

## NOTIZEN

**Untersuchungen über Carotinoide in Gametangien und Sporen von *Allomyces arbuscula***Studies on Carotenoids in Gametangia and Spores of *Allomyces arbuscula*

P. Fährnich und L. Chenaux

Institut für Biotechnologie der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

(Z. Naturforsch. **32 c**, 442–443 [1977]; eingegangen am 1./22. März 1977)*Allomyces arbuscula*, Carotenoids, Gametangia, Mitospores

Carotenoids were extracted from gametophytes of *Allomyces arbuscula* at different periods during gametogenesis. After separation by thin-layer chromatography  $\gamma$ -carotene, lycopene and  $\beta$ -carotene were identified from their absorption spectra in visible light. No other carotenoids were detected. After a lag period of 30 min following induction of gametogenesis  $\gamma$ -carotene was the only carotenoid present in extracts, followed by traces of  $\beta$ -carotene at 60 min and by lycopene at 90 min. Accumulation of carotenoids continued during the later stages of gametangia development. Analysis of pigments that had been extracted from asexual mitospores showed that these spores contained both  $\gamma$ -carotene and lycopene.

Der Entwicklungszyklus des Phycomyceten *Allomyces arbuscula* verläuft mit einem charakteristischen Generationswechsel zwischen Sporophyt und Gametophyt. Beide Generationen bilden spezifische Fortpflanzungsorgane aus, der Sporophyt farblose Mitosporangien neben dunkelbraun gefärbten Meiosporangien, der Gametophyt in Paaren ungefärbte weibliche und rötlich-orange pigmentierte männliche Gametangien. Von verschiedenen Autoren wird als vorherrschendes Pigment das  $\gamma$ -Carotin angegeben<sup>1,2</sup>, Lycopin und  $\beta$ -Carotin kommen bei den Eualloycesarten daneben nur in Spuren vor. In Mitosporangien und Mitosporen wurden Carotinoide bisher nur bei *Allomyces moniliformis* nachgewiesen<sup>3</sup>. Bei dieser Spezies fällt die gametophytische Generation aus. Bei *Allomyces arbuscula* läßt sich die Gametangienbildung durch Nährstoffentzug induzieren. Die Gametangienentwicklung verläuft mit einer scharfen Synchronizität, die weiblichen Gametangien werden zeitlich vor den männlichen angelegt<sup>4</sup>. Somit kann experimentell geprüft werden, ob die Pigmentsynthese eng korreliert ist mit der Differenzierung der männlichen Gametangien. Dar-

über soll im folgenden berichtet werden und es wird weiter gezeigt, daß auch die ungeschlechtlichen Mitosporen von *Allomyces arbuscula* Carotinoide enthalten.

*Material und Methoden*

**Kulturbedingungen.** Die Gametophyten von *Allomyces arbuscula* BUTLER wurden aus Meiosporen, die Sporophyten aus Zygoten oder aus Mitosporen in YpSs-Nährlösung nach Emerson<sup>3</sup> (12 g lösliche Stärke, 4 g Difco-Hefeextrakt, 1 g  $K_2HPO_4$ , 0,5 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ , 1000 ml dest.  $H_2O$ ) angezogen. Die Auslösung der Gametangien- und Mitosporangienbildung erfolgte durch Umsetzen der 40 Stunden in Nährlösung bei 32 ° unter Schütteln gewachsenen Mycelien in 25 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0–7,2)<sup>4,5</sup>. Die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane wurde mit einem Zeiss-Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Die Mitosporenbildung wurde nach 4 Stunden durch einen Austausch des Puffers gegen dest.  $H_2O$  und eine gleichzeitige Temperaturerniedrigung auf 25 °C ausgelöst.

**Pigmentextraktion und Dünnschichtchromatographie.** Vor der Pigmentextraktion wurden die Mycelien mit Papiertüchern entfachtet. Die Mitosporen wurden durch Zentrifugation bei 2700  $\times g$  sedimentiert. Mycelmaterial und Sporen wurden mehrmals bis zur vollständigen Entfärbung mit Aceton extrahiert ( $N_2$ -Atmosphäre), die Extrakte auf annähernd 4 ml eingengt und mit 4 g KOH, 75 ml Methanol und 25 ml Äthanol bei 60 °C unter  $N_2$  60 min verseift<sup>6</sup>. Danach wurden die Pigmente in Petroleumbenzin (Siedepunkt 40–60 °C) übergetrieben, der mit Wasser gewaschene Farbstoffauszug mit  $Na_2SO_4$  (wasserfrei) getrocknet und am Rotationsverdampfer eingedampft.

Zur adsorptionschromatographischen Trennung wurden die Pigmentproben in 200  $\mu l$  Aceton aufgenommen und Aliquote in einer Startlinie unter  $N_2$ -Begasung auf eine 0,5 mm dicke Schicht aus  $CaCO_3$ ,  $MgO$  und  $Ca(OH)_2$ <sup>7</sup> aufgebracht. Die Chromatographie erfolgte in  $N_2$ -Atmosphäre mit Benzol als Fließmittel. Die Farbstoffzonen wurden abgeschabt, mit Chloroform eluiert und das Adsorbens durch Zentrifugation entfernt.

**Absorptionsmessungen.** Die Absorptionsspektren von Pigmentgemischen und von chromatographisch gereinigten Pigmenten wurden mit einem Spektralphotometer Zeiss PMQ II aufgenommen. Die Berechnung der absoluten Farbstoffmengen aus der Extinktion  $E$  bei  $\lambda_{max}$  in Petroleumbenzin (Siede-

Sonderdruckanforderungen an Dr. P. Fährnich, Institut für Biotechnologie der Kernforschungsanlage Jülich GmbH, Postfach 1913, D-5170 Jülich 1.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

punkt 40–60 °C) erfolgte mit Hilfe der spezifischen Extinktionskoeffizienten  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  ( $\gamma$ -Carotin: 2760, Lycopin: 3450,  $\beta$ -Carotin: 2560).

