

Prom. Nr. 2678

B Diss ETH

ÜBER DIE BIOSYNTHESE
UND DIE UMWANDLUNGEN
DER FUSARINSÄURE
IN TOMATENPFLANZEN

VON DER
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH
ZUR ERLANGUNG
DER WÜRDE EINES DOKTORS
DER NATURWISSENSCHAFTEN
GENEHMIGTE

PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON
DIETER KLUEPFEL
DIPL. NATURWISSENSCHAFTER
VON ZÜRICH



Referent: Herr Prof. Dr. E. Gäumann

Korreferent: Herr Dr. H. Kern

1957

Veröffentlicht in „Phytopathologische Zeitschrift“ Band 29, Heft 4 (1957), S. 349—379
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Aus dem Institut für spezielle Botanik
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

Über die Biosynthese und die Umwandlungen der Fusarinsäure in Tomatenpflanzen

Von

DIETER KLUEPFEL

Mit 3 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — A. Material und Methoden: I. Material; II. Methoden; 1. Biologische und biochemische Methoden, 2. Isotopentechnik. — B. Der Fusarinsäure-Stoffwechsel in Tomatenpflanzen: I. Allgemeines über den Toxin-Stoffwechsel im Organismus; II. Extraktion der radioaktiven Fusarinsäure aus dem Pflanzenmaterial; III. Die Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure und ihre Identifizierung; IV. Das Verhalten verschiedener Tomatensorten gegen Fusarinsäure. — C. Die Biosynthese der Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici*: I. Untersuchungen des Myzels von *Fusarium lycopersici* in vitro; II. Die Bildung von Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici* in Tomatenpflanzen. — D. Diskussion. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

Einleitung

Fusarinsäure (5 n-Butylpyridin-2-Carbonsäure) ist eines der drei bis heute bekannten Welketoxine von *Fusarium lycopersici* Sacc., dem Erreger einer Welkekrankheit der Tomaten. Sie wurde erstmals durch YABUTA, KAMBE und HAYASHI (1934) aus Kulturfiltraten von *Fusarium heterosporum* Nees. isoliert, später auch bei anderen *Fusarium*-Arten (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL, 1952) sowie bei *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll. (STOLL, 1954) gefunden; sie ist also nicht spezifisch für *Fusarium lycopersici*. PLATTNER, KELLER und BOLLER (1954) gelang die Synthese von Fusarinsäure, die in ihrer biologischen Aktivität der natürlichen entspricht.

Lycopersamin als weiteres Welketoxin von *F. lycopersici* ist ein Dipeptid von noch nicht genau bekannter Struktur und scheint für diesen Pilz spezifisch zu sein, da es von keinem anderen Mikroorganismus isoliert werden konnte (CLAUSON-KAAS, PLATTNER und GÄUMANN, 1944; PLATTNER und CLAUSON-KAAS, 1944; PLATTNER, CLAUSON-KAAS, BOLLER und NAGER, 1948; GÄUMANN, NAEF-ROTH und MIESCHER, 1950).

Vasinfuscarin, ein drittes aus Kulturfiltraten von *Fusarium lycopersici* (GÄUMANN, STOLL und KERN, 1953) und *Gibberella fujikuroi* (STOLL, 1954) isoliertes Toxin, liegt noch nicht in gereinigter Form vor. Vermutlich handelt es sich um ein enzymatisches Eiweiß. Vasinfuscarin ist möglicherweise identisch mit den von verschiedenen Autoren nachgewiesenen Pektinmethylesterasen (DAVIS, 1953; GOTHOSKAR und SCHEFFER, 1953; GOTHOSKAR, WALKER und STAHMANN, 1953; WINSTEAD und WALKER, 1954).

Alle drei erwähnten Toxine verursachen, wenn sie Tomatensprossen verabreicht werden, ähnliche Schädigungssymptome, wie sie bei infizierten Pflanzen anzutreffen sind. Fusarinsäure erzeugt Nekrosen an Stengeln und Blättern, wobei Toxinlösungen von pH 4 hauptsächlich auf die ersteren, Lösungen von pH 8 auf die letzteren wirken, was mit den verschiedenen Dissoziationsgraden der Säure zu erklären ist (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL, 1952). Lycomarasmin schädigt dagegen nur die Blätter, während Vasinfuscarin die Leitungsbahnen der Tomatenpflanzen angreift und bräunt. Verschiedene Hinweise wurden gefunden, die vermuten lassen, daß *Fusarium lycopersici* diese Toxine ebenfalls während seiner parasitischen Lebensweise in den Tomaten bildet (GÄUMANN, 1951 a). Nur ein Beispiel davon sei hier erwähnt: Preßsäfte infizierter Pflanzen erzeugen, wenn sie gesunden Tomaten zugeführt werden, in diesen die typischen Krankheitssymptome (GOTTLIEB, 1943). Die Schwierigkeiten eines direkten Nachweises dieser Welkestoffe in vivo erklären sich auf Grund der folgenden Überlegungen:

1. Die Toxine kommen in den kranken Pflanzen nur in so kleinen Mengen vor, daß sie mit den üblichen chemischen Methoden nicht erfassbar sind.
2. Die Toxine sind einem fortwährenden Stoffwechsel unterworfen, d. h. sie werden kontinuierlich in andere Verbindungen umgebaut.

Diese Vermutungen konnten vor kurzem für das Beispiel der Fusarinsäure tatsächlich bewiesen werden. Einerseits gelang LAKSHMINARAYANAN und SUBRAMANIAN (1955) und KERN und KLUEPFEL (1956) der Nachweis dieses Toxins in lebenden, mit *F. lycopersici* infizierten Tomatenpflanzen dank der Verwendung äußerst empfindlicher Methoden, und andererseits zeigte SANWAL (1956), daß die Fusarinsäure in lebenden Tomatensprossen nach 48 Stunden in mindestens vier andere, noch nicht identifizierte Verbindungen umgewandelt wird.

Über die Wirkungsmechanismen der Welketoxine ist bis heute noch wenig bekannt. Für die Fusarinsäure nehmen TAMARI und KAJI (1952; 1953 a und b) an, sie bilde mit den für die Lebensvorgänge des Wirtes wichtigen Schwermetallionen wasserunlösliche Chelate. Besser untersucht sind die Verhältnisse beim Lycomarasmin, das sich mit den Eisenionen zu Chelaten vereinigt und so der Pflanze diese für den Stoffwechsel notwendigen Katalysatoren entzieht (GÄUMANN und NAEF-ROTH, 1954; 1955; 1956).

Für die Versuche dieser Arbeit bildeten die Untersuchungen von SANWAL (1956) über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* sowie die Ergebnisse von KERN und KLUEPFEL (1956) über den Nachweis der Fusarinsäure in vivo die Ausgangslage. Folgende Punkte sollten geklärt werden:

1. Die Identifizierung der von SANWAL (1956) gefundenen Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure (B. Abschnitt III).
2. Das Verhalten verschiedener Tomatensorten gegen Fusarinsäure (B. Abschnitt IV).
3. Die Biosynthese der Fusarinsäure in infizierten Tomatenpflanzen (C. Abschnitt II).

A. Material und Methoden

I. MATERIAL

Die für diese Untersuchungen verwendeten Stämme R-5-6 und 257 von *Fusarium lycopersici* Sacc. stellte freundlicherweise Herr DR. T. FONTAINE vom US Department of Agriculture, Beltsville, Md., USA, zur Verfügung. Das Infektionsmaterial stammte aus Reiskulturen (20 g Reis und 40 ml Wasser, sterilisiert im Autoklav) dieser Stämme. Zur Infektion dienten durch Aufschwemmen dieser Kulturen mit sterilem Wasser erhaltene dichte Sporensuspensionen, mit denen weiter nach der Methode von WELLMAN (1939) (siehe auch KERN, 1952 und SANWAL, 1956) verfahren wurde. Hauptsächlich gelangten Tomatenpflanzen der Sorte Tuckswood zur Verwendung; darüber hinaus erschien es zweckmäßig, in einigen Experimenten auch die Sorten Bonny Best und Red Currant mit einzubeziehen. Ihre Anzucht erfolgte in einem Triebbeer bei einer konstanten Temperatur von 22° C, während der Wintermonate mit Zusatzbeleuchtung (Fluoreszenzlicht).

Die radioaktive, in der Carboxylgruppe markierte Fusarinsäure, ebenso wie die nicht aktive Substanz, synthetisierten die Herren Prof. DR. E. HARDEGGER und E. NIKLES vom organisch-chemischen Institut unserer Hochschule. Die Radioaktivität betrug 15 mC/mM. Vor der Verwendung wurde diese immer durch Verdünnung mit inaktiver Substanz herabgesetzt und die Mischung durch Umkristallisieren aus Hexan homogenisiert.

II. METHODEN

1. Biologische und biochemische Methoden

a) Welketest

Der Welketest ist von GÄUMANN, NAEF-ROTH und MIESCHER (1950) und von GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER und AMMAN (1952) entwickelt und beschrieben worden. Tomatenpflanzen im Vierblattstadium werden über dem Boden abgeschnitten und in eine Toxinlösung gestellt, wo man sie unter konstanten Bedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit und Licht) eine bestimmte Dosis (im allgemeinen die dosis minima = 150 mg pro kg Lebendgewicht) mit dem Transpirationsstrom aufnehmen läßt. Danach stellt man die Pflanzen in Leitungswasser. Die Auswertung erfolgt nach 48 Stunden. Das gelöste Toxin war in den hier beschriebenen Versuchen immer radioaktive Fusarinsäure.

b) Extraktion des Pflanzenmaterials

Für spätere Bestimmungen muß die nach der Methode des Welketestes verabreichte Fusarinsäure oder ihrer Umwandlungsprodukte in reiner Form zurückgewonnen bzw. isoliert werden. Das in einem Mörser mit Quarzsand fein verriebene Pflanzenmaterial wird in einem Perkolator langsam mit einem entsprechenden Lösungsmittel eluiert. Das geschieht mit 200 ml Lösungsmittel pro Gramm Material bei Raumtemperatur, und die Durchflußmenge ist so reguliert, daß innerhalb 24 Stunden ungefähr 1000 ml verbraucht werden. Das Eluat engt man bei Zimmertemperatur bis auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens ein, wobei darauf zu achten ist, daß organische Lösungsmittel möglichst vollständig entfernt werden. Die verbleibende schmutzgrüne, wäßrige Lösung wird durch einen Seitz-Filter filtriert, um die ausgefallenen Pigmente abzutrennen. Das gelbliche Filtrat wird nun mit Hilfe von Ätherextraktionen in drei Fraktionen aufgeteilt:

In einem Kutscher-Stuedel-Apparat bei pH 8 (eingestellt mit 1 n NaOH) die basischen Komponenten (Basenteil) und bei pH 4 (eingestellt mit 1 n HCl) die sauren Bestandteile (Säureteil). Beide Extraktionen werden während 72 Stunden durchgeführt. Das verbleibende wäßrige Filtrat enthält jetzt nur noch die ätherunlöslichen Verbindungen und wird im folgenden als Neutralteil bezeichnet. Da in diesen Versuchen die Umwandlungsprodukte der radioaktiven Fusarinsäure interessieren, diese aber nur in geringen Substanzmengen vorkommen, ist zu betonen, daß die Einteilung in Säure- und Basenteil nicht absolut anzunehmen ist. Es kann immer vorkommen, daß Verbindungen in einer ihrem chemischen Charakter nicht entsprechenden Fraktion auftreten. Diese Extraktionsmethode erfuhr bei einzelnen Untersuchungen leichte Abänderungen, die bei der Beschreibung der Versuche erwähnt werden.

