate nachgewiesen. Von den Zuckern korrespondierte einer in seinem chromatographischen Verhalten mit Glucose, während der zweite einen kleineren R_f -Wert aufwies. Nicht auszuschliessen ist, dass die letztgenannte anilinhydrogenphthalatpositive Substanz ein Artefakt darstellt (eventuell Maillard-Produkt, entstanden durch Umsetzung der Zucker mit stickstoffhaltigen Verbindungen unter den Hydrolysebedingungen). Nach schonenderer Hydrolyse (6 stdg.

⁹ G. SEMBDNER, G. SCHNEIDER, J. WEILAND und K. SCHREIBER, *Experientia* 20, 89 (1964).

¹⁰ K. SCHREIBER, G. SCHNEIDER und G. SEMBDNER, *J. Chromatog.* (in Vorbereitung).

¹¹ B. E. CROSS, J. F. GROVE, J. MACMILLAN und T. P. C. MULHOLLAND, *J. Chem. Soc.* 2520 (1958); J. F. GROVE, J. MACMILLAN, T. P. C. MULHOLLAND und W. B. TURNER, *J. Chem. Soc.* 3049 (1960).

TABELLE 3. DUNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE IDENTIFIZIERUNG VON GIBBERINSÄURE UND IHRES METHYLESTERS

Substanz	R _F -Werte*		
	I	II	III
Gewonnen aus "Nicotiana glauca":			
Gibberinsäure	0.57	0.28	0.41
Gibberinsäuremethylester	0.84	0.34	0.62
Vergleichssubstanzen:			
Gibberinsäure	0.58	0.30	0.42
Gibberinsäuremethylester	0.85	0.35	0.62

* Entwicklungsgemisch I. Chloroform: Essigester, Eisessig (90:10:5), ~ 3 Stdn.; II: Benzol: Eisessig (90:5), ~ 3 Stdn.; III: Benzol: Essigester: Eisessig (90:10:5), ~ 3 Stdn.

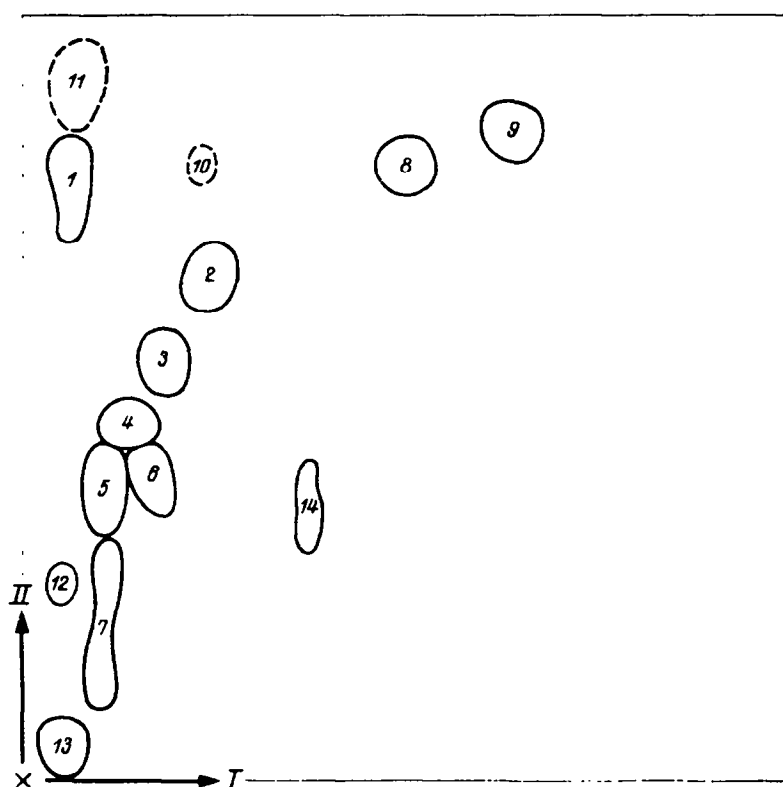


ABB. 1 PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE IDENTIFIZIERUNG BZW. CHARAKTERISIERUNG VON NINHYDRINPOSITIVEN SUBSTANZEN IM HYDROLYSAT VON "NICOTIANA glauca".