### Ergebnisse und Diskussion

Der Farbstoff des Gametophyten von *Allomyces arbuscula* besteht aus drei Komponenten. Die Identifizierung der adsorptionschromatographisch aufgetrennten Einzelpigmente wurde in verschiedenen Lösungsmitteln über die Absorptionsspektren vorgenommen. Die Pigmente sind  $\gamma$ -Carotin, Lycopin und  $\beta$ -Carotin. Das  $\beta$ -Carotin, welches bei den bisher untersuchten *Euallomyces*-arten nicht oder nur in Spuren vorkommt<sup>1,2</sup>, kann bei dem hier untersuchten Gametophyten bis zu 10% der Gesamtpigmentmenge ausmachen.

Zur Prüfung der Frage, wann die Carotinoid-synthese einsetzt, wurden die Mycelien 0, 15, 30, 60 und 90 min nach Induktion der Gametangienbildung auf ihren Gehalt an den einzelnen Carotinoiden untersucht. Nach 30 min wird  $\gamma$ -Carotin als zuerst auftretendes Pigment nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt sind die Querwände, welche die weiblichen Gametangienanlagen von den Hyphen abgrenzen, noch nicht gebildet. Um die 60. min, wenn die Hyphenspitzen zu weiblichen Gametangienanlagen umgebildet sind, tritt neben  $\gamma$ -Carotin in Spuren  $\beta$ -Carotin auf. Lycopin wird zwischen der 60. und 90. min gebildet, die Differenzierung der männlichen Gametangien hat dann begonnen. Im Verlauf der Gametangienreifung nimmt die Farbstoffmenge stetig zu, so stieg der Gehalt an  $\gamma$ -Carotin von 4  $\mu\text{g}$  pro g Myceltrockengewicht in der 150. min auf 12  $\mu\text{g}$  in der 240. min nach der Induktion, der an Lycopin von 7  $\mu\text{g}$  auf 11  $\mu\text{g}$ . Aus den Versuchsergebnissen läßt sich entnehmen, daß bei *Allomyces* die einzelnen Carotinoide zeitlich aufeinanderfolgend synthetisiert werden. Die Biosynthese setzt bereits vor der Morphogenese der männlichen Gametangien ein und es ist nicht auszuschließen, daß auch die farblos erscheinenden weiblichen

Gametangien Carotinoide in geringen Mengen enthalten.

Die Mitosporangien von *Allomyces arbuscula* erscheinen bei lichtmikroskopischer Betrachtung unpigmentiert. Dichte Sporensuspensionen mit einem Titer von  $>10^8$  Sporen/ml sind hingegen rötlich-orange gefärbt. Die Absorptionskurven der Farbstoffauszüge von Sporen sind identisch mit den Absorptionskurven der Extrakte von ausdifferenzierten Gametophyten. Die dünn-schichtchromatographische Auftrennung des Sporenfarbstoffs liefert eindeutig zwei Farbstoffzonen. Co-Chromatographie mit Gametangien-Carotinoiden und ihre Absorptionsmaxima identifizieren diese Sporenpigmente als  $\gamma$ -Carotin und Lycopin. Die Carotinoide kommen in den Sporen in äußerst geringer Konzentration vor, so enthielten  $10^8$  Sporen insgesamt 1 bis 2  $\mu\text{g}$  an Farbstoff.

Nach wie vor ist die Funktion der Carotinoide bei *Allomyces* umstritten. Nach Emerson und Fox<sup>1</sup> spielen sie eine wesentliche Rolle für die geschlechtliche Fortpflanzung des Pilzes. Andererseits zeigten Turian und Haxo<sup>2</sup> an *Allomyces javanicus*, daß auch bei einer stark gehemmten Carotinoidsynthese die Reproduktionsvorgänge normal ablaufen. Ein Zusammenhang zwischen Carotinoidproduktion und Sexualität kann allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Welche Bedeutung die Carotinoide für die ungeschlechtlichen Sporen von *Allomyces* haben, ist noch unklar. Auf einseitig einfallendes Licht reagieren die Sporen von *Allomyces* nach unserer Beobachtung positiv phototaktisch. Eine positive Phototaxis beobachtete bereits Robertson<sup>8</sup> bei Zoosporen von *Allomyces reticulatus*<sup>9</sup>, die im Lichtmikroskop keine Färbung zeigen. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob ein Zusammenhang zwischen Carotinoiden und positiver Phototaxis bei den Sporen von *Allomyces* besteht.

Frau M. Gellissen danken wir für ihre wertvolle technische Mitarbeit.

<sup>1</sup> R. Emerson u. D. L. Fox, Proc. Roy. Soc., Ser. B, **123**, 275–293 [1940].

<sup>2</sup> G. Turian u. F. T. Haxo, Bot. Gaz. **115**, 254–260 [1954].

<sup>3</sup> R. Emerson, Lloydia **4**, 77–144 [1941].

<sup>4</sup> P. Fährnrich, Arch. Microbiol. **98**, 85–92 [1974].

<sup>5</sup> P. Fährnrich, Naturwissenschaften **63**, 247 [1976].

<sup>6</sup> H. C. Rilling, Biochim. Biophys. Acta **79**, 464–475 [1964].

<sup>7</sup> A. Hager u. T. Meyer-Bertenrath, Planta **69**, 198–217 [1966].

<sup>8</sup> J. A. Robertson, Arch. Mikrobiol. **85**, 259–266 [1972].

<sup>9</sup> R. Emerson u. J. A. Robertson, Amer. J. Bot. **61**, 303–317 [1974].