2. Isotopen-Technik

c) Radioautographie

Seit der Ausdehnung des Anwendungsbereiches der Radioautographie auf den radioaktiven Kohlenstoff durch COBB und SOLOMON (1948) ist diese Methode einer der häufigst verwendeten Nachweise für radioaktive Stoffwechselprodukte. Für unsere Versuche gelangte sie dort zur Verwendung, wo man sich ein grobes Bild über die Verteilung verschiedener radioaktiver Verbindungen in Papierchromatogrammen machen wollte. Die gut getrockneten Chromatogramme werden in direkten Kontakt mit der Emulsionsschicht des No-Screen-X-Ray-Films der Firma EASTMAN KODAK Co., USA, gebracht und gleichmäßig beschwert in einer lichtundurchlässigen Schachtel bei einer Temperatur von 0 °C exponiert. Die Dauer der Exposition ist von der Radioaktivität der einzelnen Flecke abhängig, da es, um eine Schwärzung des Films zu erhalten, mindestens 10^6 Impulse pro cm^2 bedarf (KAMEN, 1951; SANWAL, 1955). Nach der Exposition wird der Film mit Kodak-Rapid-X-Ray-Entwickler während acht Minuten entwickelt und anschließend im Säurebad während 20 Minuten fixiert. Die radioaktiven Flecke des Chromato-

grammes erscheinen als mehr oder weniger schwarze Flecke auf dem Film, je nach der Stärke der Radioaktivität der abgebildeten Substanzen, und erlauben eine genaue Bestimmung der R_f -Werte.

d) Radiochromatographie

Während die Methode der Radioautographie nur dort anwendbar ist, wo wir mit Verbindungen von einer ziemlich hohen Radioaktivität arbeiten, eignet sich die Radiochromatographie (LISSITZKY und MICHEL, 1952 ROCHE, LISSITZKY und MICHEL, 1954; SANWAL, 1955; 1956) auch bei Verwendung weniger hoch radioaktiver Verbindungen.

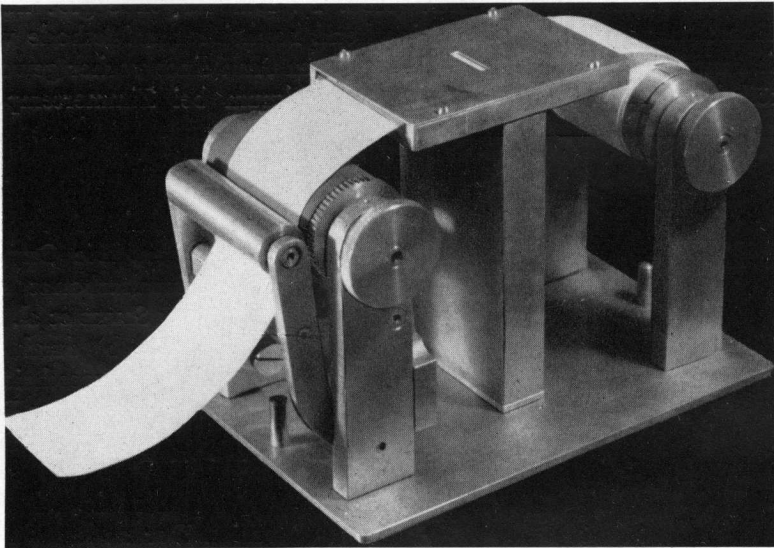


Abb. 1. Apparat zum Ausmessen von Radiochromatogrammen;
Maßstab 1 : 3
(Aufnahme: Lilly Trüb, Zürich)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode in der Modifikation von SANWAL (1956) übernommen: Eine bestimmte Menge der zu untersuchenden Lösung wird mit einer Mikropipette auf den Startpunkt eines Papierchromatogrammes aufgetragen. Die Trennung erfolgt in den gewünschten Lösungsmittelsystemen in einem Pyrexglas-Chromatographiergerät eindimensional-absteigend. Danach wird das Chromatogramm getrocknet und der Länge nach in drei bis vier Zentimeter breite Streifen so geschnitten, daß die radioaktiven Flecke darin ungeteilt enthalten sind. Die Auswertung erfolgt mit einem speziell hierzu konstruierten Apparat (Abb. 1). Der Streifen wird über zwei Rollen horizontal unter einer Aluminiummaske, die eine rechteckige Öffnung von 4×20 mm besitzt, durchgezogen, wobei der Vorschub jedes Mal vier Millimeter beträgt. Auf diese Weise wird der ganze Streifen vom Startpunkt bis zur Front des Lösungsmittels von vier zu vier

Millimeter unter einem GM-Zähler je fünf Minuten lang ausgezählt. Die erhaltenen Werte werden in einem Diagramm aufgetragen (Abszisse: Länge des Chromatogramms in mm; Ordinate: Anzahl der Impulse je Minute; SANWAL, 1956) wobei die Maxima auf dem so erhaltenen Radiochromatogramm den radioaktiven Flecken des Papierchromatogrammes entsprechen, so daß sich die R-Werte leicht errechnen lassen.

e) Verbrennung des radioaktiven Materials

Das radioaktive Material ist in eine Form überzuführen, die quantitative Bestimmungen zuläßt. Geeignet hierzu ist die Umsetzung zu Bariumkarbonat. Alle Verbrennungen erfolgen nach SANWAL (1956) mit dem dort beschriebenen Verbrennungsapparat (Abb. 2). Das Folgende gibt nur eine kurze Zusammenfassung der dort eingehend beschriebenen Methode wieder.

Die meist flüssigen Proben werden in einen Arm eines vorher gewogenen Gabelkölbchens (Abb. 2, b) gebracht, am Vakuum bei Zimmertemperatur

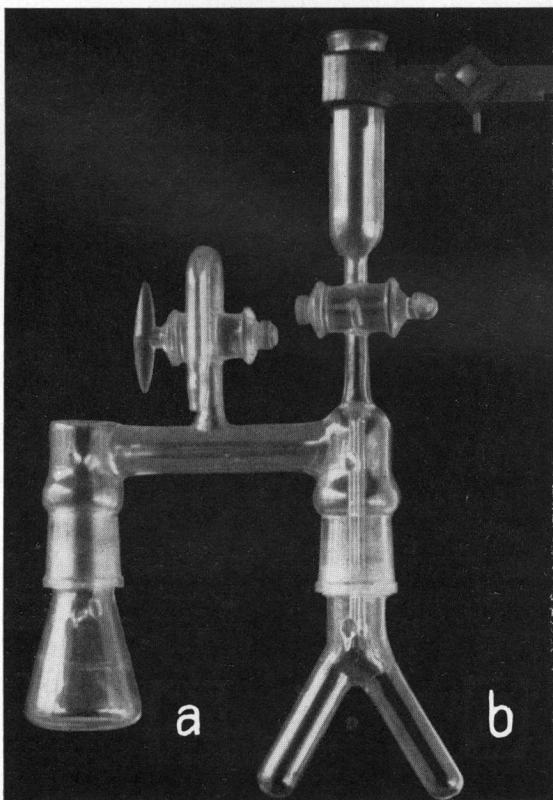


Abb. 2. Apparat für Verbrennungen von radioaktivem Material nach der Methode von VAN SLYKE-FOLCH. a = $^{14}\text{CO}_2$ -Absorptionskolben; b = Gabelkolben; Maßstab 1 : 4 (Aufnahme: Lilly Trüb, Zürich)

bis zur Trockene eingedampft und erneut gewogen. Die zu untersuchende Menge sollte dabei 15 mg nicht übersteigen. Die Oxydation zu Bariumkarbonat erfolgt nach VAN SLYKE et al. (1940, 1951 a und b) durch Zufügen einer vorgeschriebenen Menge des VAN SLYKE-FOLCH-Reagens (2 Teile KJO_3 und 1 Teil $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, fein verrieben) zum radioaktiven Material. Der andere Arm des Kolbens enthält 2 ml des flüssigen Reagens (67 ml H_2SO_4 rauchend, mit 20 % SO_2 , 33 ml H_3PO_4 konz. und 1 g KJO_3). In den anderen Kolben des Apparates (Abb. 2, a) bringt man als Absorptionsmittel 15 ml CO_2 -freie 2 n NaOH (Blindwert von 3—4 mg je Mol NaOH). Die so vorbereitete Apparatur wird evakuiert und das flüssige Reagens zum radioaktiven Material gekippt. Nun erhitzt man dieses Gemisch drei Minuten lang kräftig mit

einem Bunsenbrenner und läßt anschließend während weiterer 30 Minuten das gebildete CO_2 durch die Natronlauge absorbieren.

f) Herstellung der Zählproben

Nach der vollständigen Absorption bringt man diese Lösung in ein Zentrifugenglas, fügt ungefähr die gleiche Menge einer 2 n Ammonitratlösung zu und verschließt unverzüglich mit einem Natronkalk-Absorptionsrohr, um Verfälschungen der Ergebnisse durch das Luftkohlendioxyd zu vermeiden. Nach 15-minütigem Erwärmen in einem kochenden Wasserbade gibt man 5—7 ml einer CO_2 -freien, gesättigten $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot \text{BaCl}_2$ -Lösung zu (siehe ANDERSON, DELABARRE und BOTHNER-BY, 1952), je nach der Menge des zu erwartenden Bariumkarbonats, und erwärmt erneut während etwa 15 Minuten. Der gebildete kristalline Niederschlag von Bariumkarbonat wird abzentrifugiert, einmal mit CO_2 -freiem, destilliertem Wasser gewaschen und gut vom Wasser befreit. Seine Überführung in die zum Auswerten notwendige kleine Aluminiumschale (Grundfläche $3,47 \text{ cm}^2$ Höhe 8 mm) geschieht durch Aufschwemmen in absolutem Alkohol. Es kommt jetzt nur noch darauf an, daß sich der Niederschlag gleichmäßig setzt, damit die „Geometrie“, d. h. Oberfläche und Schichtdicke, regelmäßig ist, da sonst große Meßfehler entstehen können (CALVIN et al., 1949; KAMEN, 1951). Der Alkohol wird mit Hilfe einer Infrarotlampe bei etwa 60°C abgedampft. Anschließend wird die Probe noch während 2—3 Minuten auf 110°C erhitzt und gewogen.

g) Das Messen der Radioaktivität

Das Auszählen der Proben erfolgte mit einem Geiger-Müller-Zähler der Firma LANDIS & GYR AG., Zug, Schweiz vom Typ ELA 2 mit 64fachem Impulsuntersetzer, ausgerüstet mit einem EQB 1 Endfenster GM-Zählrohr. Der Fensterquerschnitt betrug 25 mm und die Fensterdicke 2—3 mg/cm^2 . Proben mit einer Radioaktivität von weniger als 200 Impulsen je Minute wurden während 30, solche mit höheren Aktivitäten während 15 Minuten gezählt. Die Bestimmung des Nulleffektes erfolgte vor und nach den Messungen während 30 Minuten. Sein Wert wurde von den Meßwerten abgezogen. Diese sind immer in Impulsen je Minute angegeben.

h) Korrekturen der gemessenen Werte

Die Standardabweichung σ einer Serie von Messungen wurde nach CALVIN et al. (1949) mit der folgenden Formel berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (V - V_i)^2}{n(n-1)}}$$

n = Anzahl der Messungen, V = Mittelwert aller Messungen, V_i = Einzelmessung.