Zur Methodik vgl. Exper. Teil. 1 = Arginin. 2 = Alanin. 3 = Threonin. 4 = Glycin. 5 = Serin. 6 = Glutaminsäure. 7 = Asparaginsäure. 8 = Methionin und/oder Valin. 9 = Leucin und/oder Isoleucin. 10 = Sarcosin (?). 11-14 = nicht identifizierte Substanzen.

Erhitzen mit 2 N H₂SO₄) von "Nicotiana γ " konnten wir neben einer im Vergleich zu Abbildung 1 geringeren Anzahl ninhydrinpositiver Substanzen 2 Monosaccharide feststellen, und zwar Glucose und einen weiteren Zucker mit grösserem R_f -Wert, bei dem es sich auf Grund chromatographischer Vergleiche wahrscheinlich um Rhamnose handelt.

Bemerkenswert ist, dass die in dieser Pflanze nachgewiesenen relativ unpolaren Gibberelline A₁ und A₃ im Butanolextrakt und nicht, wie zu erwarten, bereits im Essigesterextrakt auftreten. Vermutlich lagen beide ursprünglich nicht in freier, sondern in gebundener Form im Pflanzenmaterial vor und wurden erst im Verlauf der langwierigen Aufarbeitung der Extrakte sekundär in Freiheit gesetzt. Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, dass in einer chromatographisch einheitlichen, anfangs nur "Nicotiana γ " enthaltenden Probe nach längerer Zeit spontan ein weniger polares Gibberellin auftrat, das im Dünnschichtchromatogramm von A₃ nicht zu unterscheiden war. Ob auch "Nicotiana α und β " durch partielle Hydrolyse aus "Nicotiana γ " entstanden sind, muss durch weitere Untersuchungen geprüft werden.

Zusammenfassend sei festgestellt, dass in Sprossspitzen und Blütenknospen von *Nicotiana tabacum* L. cv. "Virgin Gold A" ein stark polares gebundenes Gibberellin vorherrscht, bei dessen Spaltung Gibberinsäure, Kohlenhydrate und eine Reihe Aminosäuren entstehen. Als native diterpenoide Komponente kommt nach vorliegenden Befunden vor allem Gibberellin A₁ und/oder A₃ in Frage. Ein Vorkommen von Gibberellin A₁ und A₃ in freier Form ist für mehrere höhere Pflanzen beschrieben.^{9,12} Auch über das Auftreten stark polarer gibberellinwirksamer Substanzen liegen in der Literatur bereits einige Hinweise vor, so für Kartoffelknollen,¹³ Bohnen- und Salatpflanzen¹⁴ sowie für Samen von *Pharbitis nil* Choisy.^{15,16,18} und *Wistaria floribunda* DC.¹⁵ Die Existenz gebundener Gibberelline in höheren Pflanzen ist früher gelegentlich diskutiert^{13,15,17,18} und bei *Phaseolus coccineus* L. sicher nachgewiesen⁹ worden. Über die Bildung eines Gibberellinsäure-glucosids *in vitro*¹⁹ und nach Gibberellin-A₃-Applikation *in vivo*¹⁵ wurde gleichfalls berichtet.

EXPERIMENTELLER TEIL

Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Von im Gewächshaus kultivierten Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. "Virgin Gold A") wurden laufend Blütenknospen und Sprossspitzen abgeschnitten, in Methanol eingelegt und so bis zur Weiterverarbeitung bei 0–2° aufbewahrt. Dieses Material wurde grob zerkleinert 3 mal je 24 Std. bei Raumtemperatur mit Methanol extrahiert. Die von insgesamt 2·9 kg Frischmaterial erhaltenen Extrakte (15 l.) wurden i. Vak. bei maximal 40° Badtemperatur auf etwa 3 l. eingengt und filtriert. Nach Ansäuern mit Salzsäure auf pH 2·6–2·8 wurde einmal mit 3 l. und 2 mal mit je 1·5 l. Essigester und danach 2 mal mit je 1·5 l. n-Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterauszüge extrahierte man 3 mal mit je 1·5 l. Pufferlösung (0·2 M KH₂PO₄/NaOH, pH 6·8). Die anschliessend auf pH 2·6–2·8

¹² Vgl. A. KAWARADA und Y. SUMIKI, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* **23**, 343 (1959); J. MACMILLAN, J. C. SEATON und P. J. SUTER, *Tetrahedron* **11**, 60 (1960); D. F. JONES, J. MACMILLAN und M. RADLEY, *Phytochem.* **2**, 307 (1963); G. W. ELSON, D. F. JONES, J. MACMILLAN und P. J. SUTER, *Phytochem.* **3**, 93 (1964).