Proben, die nicht mindestens das Dreifache an Impulsen der Standardabweichung des Nulleffektes aufwiesen, wurden als nicht mehr radioaktiv betrachtet.

Für die Korrektur der Selbstabsorption der durch ^{14}C emittierten weichen β -Strahlung wurde eine Absorptionskurve verwendet, die durch das Auszählen verschiedener Mengen von $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ gleicher spezifischer Radioaktivität erhalten worden war (YANKWICH, NORRIS und HUSTON, 1947). Die Radioaktivität aller Bariumkarbonatproben wurde für „unendliche Dicke“ (infinite thickness) angegeben. Dieser Grenzwert betrug 22 mg/cm^2 ; leichtere Proben wurden mit der erwähnten Absorptionskurve korrigiert.

B. Der Fusarinsäure-Stoffwechsel in Tomatenpflanzen

I. ALLGEMEINES ÜBER DEN TOXIN-STOFFWECHSEL IM ORGANISMUS

Für das Verhalten eines Toxins in einem Organismus lassen sich drei Möglichkeiten ins Auge fassen:

1. Ein Toxin beeinflusst den Organismus direkt, d. h. das unveränderte Molekül stört oder unterdrückt wichtige Lebensvorgänge. In dieser Weise wirkt Tyrocidin, ein Antibioticum von Polypeptid-Charakter, das in die Membran der Bakterienzelle eingelagert wird und dabei deren Eigenschaften so verändert, daß die in der Zelle enthaltenen gelösten Stoffe herausdiffundieren können (ETTLINGER, 1955). Penicillin, als weiteres Beispiel, verhindert das Ineinandergreifen der Synthesen von Nukleinsäuren und Proteinen, während von Streptomycin angenommen wird, es blockiere einen spezifischen Schritt in einer der letzten Stufen des oxydativen Abbaus der Kohlenhydrate (ALBERT, 1952).

2. Eine an sich toxische Verbindung wird inaktiviert, d. h. der Organismus ist befähigt, das Molekül des Giftstoffes so zu verändern, daß seine Wirkung teilweise oder vollständig aufgehoben wird; so kann nach WILLIAMS (1949) der tierische Organismus Pyridin und verschiedene seiner Derivate (an sich giftige Verbindungen) entgiften, wobei das Stickstoffatom einer Methylierung unterworfen wird. Solche Inaktivierungen können Ausdruck von Abwehrreaktionen sein. Diese sind für Pflanzen und Tiere, vor allem aber in der Humanmedizin gut bekannt. Bei Pflanzen beschränkt sich unsere Kenntnis der Abwehrreaktionen jedoch meistens auf die sich morphologisch manifestierenden Folgeerscheinungen (GÄUMANN, 1951 b), während über den Chemismus keine Untersuchungen vorliegen. Methylierungen als Entgiftungs- und Abwehrreaktionen können auch bei Pflanzen erwartet werden. Zumindest besteht kein Grund, eine solche Annahme ohne Prüfung zu verwerfen, um so mehr als sich in Pflanzen verschiedene methylierte Verbindungen, wie Trigonellin und Betaine, leicht nachweisen lassen. SANWAL (1956) kam im Zusammenhang mit seinen Untersuchungen über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* in Tomatenpflanzen, dank der Verwendung von radioaktiven Isotopen, zu einer ähnlichen Vermutung. Er erhielt bei der chemischen Aufarbeitung von Pflanzen, die mit radioaktiver Fusarinsäure ver-

giftet worden waren, drei neue radioaktive Verbindungen, die er jedoch nicht identifizieren konnte.

3. Ein Stoff wird im Organismus chemisch verändert, und es entstehen andere Verbindungen, die nun die eigentliche Schädigung bewirken können. So liegt die tödliche Grenzdosis von Colchicin bei der Raum- bzw. Körpertemperatur von 20 °C bei rund 1300—1500 mg je kg Lebendgewicht, bei einer Raum- bzw. Körpertemperatur von 30 °C jedoch bei rund 3 mg (FÜHNER und BREIPOHL, 1933). Das Colchicin ist somit bei der Bluttemperatur von 30 °C 400—500 mal giftiger als bei Bluttemperaturen von 20 °C, und zwar wahrscheinlich deshalb, weil es an und für sich nahezu ungiftig ist, aber im Körper bei erhöhter Temperatur zu Oxydicolchicin oxydiert wird und erst dadurch seine charakteristische Giftigkeit erlangt (GÄUMANN, NAEF-ROTH und MIESCHER, 1950). Solche Vorgänge lassen sich jedoch nur schwer verfolgen, denn der Endeffekt ist mit dem der ersten Möglichkeit identisch.

Die drei Möglichkeiten können prinzipiell an der gleichen Substanz verwirklicht sein. Ob dies der Fall ist, soll an der Fusarinsäure geprüft werden.

- a) Kann die Fusarinsäure durch die Pflanzen inaktiviert werden? (Abschnitt III, 2.).
- b) Entstehen aus ihr höher toxische Derivate? (Abschnitt III, 1.).
- c) Wirkt Fusarinsäure direkt auf die Pflanzen? (Diskussion).

Neben diesen drei Fragen sollen in den folgenden Abschnitten auch die Extrahierbarkeit der den Pflanzen verabreichten radioaktiven Fusarinsäure, sowie das Verhalten verschiedener Tomatensorten gegenüber diesem Toxin näher untersucht werden.

II. EXTRAKTION DER RADIOAKTIVEN FUSARINSAURE AUS DEM PFLANZENMATERIAL

SANWAL (1956) fand bei seinen Untersuchungen, daß 30 % der Radioaktivität, die Tomatensprossen in Form von ¹⁴C-Fusarinsäure verabreicht worden war, unextrahierbar im Pflanzenmaterial verblieben. Als Erklärung hierfür wurde angenommen, die Fusarinsäure bilde mit den in den Pflanzen vorhandenen Schwermetallionen wasserunlösliche Chelate, wie es TAMARI und KAJI (1953) *in vitro* gezeigt hatten (siehe auch DEUEL, 1954). Da SANWAL'S Versuche jedoch nur mit einem Extraktionsmittel, nämlich 85-proz. Alkohol, ausgeführt worden waren, stellte sich die Frage, ob nicht auf andere Weise eine bessere Ausbeute erreicht werden könnte. Die im folgenden beschriebene Versuchsanordnung soll zur Prüfung verschiedener Extraktionsmittel dienen.

Tomatensprossen der Sorte Tuckswood im Vierblattstadium (je Versuchsreihe fünf Pflanzen mit einem Frischgewicht von 5,5—6,0 g) wird nach der Methode des Welketestes (siehe Methoden) die *dosis minima* (150 mg je kg Lebendgewicht) radioaktiver Fusarinsäure, mit bekannter spezifischer Radioaktivität, verabreicht. Nach 48 Stunden werden die Pflanzen in einem Mörser fein verrieben und im Perkulator mit den zu untersuchenden Lö-

sungsmitteln eluiert. Die Menge des Extraktionsmittels betrug immer 200 ml je g Pflanzenmaterial; und die Durchflußmenge im Perkolator war so eingestellt, daß innerhalb 24 Stunden 800 ml passierten. Bei jeder Versuchsreihe wurde die Radioaktivität des Eluats und diejenige des Rückstandes durch Verbrennen zu $Ba^{14}CO_3$ bestimmt. Die wiedergefundene Radioaktivität ist in Prozenten der verabreichten Dosis angegeben. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 verzeichnet.

Die im Ergebnis erfaßte Radioaktivität macht 78—84 % der ursprünglich verabreichten Dosis aus. Weitere 6—10 % werden nach SANWAL (1956) als $^{14}CO_2$ in die Luft abgegeben, und der Rest ist als Verlust anzunehmen. Die Bestimmungen können also als annähernd quantitativ angesehen werden. Im weiteren geht aus Tabelle 1 hervor, daß bei Verwendung verschiedener Extraktionsmittel, ganz erhebliche Unterschiede in der Ausbeute an Radioaktivität im Extrakt auftreten. Die günstigsten Ergebnisse wurden mit 80-proz. Alkohol erreicht; sie betragen immer zwischen 82 und 84 % der ursprünglich verabreichten Radioaktivität. Bisweilen kam es vor, das ein Extrakt zunächst geringere Anteile enthielt, wie es bei SANWAL (1956) regelmäßig der Fall war, verblieben doch in seinen Versuchen etwa 28 % unextrahierbar im Pflanzenmaterial. In solchen Fällen gelang es, durch erneutes Extrahieren die fehlenden Mengen nachträglich zu erhalten.

Tabelle 1

Extraktion der in Form von ^{14}C -Fusarinsäure den Tomatensprossen verabreichten Radioaktivität mit Hilfe verschiedener Extraktionsmittel

Extraktionsmittel	Verabreichte Radioaktivität in Impulsen je Minute	Extrahierbare Radioaktivität in		Unextrahierbare Radioaktivität im Rückstand		Total der wiedergefundene Radioaktivität in %
		Imp./Min.	%	Imp./Min.	%	
Äthanol abs.	25 406	14 807	58,2	5 579	21,9	80,1
Äthanol 80proz.	23 550	19 415	82,5	243	1,03	83,53
Äthanol 50proz.	23 823	9 342	39,1	9 496	39,8	78,9
Äthanol 10proz.	26 403	8 191	31,0	13 490	50,1	81,1
Wasser bidest.	25 121	5 380	21,4	14 900	59,3	80,7
Methanol abs.	24 278	7 316	28,7	12 580	49,2	77,9
Methanol 80proz.	21 073	12 085	57,2	4 823	22,8	80,0
Äther	20 910	9 700	46,4	6 750	32,3	78,7
Chloroform	23 115	14 106	60,1	5 271	22,9	82,9

Aus den obigen Ergebnissen geht hervor, daß die in Form von ^{14}C -Fusarinsäure verabreichte Radioaktivität annähernd quantitativ wieder extrahiert werden kann. Nicht geklärt ist die Frage nach einer eventuellen Chelatbildung der Fusarinsäure, da das Verhalten der Substanzen unter den angewendeten Bedingungen nicht bekannt ist.