¹³ F. HAYASHI, S. BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT und L. RAPPAPORT, *Plant Physiol.* **37**, 774 (1962).

¹⁴ A. W. WHEELER, *J. Exp. Botany* **13**, 36 (1962).

¹⁵ Y. MURAKAMI, *Botan. Mag. (Tokyo)* **75**, 451 (1962).

¹⁶ Y. OGAWA, *Plant Cell Physiol.* **4**, 217 (1963).

¹⁷ L. LAZER, W. E. BAUMGARTNER und R. V. DAHLSTROM, *J. Agric. Food Chem.* **9**, 24 (1961).

¹⁸ A. J. MCCOMB, *Nature* **192**, 575 (1961).

¹⁹ Y. MURAKAMI, *Botan. Mag. (Tokyo)* **74**, 424 (1961).

angesäuerten wässr. Phasen wurden, wie oben beschrieben, mit Essigester ausgezogen. Diese Essigesterextrakte (nach Trocknung über Na_2SO_4) sowie die n-Butanolextrakte wurden getrennt i. Vak. (Badtemp. max 40°) bis zur Trockne eingeengt und die Rückstände chromatographisch untersucht.

Chromatographische Verfahren zur Trennung und Identifizierung der Gibberelline

Im Rückstand des Essigesterextrakts konnten weder dünn-schichtchromatographisch noch durch biologische Testung Gibberelline eindeutig nachgewiesen werden.

Den wesentlich grösseren Rückstand der n-Butanolextraktion (etwa 17 g) reinigte man durch Chromatographie an Kieselsäuregel [VEB (K) Feinchemie Eisenach, Thür.], das 30 Min in der Kugelmühle gemahlen, durch ein Sieb der Maschenweite 0.5 mm gegeben und mit Chloroform in die Säule eingeschlammmt wurde. Den Butanolrückstand adsorbierte man an möglichst wenig Kieselgur und verteilte dieses auf 2 präparierte Kieselgelsäulen (Grösse 30×3 cm). Die Elution erfolgte nach dem Gradientenprinzip mit folgenden Systemen (je 100 ml): Chloroform + steigender Anteil Essigester (10%-Stufen), Essigester + steigender Anteil n-Butanol (5%-Stufen), n-Butanol + steigender Anteil Methanol (10%-Stufen); abschliessend wurde mit etwa 2 l. Methanol nacheluiert. Auf diese Weise erhielt man von jeder Säule 120 Fraktionen zu je 50 ml, die einzeln i. Vak. eingeengt (Badtemp. max 40°) und dünn-schichtchromatographisch (vgl. Tab. 1) geprüft wurden. Die Hauptmenge der teilweise von den Verunreinigungen abgetrennten Gibberelline fand sich in den n-Butanol-Methanol-Eluaten.

Für die Dünn-schichtchromatographie (DC) verwendeten wir Platten der Grösse 13×25 cm und als Adsorbens Kieselgel G (Merck). Für die präparative DC wurde eine Suspension von 10 g Adsorbens in 30 ml Wasser, für die analytische DC von 5 g in 17 ml je Platte aufgegossen, bei Raumtemperatur getrocknet und 30 Min bei 110° aktiviert. (Schichtdicke ~ 0.7 bzw. ~ 0.35 mm.)

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte aufsteigend bei 20° , und zwar für analytische DC mit den in Tabelle 1-3 angeführten Gemischen.