III. DIE STOFFWECHSELPRODUKTE DER FUSARINSAURE UND IHRE IDENTIFIZIERUNG

1. Der Nachweis
der Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure

Tomatensprossen der Sorte Tuckswood im Vierblattstadium wird nach der Methode des Welketests die dosis minima (150 mg je kg Lebendgewicht) radioaktiver Fusarinsäure verabreicht. Nach 48 Stunden erfolgt die Eluation und die Aufteilung des Eluates in Säure-, Basen- und Neutralteil, wie im Abschnitt „Methoden“ (siehe S. 352) beschrieben. Die drei Fraktionen werden nun am Vakuum eingedampft und anschließend die Rückstände des Säure- und Basenteiles in 1 ml abs. Aethanol, derjenige des Neutralteiles in 1 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Von jeder dieser Lösungen werden 0,1 ml getrennt auf ein Papierchromatogramm aufgetragen, und zwar immer in kleinen Portionen von 0,005 ml; dazwischen wird das Chromatogramm jedesmal gut getrocknet. Als Chromatographierpapier gelangt die Sorte Whatman 3 MM zur Verwendung. Chromatographiert wird eindimensional-absteigend in einem Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (5 : 1 : 4), bei einer konstanten Temperatur von 20 ° C. Die Laufzeit ist auf 16 Stunden festgesetzt und der Laufweg beträgt 32—34 cm. Danach wird das Chromatogramm zwölf Stunden lang an der Luft getrocknet und anschließend während dreier Minuten in einem Thermostaten auf 60 ° C erwärmt. Die Auswertung erfolgte als Radiochromatogramm (siehe S. 353) und ergab die folgenden Werte, die bis auf geringfügige Abweichungen denjenigen von SANWAL (1956) entsprechen.

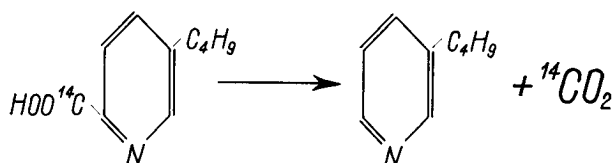
Säureteil: eine radioaktive Verbindung mit einem R_f -Wert von 0,86.

Basenteil: eine radioaktive Verbindung mit einem R_f -Wert von 0,65—0,67.

Neutralteil: zwei radioaktive Verbindungen mit R_f -Werten von 0,20—0,22 und 0,51—0,54.

Diese vier Verbindungen machen, wie aus Abschnitt II (siehe S. 358) zu ersehen ist, 78—84 % der als Fusarinsäure verabreichten Radioaktivität aus.

Weitere Stoffwechselprodukte sind aus den 6—10 % der decarboxylierten Fusarinsäure zu erwarten, doch ist es vorderhand noch nicht möglich, diese Stoffe zu erfassen, da unsere radioaktive Fusarinsäure in der Carboxylgruppe markiert war. Als direktes Produkt dieser Decarboxylierung ist 3-n-Butyl-Pyridin anzunehmen:



An dieser Stelle sei auf die Arbeit von BACHMANN (1956) hingewiesen, in der die schädigende Einwirkung von Fusarinsäure und verschiedener ihrer

Homologen auf die Wasserpermeabilität pflanzlicher Zellen untersucht wurde. Unter den geprüften Verbindungen befand sich auch 3-n-Butyl-Pyridin. Dabei zeigte sich, daß diese Substanz eine gegenüber Fusarinsäure stark erhöhte Toxizität aufwies. Diese Tatsache und die Vermutung eines Abbaues der Fusarinsäure zu 3-n-Butyl-Pyridin durch Decarboxylierung ergeben zusammen ein Beispiel einer Toxinaktivierung, wie in der Einleitung zu diesem Kapitel beschrieben wurde (3. Möglichkeit, S. 357), mindestens in der Wirkung auf einzelne Zellfunktionen. Ein Beweis dieser Hypothese konnte jedoch noch nicht erbracht werden, da hierzu die Isolation des 3-n-Butyl-Pyridins aus dem vergifteten Pflanzenmaterial notwendig wäre, was unter den angewandten Versuchsordnungen nicht möglich ist. Dagegen dürften Untersuchungen mit radioaktiver Fusarinsäure, die an einer anderen Stelle markiert wäre, diese Fragen näher klären.

2. Identifizierungsversuche

Zur Identifizierung der einzelnen radioaktiven Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure lagen, außer der Tatsache, daß es sich um je eine Verbindung mit saurem resp. basischem und zwei mit neutralem Charakter handeln mußte (wobei für die letzten beiden Stoffe auch extreme Ätherunlöslichkeit in Betracht gezogen werden muß), vorderhand keine weiteren Anhaltspunkte vor. Eine Identifizierung nach den klassischen chemischen und physikalischen Methoden kam nicht in Frage, da diese Verbindungen nicht in erfassbaren Mengen auftraten. Es mußte also versucht werden, auf Grund der genau definierten radioaktiven Flecke im Papierchromatogramm und mit Hilfe von Vergleichssubstanzen ans Ziel zu gelangen. Die Auswahl dieser Verbindungen trafen wir nach folgenden Gesichtspunkten:

Am Fusarinsäuremolekül können Veränderungen stattfinden:

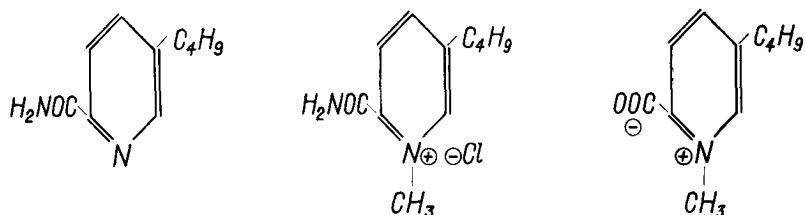
- a) in der Carboxylgruppe, z. B. Reduktionen, Abspaltung, Veresterung oder Amidbildung,
- b) am Stickstoffatom, z. B. Methylierung oder Betainbildung,
- c) an der Butylkette, z. B. Oxydationen, Abspaltung oder Dehydrierungen,
- d) im Pyridinring, z. B. Oxydationen, Reduktionen oder Aufspaltungen.

Im weiteren mußten auch Kombinationen dieser Möglichkeiten untereinander ins Auge gefaßt werden.

Die Identifizierung der radioaktiven Verbindung im Säureteil bereitete keine Schwierigkeiten, da schon ihr R_f -Wert einen deutlichen Hinweis auf Fusarinsäure ergab. Die Bestätigung gelang schon SANWAL (1956) mit Hilfe der Isotopenverdünnungs-Technik (CALVIN et al., 1949).

Der Grundgedanke bei der Auswahl der Vergleichssubstanzen zur Identifizierung der Verbindung im Basenteil beruhte auf der Vermutung, daß Methylierungsreaktionen am Stickstoffatom des Fusarinsäuremoleküls auftreten könnten (siehe S. 356). So erhielten wir dank der Zusammenarbeit mit

den Herren Prof. Dr. E. HARDEGGER und E. NIKLES vom organisch-chemischen Institut unserer Hochschule die folgenden Derivate der Fusarinsäure synthetisiert (HARDEGGER und NIKLES, 1956):



Zur Gewinnung weiterer Anhaltspunkte wurden diese Substanzen zusammen mit verschiedenen Picolinsäure-Derivaten chromatographiert und ihre R_f -Werte bestimmt.

a) Papierchromatographische Untersuchungen verschiedener Fusarinsäure- und α -Picolinsäure-Derivate

Die folgende Versuchsanordnung gelangte zur Anwendung:

Auf die Startlinie eines Whatman 3 MM-Chromatographierpapiers werden von jeder Substanz 0,003 ml einer 1-proz. wäßrigen oder alkoholischen Lösung, je nach den Löslichkeitsverhältnissen, mit einer Mikropipette aufgetragen. Das Chromatographieren erfolgt in verschiedenen Lösungsmittelsystemen eindimensional — absteigend bei einer Temperatur von 20 ° C. Die Laufzeit beträgt 16 Stunden. Danach läßt man das Chromatogramm bei Zimmertemperatur 12 Stunden lang trocknen und erwärmt es anschließend während fünf Minuten in einem Thermostaten auf 60 ° C. Der Nachweis geschieht mit dem Draggendorf-Reagens (MUNIER und MACHEBOEUF, 1949), das folgende leicht abgeänderte Zusammensetzung aufwies:

Draggendorf-Reagens:

Lösung B:	Wismutsubnitrat	850 mg
	Eisessig	10 ml
	Wasser	40 ml
Lösung A:	Kaliumjodid	8 g
	Wasser	20 ml

Die Lösungen A und B ergeben zusammen die Stammlösung, die im Dunkeln aufbewahrt werden muß. Vor der Verwendung wird 1 ml dieser Stammlösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser verdünnt. Dieses orangefarbene Reagens ergibt, wenn es gleichmäßig auf das Papierchromatogramm gesprüht wird, mit den verschiedenen den Pyridinring enthaltenden Verbindungen meist deutlich orangerote Färbungen.

In der folgenden Tabelle sind die untersuchten Substanzen und die verwendeten Lösungsmittelsysteme zusammengestellt.

Tabelle 2

R_f -Werte einiger α -Picolinsäure- und Fusarinsäure-Derivate in verschiedenen Lösungsmittelsystemen

Verbindungen	n-Butanol- Eisessig- Wasser 50:10:40	n-Butanol- Wasser ges. —	n-Butanol- HCl 90:100	n-Butanol- NH ₃ 100:3	n-Butanol- Propion- säure-HOH 50:10:40	sek.-Butanol- Ameisen- säure-Wasser 75:15:10
α -Picolinsäure	0,430	0,323	0,290	0,144	0,414	0,413
5-Methylpicolinsäure	0,520	0,414	0,412	—	0,520	0,598
5-Äthylpicolinsäure	0,652	0,607	0,644	0,291	0,675	0,693
5-Butylpicolinsäure = Fusarinsäure	0,830	0,804	0,850	0,502	0,865	0,860
5-Hexylpicolinsäure	0,845	—	—	—	—	—
Picolinsäureamid	0,802	—	—	—	—	—
Fusarinsäureamid	0,900	0,913	0,928	0,877	0,924	0,910
Fusarinsäure-Methyl-Betain	0,730	0,650	0,655	0,551	0,760	0,782
Fusarinsäureamid- Chlor-Methylat	0,660	0,432	0,540	0,330	0,723	0,775

Mit diesen chromatographischen Untersuchungen wurde ein doppelter Zweck verfolgt: Gewinnung von Anhaltspunkten zur Identifizierung der Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure und eine Verbesserung der Methode der Fusarinsäure-Papierchromatographie von ZÄHNER (1954), die den Nachteil hoher R_f -Werte besitzt und dementsprechend oft nur sehr ungenau anwendbar ist. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, läßt sich dieser Nachteil durch Verwendung eines Gemisches von n-Butanol-Ammoniak (100 : 3) als Lösungsmittel beheben, doch erhält man dabei keine scharf begrenzten Flecke, was ebenfalls sehr störend wirkt. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung sind im Gange; darüber wird zu einem späteren Zeitpunkt berichtet werden.

Ein Vergleich zwischen den R_f -Werten der aus den Tomatenpflanzen erhaltenen radioaktiven Stoffwechselverbindungen der Fusarinsäure (siehe S. 359) und den in Tabelle 2 gefundenen Werten der Vergleichssubstanzen ergibt die annähernde Übereinstimmung mit drei dieser Verbindungen, nämlich mit 5-Methylpicolinsäure (R_f 0,52), Fusarinsäure (R_f 0,83) und Fusarinsäureamid-Chlor-Methylat (R_f 0,66). Methylpicolinsäure und eine der beiden Verbindungen im Neutralteil des Pflanzenextraktes stimmen ihren R_f -Werten nach wohl annähernd überein, doch ist eine Identität wegen der guten Ätherlöslichkeit der synthetischen Substanz ausgeschlossen. Die Fusarinsäure entspricht dem im Säureteil gefundenen Stoffe, wie dies schon SANWAL (1956) feststellte. Hingegen bedeutet die Übereinstimmung der R_f -Werte des Fusarinsäureamid-Chlor-Methylats und des basischen Stoffwechselproduktes einen weiteren Hinweis auf die Berechtigung der Annahme, daß Methylierungsreaktionen am Stickstoffatom des Toxin-Moleküls auftreten könnten.

Eine Übereinstimmung der R_f -Werte sagt im Grunde genommen nur wenig über die Identität zweier Stoffe aus. Der Beweis führt im allgemeinen

über die Isolierung und Reindarstellung dieser Verbindungen und den Vergleich ihrer chemischen und physikalischen Konstanten. In dem hier vorliegenden Falle war dieser Weg jedoch nicht gangbar, da die zu identifizierende Verbindung im Basenteil des Pflanzenextraktes nur in äußerst geringen Mengen vorhanden war. Ihr Nachweis konnte nur mit Hilfe der Radiochromatographie erfolgen.

b) Die Identifizierung des Fusarinsäureamid-Methylat-Ions als Stoffwechselprodukt der Fusarinsäure in Tomatenpflanzen

Die Isotopenverdünnungstechnik (CALVIN et al., 1949) ermöglicht es, auch verschwindend kleine Menge einer radioaktiven Substanz zu erfassen. Der Grundgedanke dieser Technik beruht auf der Tatsache, daß sich radioaktive Verbindungen mit der sonst gleichen, inaktiven Komponente mischen lassen, wobei die spezifische Radioaktivität der ersteren linear zur zugefügten Menge der letzteren herabgesetzt wird. Dies läßt sich so anwenden, daß, wenn die radioaktive Substanz in chemisch nicht isolierbaren Mengen vorliegt, man einen dazu genügenden Anteil der inaktiven Verbindung beimischt und diese als sog. Trägersubstanz verwendet. Man isoliert jetzt dieses Gemisch von radioaktiver und inaktiver Substanz und kann nach der Bestimmung seiner spezifischen Radioaktivität genaue qualitative und quantitative Schlüsse auf die ursprüngliche radioaktive Verbindung ziehen.

In dem hier vorliegenden Fall war es nicht möglich, den oben beschriebenen Weg direkt zu beschreiten, da das Fusarinsäureamid-Chlor-Methylat, das als Trägersubstanz verwendet wurde, eine äußerst hygroskopische Verbindung ist und dementsprechend nur sehr schwer kristallisiert werden konnte. Es wurde daher das sog. Bestätigungsverfahren nach SANWAL (1955) angewendet, das sich vorwiegend auf die Papierchromatographie stützt.

Tomatensprossen der Sorte Tuckswood im Vierblattstadium wird nach der Methode des Welketestes die dosis minima radioaktiver Fusarinsäure von hoher spezifischer Radioaktivität ($4 \cdot 10^5$ Imp./Min.) verabreicht. Nach 48 Stunden erfolgt die Eluation mit 80-proz. Aethanol. In dieser alkoholischen Phase werden 30 mg Fusarinsäureamid-Chlor-Methylat gelöst und die Lösung mit 5 ml konz. Ammoniak versetzt, um das Chlor freizusetzen und den Fusarinsäureamid-Methylat-Ionen zu ermöglichen, sich mit den pflanzeigenen organischen Säureresten abzusättigen. Die weitere Behandlung des Eluates erfolgt gemäß den unter „Extraktionsmethode“ (siehe S. 359) beschriebenen Angaben. Der Basenextrakt enthält zusammen mit dem radioaktiven Stoffwechselprodukt auch das Fusarinsäureamid-Methylat. Er wird mit einer gleichen Menge auf pH 4 angesäuerten Wassers ausgeschüttelt, wobei die zu isolierenden Substanzen in die wässrige Phase übergehen, während die Fette und Öle des Extraktes im Äther verbleiben. Diese wässrige Lösung bringt man jetzt mit 1 n NaOH auf pH 8 und extrahiert sie dreimal mit einer gleichen Menge Chloroform. Dieser Extrakt wird langsam am Vakuum bei 40°C bis zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 1 ml Aethanol gelöst. Zur Bestätigung der Identität des Fusarinsäureamid-Methyl-

lats mit der im Pflanzenextrakt nachgewiesenen Verbindung werden von dieser Lösung Papierchromatogramme in folgenden Lösungsmittelsystemen hergestellt: Butanol-Eisessig-Wasser (5 : 1 : 4), Butanol-Ammoniak (100 : 3) wassergesättigt und Butanol-HCl (9:1) wassergesättigt, um die R_f -Werte zu vergleichen. Diese Bestimmung erfolgt für die radioaktive Verbindung mit Hilfe der Radiochromatographie und Radioautographie, während für die Vergleichssubstanz das Draggendorf-Reagens Verwendung findet. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte eine vollständige Übereinstimmung der beiden Flecke. Da aber bei eindimensionaler Chromatographie Überlagerungen verschiedener Substanzen vorkommen können, muß das Resultat auch in einem zweidimensionalen Papierchromatogramm reproduzierbar sein. Dies wurde in einem Butanol-Eisessig-Wasser- und einem Butanol-Ammoniak-Gemisch geprüft, wobei auch diese Untersuchungen erfolgreich verliefen. Für eine weitere Bestätigung schneidet man die unbehandelten Flecke aus einem Papierchromatogramm aus, eluiert sie mit bidestilliertem Wasser und engt das Eluat bis auf etwa 0,1 ml ein. Diese Lösung wird erneut in den drei oben erwähnten Lösungsmittelsystemen chromatographiert, wobei man die Vergleichssubstanz ebenfalls mitlaufen läßt. Auch hier konnte nur ein einheitlicher Substanzfleck erhalten werden. Auf Grund dieser Ergebnisse darf die Identität des Fusarinsäureamid-Methylat-Ions mit der im Basenteil des Pflanzenextraktes gefundenen radioaktiven Verbindung als bewiesen gelten. Diese Umwandlung der Fusarinsäure in Fusarinsäureamid-Methylat in Tomatenpflanzen ist unseres Wissens bis heute das einzige Beispiel einer direkt nachgewiesenen Stickstoffmethylierung in einem pflanzlichen Organismus. Über die genauen chemischen Vorgänge haben wir vorläufig noch keine näheren Aufschlüsse, doch besteht die Möglichkeit, aus den besser bekannten analogen Reaktionen in den tierischen Organismen Rückschlüsse auf die Vorgänge in der Pflanze zu ziehen.

HIS (1887) fand als erster, daß Pyridin im tierischen Organismus gleichzeitig mit einer biologischen Oxydation in α -Stellung auch einer Methylierung des Stickstoffatoms unterworfen ist; es wird somit in N-Methylpyridin-Hydroxyd übergeführt und kann ausgeschieden werden. LEIFER et al. (1951) fanden bei ihren Untersuchungen über den Stoffwechsel von Nikotinsäure und Nikotinsäureamid in verschiedenen Versuchstieren eine ganze Reihe von stickstoffmethylierten Stoffwechselprodukten. Über den Mechanismus dieser Methylierungen weiß man wenig, doch besteht die Vermutung, daß er über eine sog. „T r a n s m e t h y l i e r u n g“ von Methionin verläuft, konnte doch festgestellt werden, daß dem tierischen Organismus die Fähigkeit fehlt, Methyl-Gruppen zu bilden (du VIGNEAUD et al., 1941).

Da verschiedene Autoren (z. B. LEIFER et al., 1951; siehe auch WILLIAMS, 1949) zeigen konnten, daß die Pyridinderivate durch Methylierung des Stickstoffs ihre Giftigkeit gegenüber den tierischen Zellen verloren, stellte sich jetzt auch für uns die Frage nach der Toxizität des Fusarinsäureamid-Methylates auf die Tomatenpflanzen und ganz allgemein auf die pflanzliche Zelle. Zu diesem Zweck wurde diese Substanz, soweit es mit der zur Verfügung stehenden Menge möglich war, nach verschiedenen biologischen Verfahren auf ihre Giftigkeit hin untersucht, so vor allem auf ihre Fähigkeit, an Tomatenpflanzen

Welkesymptome zu erzeugen. Im weiteren erfolgten Untersuchungen über die Wirkung auf den Gaswechsel von Hefezellen in der Warburg-Apparatur¹⁾ und den Einfluß auf die Sporenkeimung von *Ustilago zaeae* (KOBEL, 1951; KERN, 1952). In keinem dieser Versuche rief das Fusarinsäureamid-Methylat Schädigungen meßbaren Ausmaßes hervor. Durch die Methylierung des Stickstoffatoms wird die für Fusarinsäure charakteristische Herabsetzung der Wasserpermeabilität der Rhoeo-Protoplasten im höheren Konzentrationsbereich aufgehoben, während die für den Pyridinring spezifische Steigerung bei niederen Konzentrationen erhalten bleibt (Methode nach BACHMANN, 1956)¹⁾. Es darf aus diesen Ergebnisse geschlossen werden, daß die Methylierung des Stickstoffatoms eine *E n t g i f t u n g s r e a k t i o n* darstellt.

Die Identifizierung der beiden in der ätherunlöslichen Fraktion des Pflanzenextraktes nachgewiesenen Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure ist bis jetzt noch nicht gelungen, doch sind weitere Untersuchungen hierüber im Gange.

Nachdem in den bis jetzt geschilderten Versuchen nur die gegenüber *Fusarium lycopersici* mittelanfällige Tomatensorte Tuckswood untersucht worden war, stellte sich die Frage nach dem Verhalten infektiöserer und resistenterer Sorten.

IV. DAS VERHALTEN VERSCHIEDENER TOMATENSORTEN GEGEN FUSARINSAURE

KERN (1952) charakterisierte die Tomatensorte Bonny Best als sehr anfällig gegen *Fusarium lycopersici*, Red Currant als sehr resistent. Diese beiden Sorten sollten mit folgender Fragestellung in die Versuche einbezogen werden:

1. Treten bei diesen zwei Sorten andere Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure auf, als die in Tuckswood nachgewiesenen?
2. Bestehen, bei gleicher qualitativer Zusammensetzung, quantitative Unterschiede zwischen den analogen Stoffwechselprodukten?