Die gibberellinhaltigen Fraktionen der Säulenchromatographie wurden zur weiteren Reinigung und mikropräparativen Gewinnung mehrfach an 0.7 mm dicken Kieselgelschichten unter Verwendung folgender Entwicklungsgemische chromatographiert:

- (a) zur Gewinnung von Gibberellin A_1 und A_2 : Chloroform:Essigester:Eisessig (70:30:5), 15 Stdn. durchlaufend; (b) zur Gewinnung von "Nicotiana α ": Chloroform:Essigester:Eisessig (5:4:1), Methanol:Eisessig (100:2), Isopropanol:3 N NH_3 (5:1); (c) zur Gewinnung von "Nicotiana β ": Chloroform:Essigester:Eisessig (5:4:1), n-Propanol:Wasser (9:1); (d) zur Gewinnung von "Nicotiana γ ": Chloroform:Essigester:Eisessig (5:4:1), n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:1), n-Propanol:Essigester:Wasser:Eisessig (70:15:15:5).

Für den Nachweis der Gibberelline wurde mit 85-proz. Schwefelsäure besprüht, 10 Min auf 110 – 120° erhitzt und die im UV auftretende Fluoreszenz festgestellt (bezüglich der jeweiligen Fluoreszenzfarben vgl. Tab. 1). Gibberinsäure und ihr Methylester (Tab. 3) wurden auf gleiche Weise nachgewiesen (schwache gelbbraune Fluoreszenz). Bei der präparativen DC musste durch besondere Vorkehrungen dafür gesorgt werden, dass nur der für die Detektion der Zonen mit Schwefelsäure behandelte Randstreifen auf etwa 110 – 120° erhitzt wurde.

*Dünnschichtelektrophorese*¹⁰

Die Herstellung der Kieselgel-G-Schichten (auf Glasplatten der Grösse 13 × 25 cm) erfolgte in gleicher Weise wie für die DC. Die verwendete Pufferlösung (nach Theorell-Stenhagen, 1:4 verdünnt, pH = 4.0 bzw. 8.0) wurde mit Hilfe von Papierbrücken (Schleicher und Schüll 2071) auf die Kieselgelschicht übertragen. Gearbeitet wurde bei 200 Volt (5 Stdn.) mit einer Apparatur zur horizontalen Papier-elektrophorese (VEB C. Zeiss, Jena).

Darstellung der Methylester

Die durch mikropräparative DC aus *N. tabacum* gewonnenen Gibberelline A₁ und A₃ wurden jeweils in 1 ml Methanol gelöst. Durch diese Lösungen leitete man bei Raumtemperatur bis zur Gelbfärbung Diazomethan und anschliessend 5 Min Stickstoff. Nach Entfärbung (bei 5°) wurde i. Vak. bei 40° Badtemperatur bis zur Trockne eingengt und der Rückstand dünnschichtchromatographisch geprüft (vgl. Tab. 2).

Untersuchung von "Nicotiana γ"

Eine durch mikropräparative DC gewonnene Probe von "Nicotiana γ" wurde zur Hydrolyse mit 2.5 ml 6 N HCl 6 Stdn. unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Zusatz von 2.5 ml Wasser extrahierte man 3 mal mit je 5 ml Essigester. Die vereinigten Essigesterauszüge und die wässrige Phase wurden getrennt bei möglichst niedrigen Temperaturen i. Vak. eingengt und im Vakuumexsikkator über KOH nachgetrocknet.

Der Rückstand des Essigesterextrakts wurde in 1 ml Methanol gelöst und die vorhandene Gibberinsäure direkt bzw. nach Veresterung mit Diazomethan (zur Methodik vgl. Darstellung von Gibberellin-A₁- und -A₃-methylester) als Methylester dünnschichtchromatographisch identifiziert (vgl. Tab. 3).

Der Rückstand der wässrigen Phase (nach Essigesterextraktion) wurde mit 1 ml Wasser aufgenommen und papier- bzw. dünnschichtchromatographisch auf vorkommende ninhydrinpositive Substanzen und Kohlenhydrate geprüft.