Es wäre beispielsweise denkbar, daß in der resistenten Sorte Red Currant ein größerer Teil der Fusarinsäure in das ungiftige Fusarinsäureamid-Methylat umgewandelt würde, während in den anfälligen Bonny-Best-Pflanzen diese Umwandlung in geringerer Menge verwirklicht wäre. Um dies zu untersuchen, wurde die folgende Versuchsanordnung angewandt:

Tomatensprossen der drei verschiedenen Sorten wird die dosis minima (150 mg je kg Lebendgewicht) an radioaktiver Fusarinsäure verabreicht. Die spezifische Radioaktivität betrug 224'500 Impulse je Minute je Milligramm, bezogen auf Bariumkarbonat. Nach 48 Stunden werden die Pflanzen in einem Mörser fein zerrieben und das auf diese Weise erhaltene Pflanzenmaterial mit 80-proz. Aethanol eluiert. Hierauf erfolgt die Aufteilung des Eluates in Säure-, Basen- und Neutralteil. Alle drei Fraktionen werden bei Raumtemperatur

¹⁾ Der Verfasser möchte an dieser Stelle Frau Dr. ST. NAEF-ROTH und Frl. Dr. E. BACHMANN für die Durchführung dieser beiden Versuche seinen Dank aussprechen.

am Vakuum bis zur Trockene eingedampft und die Rückstände des Säure- und Basenteiles in 1 ml warmem absolutem Alkohol, derjenige des Neutralteiles in 1 ml bidestilliertem Wasser wieder gelöst. Von diesen Lösungen werden je 0,1 ml erneut eingedampft und die Rückstände einzeln nach VAN SLYKE et al. (1940; 1951 a und b) zu Bariumkarbonat verbrannt. Diese Niederschläge verarbeitet man zu Zählproben und bestimmt die Radioaktivität. Das Zehnfache dieser Werte ergibt die Gesamtaktivität der einzelnen Fraktionen. Eine grobe Kontrolle kann mit Hilfe der Radiochromatographie erfolgen: 0,05 ml der Lösungen werden getrennt auf die Startlinie eines Papierchromatogramms (Whatman 3 MM) aufgetragen und in einem n-Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (5 : 1 : 4) absteigend chromatographiert. Die Auswertung erfolgt nach der Methode der Radiochromatographie (siehe S. 353) und ergab gleichzeitig die genauen R_f -Werte der einzelnen radioaktiven Stoffwechselverbindungen.

Um ein vollständiges Bild über die bei den ausgeführten Extraktionen erreichten Ausbeuten zu erhalten, muß auch die Radioaktivität des extrahierten Pflanzenmaterials und der abfiltrierten Pigmente bestimmt werden. Zur Bestimmung der im Pflanzenmaterial verbliebenen Radioaktivität wird dieses während dreier Tage am Vakuum getrocknet, gewogen und anschließend ein bestimmter Teil zu Bariumkarbonat verbrannt. Die totale, unextrahierbare verbliebene Radioaktivität ergibt sich dann durch Umrechnen des ausgezählten Wertes auf das Gesamtgewicht des Pflanzenmaterials. Die Pigmente, die vor der Extraktion mit einem Seitz-Filter entfernt worden waren, werden aus diesem gründlich mit warmem absolutem Alkohol ausgewaschen und, nachdem dieser Extrakt eingedampft worden ist, ebenfalls zu Bariumkarbonat verbrannt.

Auf Grund der radiochromatographischen Untersuchungen der einzelnen Fraktionen konnte festgestellt werden, daß in Bezug auf die Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure in den untersuchten Tomatensorten keine qualitativen Unterschiede auftraten, d. h. es wurden überall die gleichen vier radioaktiven Verbindungen, nämlich Fusarinsäure und drei Abbauprodukte, nach-

Tabelle 3 Die Verteilung der Radioaktivität auf die drei untersuchten Tomatensorten: (bezogen auf fünf Tomatensprosse je Versuchsreihe; spez. Radioaktivität)

Sorte	Total der verabreichten Radioaktivität in Imp./Min.	Säureteil		Basenteil	
		Imp./Min.	%	Imp./Min.	%
Bonny Best	244 700	135 680	54,0	21 609	8,8
Bonny Best	221 676	116 400	52,6	18 590	8,4
Tuckswood	127 965	53 580	41,9	10 000	7,8
Red Currant	168 300	56 210	33,4	36 210	21,5
Red Currant	122 148	34 990	28,6	29 480	24,2
Red Currant	149 292	44 318	29,6	30 320	20,3

gewiesen. Hingegen traten z. T. ziemlich große quantitative Unterschiede zwischen den sich entsprechenden Fraktionen der drei Tomatensorten auf, wie dies aus der folgenden Tabelle 3 hervorgeht. Von der Sorte Tuckswood ist nur eine Versuchsreihe angegeben, doch konnte in den vorherigen Versuchen (siehe auch SANWAL, 1956) eine analoge Verteilung gefunden werden.

Diese Unterschiede ergeben einen Aufschluß über das Verhalten der einzelnen Tomatensorten gegenüber der in den Pflanzenkörper eindringenden Fusarinsäure. So nimmt mit zunehmender Resistenz gegen *Fusarium lycopersici* der aus dem Pflanzenmaterial wieder extrahierbare Anteil der ursprünglich verabreichten Fusarinsäure ab, d. h. je resistenter die Pflanzen sind, desto größere Mengen dieses Toxins werden in andere Stoffe umgewandelt. So werden in Red Currant rund 21 % in Fusarinsäureamid-Methylat übergeführt und somit, wie im vorhergehenden Abschnitt (S. 365) gezeigt werden konnte, entgiftet. Dieser Anteil ist demnach rund dreimal höher als in den anfälligeren Sorten Bonny Best und Tuckswood. Andererseits bestehen auch im Neutralteil erhebliche quantitative Unterschiede, sind doch hier die Anteile bei Tuckswood und Red Currant um 7—8 % höher als bei Bonny Best. Eine Erklärung hierfür kann noch nicht gegeben werden, da die beiden im Neutralteil nachgewiesenen Verbindungen nicht identifiziert werden konnten. Es besteht jedoch auf Grund der erhaltenen Ergebnisse eine gewisse Wahrscheinlichkeit zur Annahme, daß auch diese Substanzen weniger giftig sind als Fusarinsäure.

Die Tatsache dieses unterschiedlichen Verhaltens der einzelnen Tomatensorten führt zu der Frage nach den Ursachen der Resistenz. Es sind hier prinzipiell zwei Arten von Resistenz auseinanderzuhalten (GÄUMANN, 1951 b):

1. Die Ausbreitungsresistenz, die sich gegen die Generalisation des Krankheitserregers im Wirtsinneren richtet; und
2. Die Toxinresistenz, die den toxischen Stoffwechselprodukten des Parasiten entgegnen wirkt.

verschiedenen chemischen Fraktionen der
Bonny Best, Tuckswood und Red Currant
der Fusarinsäure: 224 500 Imp./min je mg, bestimmt als Bariumkarbonat)

Tabelle 3

Neutralteil		Rückstand		Pigmente		Total der wiedergefundenen Radioaktivität in ‰	Verluste in ‰
Imp./Min.	%	Imp./Min.	%	Imp./Min.	%		
42 536	17,6	13 089	5,3	1 753	0,7	86,4	13,6
38 390	17,3	15 380	6,9	1 408	0,6	85,8	14,2
33 280	26,0	9 828	7,7	813	0,6	84,0	16,0
40 230	23,9	9 118	5,4	515	0,3	84,5	15,5
30 678	25,1	7 233	5,9	750	0,6	84,4	15,6
34 170	22,8	8 550	5,7	897	0,6	79,0	21,0

Daß diese beiden Möglichkeiten in Frage kommen, geht daraus hervor, daß alle Tomatensorten zwar durch *Fusarium lycopersici* infiziert werden können, doch der Pilz sich nur in einem Teil davon wirklich auszubreiten vermag (KERN, 1952). Die resistenten Sorten sind also nicht i n f e k t i o n s - r e s i s t e n t. Die bis heute in der Literatur beschriebenen Untersuchungen über die Resistenz von Tomaten beziehen sich sozusagen ausnahmslos auf die Ausbreitungsresistenz. STODDARD und DIMOND (1948) fanden einen engen Zusammenhang zwischen der Ausbreitungsfähigkeit des Pilzes in der Pflanze und deren Ernährung. Unter Stickstoffmangel oder Stickstoffüberschuß gezüchtete Tomaten sind bedeutend widerstandsfähiger als normal ernährte. Andererseits vermuteten IRVING et al. (1945), daß die Resistenz auf dem Vorhandensein fungistatischer oder fungizider Pflanzenstoffe, wie Alkaloide, Phenole oder Tannine zurückzuführen sei. Diese Annahme konnte jedoch nicht bewiesen werden, die Wirkungsmöglichkeit dieser Stoffe ist ja (abgesehen von der i n s g e s a m t vorhandenen Menge) von verschiedenen Faktoren abhängig, so von der Verteilung im Wirtsorganismus, von den Löslichkeitsverhältnissen oder von der Fixierung in den Zellen (WALKER und STAHMANN, 1955; KERN, 1952). Neuere Untersuchungen von GOTHOSKAR, SCHEFFER, STAHMANN und WALKER (1955) ergaben die einleuchtende Annahme, daß die Resistenz eng an den Stoffwechsel des Wirtes gebunden ist. Diese Autoren konnten zeigen, daß die Blockierung der Phosphorylierung mit 2,4-Dinitrophenol (in nicht fungiziden Dosen angewendet) es dem Pilz ermöglicht, sich rasch in sonst resistenten Pflanzen auszubreiten und deutliche Krankheits-symptome zu erzeugen. Analoge Ergebnisse konnten durch die Blockierung des Atmungszyklus mit Urethanen oder höheren Alkoholen (z. B. Octanol) erhalten werden. Als Erklärung hierfür wird angenommen, daß die Pflanzen kontinuierlich einen Stoff bilden, der bei gewissen Konzentrationen auf den Krankheitserreger toxisch wirkt. Die Bildung dieser Verbindung verbraucht Energie, die der Organismus aus dem Phosphorylierungsprozeß des Krebs-Zyklus beziehen kann. Es ist anzunehmen, daß diese Verbindung entweder relativ unbeständig ist oder sich leicht durch Stoffwechselfvorgänge in inaktive Produkte umwandeln läßt, da Extrakte resistenter Tomatenpflanzen auf Kulturen von *Fusarium lycopersici* keinerlei Toxizität ausüben. Aus der Tatsache, daß hier gewisse bekannte Enzymsysteme eine Rolle spielen, folgt aber noch nicht, daß diese mit der Resistenz der Pflanzen in einem direkten Zusammenhang stehen. Immerhin scheint die Widerstandsfähigkeit stark an die energieliefernden Lebensvorgänge des Wirtes gebunden zu sein.

Neben diesen Erklärungen für die Resistenz der Tomatenpflanzen gegenüber der Ausbreitung von *Fusarium lycopersici* läßt sich aus den hier erhaltenen Versuchsergebnissen vermuten, daß in den Pflanzen auch eine gewisse Toxinresistenz gegen die toxischen Stoffwechselprodukte des Krankheitserregers besteht. Zumindest am Beispiel der Fusarinsäure konnte dies gezeigt werden. Wohl zeigen Tomatensprosse der verschiedenen Sorten im normalen Welketest alle ungefähr denselben Grad von Schädigungen (KERN, 1952), doch ist anzunehmen, daß mit abnehmenden Toxindosen die resistenten Pflanzen weniger geschädigt werden als die anfälligen. Es ist zu erwar-

ten, daß die Tomaten ein Enzymsystem besitzen, das die Fähigkeit aufweist, unter gleichzeitiger Säureamidbildung den Stickstoff des Fusarinsäuremoleküls zu methylieren. Nähere Aufschlüsse über diese Zusammenhänge müssen durch weitere Untersuchungen erbracht werden.

C. Die Biosynthese der Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici*

I. UNTERSUCHUNGEN AM MYZEL VON *FUSARIUM LYCOPERSICI* IN VITRO

Während die Bildung der Fusarinsäure in Kulturfiltraten von *Fusarium lycopersici* eingehend untersucht worden ist (KERN, 1952; SANWAL, 1956), besaß man über das Vorkommen dieses Toxins im Myzel keine Anhaltspunkte. Um diese Frage zu klären, wurden die im folgenden beschriebenen Versuche ausgeführt (vergl. auch STOLL, RENZ und GÄUMANN, 1956).

Myzel von 14 Tage alten Kulturen der Stämme R-5-6- und 257 von *Fusarium lycopersici* Sacc. (also kurz bevor der Fusarinsäuregehalt im Kulturfiltrat sein Maximum erreicht), bei 27 ° C auf einer Richard-Nährlösung (modifiziert nach LUZ, 1934) gezogen, wird dreimal in destilliertem Wasser gewaschen, dann abgetrocknet und gewogen. Je 100 g davon werden zusammen mit 50 ml dest. Wasser in einem Homogenisator (Turmix) fein zerschlagen und anschließend langsam bei einer Temperatur von minus 60 ° C (erhalten durch ein Aceton-Trockeneis-Gemisch) ausgefroren, um die letzten Zellstrukturen zu zerstören. Nach dem Auftauen wird die wäßrige Lösung abfiltriert und mit Aktivkohle versetzt (Norit A, 1 g pro 50 ml). Danach wird die Kohle abgetrennt, mit wenig destilliertem Wasser nachgewaschen und mit einem Methanol-Ammoniak-Gemisch (100 ml Methanol + 10 ml konz. NH₃) eluiert. Dieses Eluat engt man bis zur Trockene ein und löst den Rückstand in einem Milliliter absolutem Alkohol. Je 0,005 ml dieser Lösung werden in einem sek.-Butanol-Ameisensäure-Wasser-Gemisch absteigend chromatographiert und die getrockneten Papierchromatogramme nachher mit einer wässrigen Lösung von Bromkresolgrün (40 mg in 100 ml, mit NaOH versetzt, bis ein Farbumschlag nach blau eintritt) besprüht (ZÄHNER, 1954). Es gelang aber in keinem der Versuche, irgendwelche Spuren von Fusarinsäure nachzuweisen. Auch die Anwendung von Ätherextraktion anstatt der Adsorption an Norit führten zu keinem positiven Ergebnis. Da die Methode der Fusarinsäure-Chromatographie im allgemeinen Nachweise von sehr kleinen Substanzmengen erlaubt (10 γ sind noch gut nachweisbar), kann Fusarinsäure im Myzel, wenn überhaupt, nur in solchen Mengen vorhanden sein, die für eine Schadwirkung (vergl. GÄUMANN und LOEFFLER, 1956) kaum ausreichen. Vermutlich wird die Fusarinsäure außerhalb der Zelle gebildet, da ja zur gleichen Zeit im Kulturfiltrat relativ große Mengen nachgewiesen werden können.

Über den Bildungsmechanismus liegen bis heute noch keine sicheren Angaben vor, einzig die Untersuchungen von FLÜCK und RICHLE (1955) lassen vermuten, daß Citrullin und eventuell Alanin als Vorstufen in Frage kommen.

II. DIE BILDUNG VON FUSARINSAURE DURCH *FUSARIUM LYCOPERSICI* IN TOMATENPFLANZEN

KERN und SANWAL (1954) infizierten Tomatenpflanzen mit radioaktiv markiertem Myzel. Bereits nach vier bis fünf Tagen konnten sie überall in den Pflanzen radioaktive Stoffwechselprodukte nachweisen. Später, nach dem Auftreten der ersten typischen Schädigungen, wiesen diese Stellen eine bedeutend höhere Radioaktivität auf als die übrigen Teile. Dies ließ vermuten, daß der Pilz toxische Stoffwechselprodukte ausscheidet. Fusarinsäure konnte jedoch mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Der Nachweis dieses Toxins in infizierten Pflanzen ist in der Zwischenzeit auf andere Art erbracht worden. LAKSHMINARAYANAN und SUBRAMANIAN (1955) gelang dies in Baumwollpflanzen (*Gossypium arboreum*) nach Infektionen mit *Fusarium vasinfectum* Atk. mit Hilfe der Papierchromatographie des Fusarinsäure-Kupfer-Komplexes, während KERN und KLUEPFEL (1956) die

Fusarinsäure in infizierten Tomaten mit der Isotopen-Verdünnungs-Technik nachwiesen. Die im folgenden beschriebenen Versuche sind auf letzterer Arbeit aufgebaut und sollen diese vervollständigen. Das Ziel dieser Untersuchungen ist die Klärung der Fusarinsäurebildung in verschiedenen Tomatensorten.

Da die Fusarinsäure durch den Krankheitserreger extrazellulär aus dem Pflanzensubstrat gebildet wird, ergibt sich die

Möglichkeit eines Nachweises dieses Toxins aus der folgenden Überlegung: Gelingt es, das Nährsubstrat der Wirtspflanze



Abb. 3. Versuchsanordnung zur Verabreichung von $^{14}\text{CO}_2$ an infizierte Tomatenpflanzen; Maßstab 1 : 5
(Aufnahme: Lilly Trüb, Zürich)

radioaktiv zu markieren, so müssen alle durch den Pilz und die Pflanze aus diesen Stoffen erzeugten Verbindungen ebenfalls radioaktiv sein, also auch die Fusarinsäure. Eine solche Markierung läßt sich durch Verabreichen von hochaktivem Kohlendioxyd relativ einfach erreichen. Die Versuche waren wie folgt angeordnet:

Junge Tomatenpflanzen werden nach der Methode von WELLMAN (1939) mit *Fusarium lycopersici* (Stamm R-5-6) infiziert und sobald die ersten Anzeichen einer Infektion (Aufhellungen der Blattnerven; FOSTER, 1946) auftreten (meist nach 72 Stunden), in einem geschlossenem Glasgefäß (siehe Abb. 3) einer hochradioaktiven $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre (entwickelt aus $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ und HCl) ausgesetzt. Die Pflanzen erhalten in Abständen von zwei Tagen fünfmal rund $50\ \mu\text{C}$, im ganzen also rund $250\ \mu\text{C}^{14}\text{CO}_2$ vorgesetzt. Nach zehn Tagen zeigen die Pflanzen deutliche Krankheitssymptome (braune Stengelgefäße und Blattnekrosen); sie werden nun in einem Mörser mit Quarzsand fein zerrieben und mit 80-proz. Aethanol (200 ml je g frischen Pflanzenmaterials) extrahiert. Der Extrakt wird bei 40°C am Vakuum vom Aethanol befreit, von den Pigmenten mit Hilfe eines Seitz-Filters getrennt und mit einer zwischen 30 und 50 mg liegenden Menge inaktiver Fusarinsäure versetzt. Hierauf erfolgt bei pH 8 mit Äther während 72 Stunden im Kutscher-Stuedel-Apparat das Entfernen der Fette und Öle und danach ebensolange die Extraktion der Fusarinsäure bei pH 4, ebenfalls mit Äther. Dieser Ätherextrakt wird zur Trockene eingedampft und mit einem Petroläther-Ligroin-Gemisch (1 : 1) drei Stunden unter Rückfluß gekocht. Der unlösliche Rückstand wird verworfen und der lösliche Anteil nach dem Eindampfen zur Trockene zwei Stunden lang mit Hexan gekocht. Nach dem Einengen dieser Lösung kristallisiert in der Kälte die Fusarinsäure aus. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisieren aus Hexan. Die Bestimmung der Radioaktivität geschieht nach Verbrennen bestimmter Mengen der isolierten Fusarinsäure zu Bariumkarbonat nach VAN SIJKE et al. (1940; 1951 a und b) mit Hilfe des GM-Zählers. Diese Messungen werden nach jeder Umkristallisation durchgeführt und zwar solange, bis die erhaltenen Werte konstant bleiben. Die Reinheit der Fusarinsäure wird durch Papierchromatogramme und Schmelzpunktbestimmungen bestätigt.

Die mit dieser Versuchsanordnung erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle 4 zusammengestellt. Es sind in ihr nur die beiden Toma-

Tabelle 4

Die spezifische Radioaktivität der aus infizierten, radioaktiv markierten Tomatenpflanzen rückisolierten Fusarinsäure

Tomatensorte	Frischgewicht der Pflanzen in g	gegebene Radioaktivität in μC	verwendete inaktive Fusarinsäure in mg	spez. Radio- aktivität der isolierten Fusarinsäure in Imp./Min.
Tuckswood	4,57	250	46,3	88
Tuckswood	4,74	250	32,8	163
Tuckswood	5,07	250	48,0	142
Tuckswood	4,66	250	41,4	138
Bonny Best	5,70	260	31,2	131
Bonny Best	5,43	250	35,6	153
Kontrollen:				
Tuckswood	4,71	250	30,3	13
Bonny Best	65,1	260	29,7	21

tensorten Tuckswood und Bonny Best enthalten. Die Untersuchungen mit den resistenten Red Currant schlugen fehl, da Pflanzen dieser Sorte unter den herrschenden Versuchsbedingungen jedesmal vorzeitig zu Grunde gingen.

Die spezifischen Radioaktivitäten der zurückisolierten Fusarinsäure sind in allen Versuchen sehr gering, doch zeigt der Vergleich mit den Kontrollversuchen nicht infizierter Pflanzen eindeutig die Unterschiede. Damit ist der Beweis erbracht, daß der Krankheitserreger in vivo Fusarinsäure zu bilden vermag. Die gefundenen niedrigen Aktivitäten erklären sich durch die große Verdünnung der in vivo sicher nur in äußerst geringen Mengen gebildeten, radioaktiven Fusarinsäure, mit dem, zur Rückisolierung notwendigen, großen Quantum des inaktiven Toxins. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit ausgeführten Stoffwechseluntersuchungen erklären auch, warum die Fusarinsäure vorher nie mit den üblichen chemischen Methoden nachgewiesen werden konnte, wird dieses Toxin doch sowohl in anfälligen als auch in resistenten Tomatenpflanzen fortwährend zu einem großen Teil abgebaut und in andere Verbindungen umgewandelt. Die Frage nach dem Verhalten der verschiedenen Tomatensorten in bezug auf die Bildung der Fusarinsäure in vivo konnte nur teilweise und ausschließlich qualitativ geklärt werden. Bei gleicher Versuchsordnung weisen die spezifischen Radioaktivitäten der rückisolierten Fusarinsäure größenordnungsmäßig bei Bonny-Best- und Tuckswood-Pflanzen die gleichen Werte auf. Das Toxin wird also in beiden Sorten gebildet und wahrscheinlich auch in ähnlich großen Mengen. Red Currant konnten, wie schon erwähnt, nicht geprüft werden. Eventuell könnten Versuche mit der ebenfalls resistenten Sorte Pan America hier noch einige weitere Aufschlüsse bringen. Zu einem späteren Zeitpunkt wird hierüber noch berichtet werden.

D. Diskussion

Nach der von GOTTLIEB (1944) über die Welkekrankheiten aufgestellten Theorie läßt sich ein Teil der Symptome in der Wirtspflanze direkt durch Ausscheidungen toxischer Stoffwechselprodukte des Krankheitserregers erklären. Der in dieser Hinsicht wohl am besten untersuchte Pilz dürfte *Fusarium lycopersici* Sacc. sein. Die meisten in der infizierten Pflanze auftretenden Krankheitssymptome lassen sich durch Kulturfiltrate des Pilzes ebenfalls in gesunden Pflanzen erzeugen. Es konnte daher angenommen werden, daß *Fusarium lycopersici* die drei bekannten Welketoxine auch in vivo bildet (GÄUMANN, 1951 a). Tatsächlich gelang in der letzten Zeit der Nachweis der Fusarinsäure in infizierten Tomatenpflanzen. Diese Verbindung entspricht also nach der Definition von DIMOND und WAGGONER (1953) einem „V i v o - t o x i n“. Auch von den beiden anderen Welketoxinen des *Fusarium lycopersici* ist dies anzunehmen, jedoch noch nicht bewiesen.