Nachweis und teilweise Identifizierung der ninhydrinpositiven Verbindungen erfolgte durch zweidimensionale Papierchromatographie (Schleicher und Schüll 2043 bM, Grösse 19 × 19 cm). Das Papier wurde vor Verwendung mit einer 0.1-proz. Lösung von Na₂EDTA getränkt und anschliessend bei 105° getrocknet. Entwicklung I. mit n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:1), II. mit Phenol:Wasser (4:1). Für die Detektion verwendete man eine Lösung von 0.5% Ninhydrin in Aceton + 5% Wasser + 1% Eisessig. Abbildung 1 zeigt ein typisches Chromatogramm, in dem die durch Vergleich mit authentischen Substanzen identifizierten Aminosäuren angegeben sind. Das Ergebnis wurde gesichert durch eindimensionale Papierchromatographie (Schleicher und Schüll 2043 bMgl, Keilstreifen, aufsteigende Entwicklung mit n-Butanol:Aceton:Wasser:Dicyclohexylamin = 10:10:5:2)²⁰ und Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G Merck, aufsteigende Entwicklung mit Phenol:Wasser = 3:1, n-Butanol:Eisessig:Wasser = 4:1:1 bzw. Äthanol:Wasser = 7:3).²¹

Die Untersuchung der im Hydrolysat vorhandenen Zucker erfolgte durch DC an Kieselgel G (Merck, Entwicklung mit n-Propanol:Essigester:Wasser = 7:2:1)²¹ bzw. Kieselgur G (Merck, imprägniert mit 0.1 M Natriumacetat, Entwicklung mit Essigester:Isopropanol:Wasser = 16:6:3).²² Zum Nachweis verwendete man Anilinhydrogenphthalatreagens.

²⁰ T. L. HARDY, D. O. HOLLAND und J. H. C. MAYLER, *Analyt. Chem.* 27, 971 (1955).

²¹ E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1962).

²² V. PREY, H. SCHERZ und E. BANCHER, *Microchim. Acta (Wien)* 567 (1963).

Ausser Glucose ($R_f = 0.10$) liess sich eine weitere Substanz mit $R_{G, \text{Kieselgur}} = \text{etwa } 0.50$ (an Kieselgur) nachweisen.

Eine weitere Probe von "Nicotiana γ " wurde mit 2 ml 2 N H_2SO_4 6 Std. unter Rückfluss hydrolysiert, mit überschüssigem BaCO_3 neutralisiert und unter sorgfältigem Nachwaschen mit heissem Wasser filtriert. Das Filtrat engte man i. Vak. auf 1 ml ein. Papier- bzw. dünn-schichtchromatographisch (zur Methodik vgl. oben) liessen sich Alanin, Threonin, Glycin, Serin, Glutaminsäure, Methionin und/oder Valin, Leucin und/oder Isoleucin sowie die Kohlenhydrate Glucose und Rhamnose nachweisen.

Biotest

Für den Nachweis der Gibberellinwirksamkeit der dünn-schichtchromatographisch einheitlichen Präparate diente der Zwergerbsen-Test⁸ mit folgenden 2 Sorten: *Pisum sativum* L. s.l. ssp. *sativum* convar. *sativum* var. *cimitari* Alef. s.l. cv. 'Meteor' bzw. *Pisum sativum* L. s.l. ssp. *sativum* convar. *sativum* var. *nanoanglicum* Körn. cv. 'Monopol'. Zur biologischen Testung von "Nicotiana γ " diente ausserdem die Zwergmutante d-1 von *Zea mays* L.⁸

Für den Test wurden die Rückstände der Methanoleluate der mikropräparativen DC in 2 ml schwach ammoniakal. Wasser gelöst (End-pH 7.0) und hiervon je 0.1 ml je Versuchspflanze verwendet ($4 \times 25 \mu\text{l}$ in die Achsel des ersten voll ausgebildeten Blattes). Nach 10 tägiger Kultur in Gewächshaus bei täglich 16 stdg. Lichtdauer wurde die Längenzunahme oberhalb der Auftragsstelle gemessen. Als positiv galt eine Reaktion, die mindestens derjenigen von 0.1 μg Gibberellin A_3 gleichkommt.

Anerkennung—Wir danken Herrn Dr. J. F. Grove, Welwyn/Herts., für die Überlassung einiger Gibberellinproben und Herrn Prof. Dr. A. Lang, Pasadena, Calif., für Samenmaterial der Maismutante d-1. Herrn Dr. G. Scholz sind wir für die Ausführung der zweidimensionalen Papierchromatographie von Aminosäuren, Herrn Dipl.-Chem. G. Schneider für die Darstellung der Methylester und die Durchführung der Dünnschichtelektrophorese sowie Frau I. Heinemann für technische Mitarbeit sehr verbunden.