Die Schwierigkeiten des Nachweises in vivo beruhen auf der Tatsache, daß in kranken Pflanzen nur sehr geringe Mengen der Toxine vorhanden sein können, weil diese einem fortwährenden Stoffwechsel unterworfen sind. Am Beispiel der Fusarinsäure konnten solche Stoffwechselvorgänge näher untersucht

werden. Verabreicht man Tomatensprossen die *dosis minima* an Fusarinsäure, so vermag der pflanzliche Organismus dieses Toxin innerhalb 48 Stunden in verschiedene andere Verbindungen umzuwandeln. Rund 10 % der gegebenen Toxinmenge werden decarboxyliert und möglicherweise in 3-n-Butyl-Pyridin übergeführt; weitere Teile setzen sich in basische und neutrale, resp. ätherunlösliche Substanzen um und ein größerer Prozentsatz bleibt unveränderte Fusarinsäure. Rund 5—7 % sind alkoholunlöslich und können nicht näher charakterisiert werden. Diese Anteile variieren zwischen den verschiedenen Tomatensorten ziemlich stark; so verbleiben in der krankheitsanfälligen Sorte Bonny Best rund 20 % mehr Fusarinsäure unverändert als in den resistenten Red Currant, während sich Anteile des basischen Stoffwechselproduktes gerade umgekehrt verhalten.

Diese basische Substanz konnte in der vorliegenden Arbeit als N-Methyl-Fusarinsäureamid, eine teilweise entgiftete Verbindung, identifiziert werden. Damit wurde erstmals eine Stickstoff-Methylierung als Entgiftungsreaktion in Pflanzen nachgewiesen. Diese Reaktion findet in allen drei untersuchten Tomatensorten statt, erreicht aber in Red Currant das größte Ausmaß. Demnach besitzen die Tomatenpflanzen gegen Fusarinsäure eine gewisse „T o x i n - r e s i s t e n z“ (GÄUMANN, 1951 b), die parallel mit der Ausbreitungsresistenz verläuft, d. h. je resistenter eine Sorte gegen die Generalisation des Pilzes ist, desto größere Anteile der durch diesen Krankheitserreger gebildeten Fusarinsäure können inaktiviert werden.

Die Identifizierung der neutralen resp. ätherunlöslichen Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure konnte noch nicht durchgeführt werden, so daß die unterschiedlichen Mengen dieser Verbindungen in den verschiedenen Tomatensorten nicht erklärbar sind. Immerhin bestehen Anhaltspunkte (z. B. treten im qualitativen Welketest keine Schädigungen an Tomatensprossen auf), daß auch hier mindestens eine teilweise Entgiftung stattfindet.

Der Mechanismus solcher Entgiftungsreaktionen ist noch nicht bekannt. Vermutlich beruht er auf einem besonderen Enzym oder Enzymsystem der Wirtspflanze, z. B. Transmethyhasen, wie sie bei analogen Umwandlungen von Pyridinderivaten in tierischen Organismen angenommen werden (WILLIAMS, 1949; LEIFER et al., 1951).

Neben diesen Inaktivierungsvorgängen stellt sich nun die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der Fusarinsäure. TAMARI und KAJI (1952, 1953) vermuteten, die Wirkung beruhe auf Chelatbildungen dieses Toxins mit den Schwermetallionen des Pflanzensubstrates. Wie weit und unter welchen Bedingungen diese Annahme zutrifft, konnte nicht gezeigt werden. Dagegen ergaben die Untersuchungen von BACHMANN (1956) über den Einfluß der Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten, daß das Fusarinsäuremolekül zwei wirksame Gruppen enthält, die auf zwei verschiedene Stoffwechselvorgänge hemmend wirken. Die n-Butylgruppe in 5-Stellung schädigt die Cytochromoxydasen, während der Pyridinring den Ablauf der oxydativen Phosphorylierung stört. Auf welche Weise die Enzymsysteme beeinflusst werden, ist jedoch noch nicht bekannt. Diese Eigenschaften der Fusarinsäure besitzt in einem noch viel stärkeren Ausmaße auch das 3-n-Butyl-

Pyridin (nach BACHMANN ist diese Substanz rund 100mal giftiger). Sollte also letztere Verbindung wirklich das Endprodukt der in den Tomatenpflanzen stattfindenden Decarboxylierung der Fusarinsäure sein, könnte ihr möglicherweise der größte Teil der Giftwirkung zuzuschreiben sein. Das würde bedeuten, daß die Pflanzen einerseits sich selber durch eine Toxin-Aktivierung schaden, andererseits aber die Fähigkeit einer Toxin-Inaktivierung besitzen.

Zusammenfassung

1. Wird Tomatensprossen eine bekannte Dosis radioaktiv markierter Fusarinsäure verabreicht, so können nach 48 Stunden rund 83 % der Radioaktivität mit 80-proz. Aethanol wieder extrahiert werden, während ein kleiner Teil unextrahierbar im Pflanzenmaterial verbleibt. Die Verwendung anderer Extraktionsmittel ergibt bedeutend schlechtere Ausbeuten.
2. Die einem Tomatenproß verabreichte markierte Fusarinsäure wird zu einem großen Teil chemisch verändert. So werden rund 10 % des Toxins decarboxyliert und die Pflanze gibt $^{14}\text{CO}_2$ ab. Als erstes Spaltprodukt ist 3-n-Butyl-Pyridin zu erwarten, doch konnte es noch nicht nachgewiesen werden. Ferner entstehen basische und neutrale, resp. ätherunlösliche Stoffwechselprodukte, während ein größerer Teil der Fusarinsäure unverändert bleibt. Die unextrahierbar im Pflanzenmaterial verbleibende Radioaktivität läßt sich nicht näher charakterisieren.
3. Von diesen Stoffwechselprodukten gelang die Identifizierung der im basischen Extrakt gefundenen Substanz. Es handelt sich um Fusarinsäureamid-Methylat-Ionen, die wahrscheinlich in der Pflanze mit irgendwelchen organischen Säureresten abgesättigt sind. Die Identifizierung gelang mit Hilfe des Cl-Salzes, also als Fusarinsäureamid-Chlor-Methylat. Dieses Abbauprodukt der Fusarinsäure ist für pflanzliche Organismen ungiftig. Damit konnte erstmals in Pflanzen eine N-Methylierung als Entgiftungsreaktion nachgewiesen werden.
4. Die Identifizierung zweier weiterer Abbaustoffe ließ sich nicht durchführen, doch bestehen Anhaltspunkte, daß es sich hier ebenfalls um wenig giftige Verbindungen handelt.
5. Untersuchungen der drei Tomatensorten Bonny Best, Tuckswood und Red Currant ergaben eine qualitative Übereinstimmung der einzelnen Stoffwechselprodukte der Fusarinsäure. In quantitativer Hinsicht ist mit zunehmender Resistenz der Sorte auch eine Zunahme der entgifteten Substanzen verbunden, während sich der Gehalt an unveränderter Fusarinsäure umgekehrt verhält. Es konnte damit ein Beispiel von Toxinresistenz in Pflanzen gefunden werden, doch bestehen zwischen den Tomatensorten auch Unterschiede in der Ausbreitungsresistenz.
6. Im Myzel von *Fusarium lycopersici* Sacc. ist Fusarinsäure nicht nachweisbar. Die Fusarinsäure wird also vermutlich extrazellulär gebildet; mög-

licherweise entsteht sie durch enzymatische Einwirkung des Pilzes auf das Wirtssubstrat.

7. Diese extrazelluläre Bildung gab die Grundlage für den Nachweis der Fusarinsäure in infizierten Pflanzen. Der Nachweis verlief in den Sorten Bonny Best und Tuckswood erfolgreich, während Red Currant nicht geprüft werden konnte. Die Untersuchungen waren nur qualitativ durchführbar.

Summary

1. After giving tomato cuttings a known dose of radioactive labelled fusaric acid, 83 % of the radioactivity can be reextracted with 80 % ethanol after 48 hours while a small amount remains unextractable in the plant material. The use of other solvents gives a considerably lower yield.
2. The ^{14}C -labelled fusaric acid when applied to tomato cuttings is metabolized to a great extent. Thus 10 % of the toxin are decarboxylated and can be found as $^{14}\text{CO}_2$. In this reaction 3-n-butylpyridine would be expected if no other changes take place, but this compound has not been detected yet. Furthermore basic and neutral, respectively etherinsoluble substances occur, while a considerable amount remains as unchanged fusaric acid. The unextractable radioactivity in the plant material cannot be characterized more closely.
3. The substance found in the basic extract was identified as N^1 -methylfusaric acid amide ion which in the plant may be saturated with organic acids. The identification succeeded with the aid of the chlorine salt. This metabolic product is largely non toxic for plant organisms. To our knowledge this is the first time that a N-methylation has been demonstrated as a detoxication mechanism in plants.
4. The identification of the other two metabolic substances did not succeed but there is evidence that they are also detoxicated to a certain extent.
5. The metabolic products of the three tomato varieties (Bonny Best, Tuckswood and Red Currant) used in our experiments show no qualitative difference but with increasing resistance of the variety more detoxicated substances are formed while the amount of unchanged fusaric acid decreases. Hereby an example of toxin resistance in plants was found.
6. No fusaric acid is detectable in the mycelium of *Fusarium lycopersici* Sacc. Therefore it is expected that fusaric acid is formed extracellularly.
7. Fusaric acid was found in infected tomato plants of the Bonny Best and Tuckswood varieties, while experiments with Red Currant did not succeed.

Herrn Prof. Dr. E. GÄUMANN, Direktor des Institutes für spezielle Botanik der E. T. H. möchte ich für die Ermöglichung dieser Untersuchungen herzlichst danken. Mein Dank geht auch an Herrn Dr. H. KERN für seine stete Unterstützung und seine wertvollen Anregungen.

Die Arbeit wurde durch einen Beitrag der FRITZ-HOFFMANN-LA ROCHE-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz ermöglicht. Ihrer Behörde sei auch an dieser Stelle der beste Dank ausgesprochen.

Ferner möchte ich Herrn Dr. B. D. SANWAL, University of Dehli, für seine Ratschläge und sein Interesse an dieser Arbeit, sowie Herrn F. HUMM, Obergärtner am Institut für spezielle Botanik, für die Anzucht der Tomatenpflanzen und für praktische Hilfe, meinen besten Dank übermitteln.

Literaturverzeichnis

- ALBERT, A., 1951: Selective Toxicity. Methuen & Co. Ltd., London. 228 S.
- ANDERSON, C., Y. DELABARRE and A. A. BOTHNER-By, 1952: Chemical analysis and isotope assay of organic compounds. Anal. Chem. 24, 1298—1303.
- BACHMANN, E., 1956: Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z. 27, 255—288.
- CALVIN, M., C. HEIDELBERGER, J. C. REID, B. M. TOLBERT and P. E. YANKWICH, 1949: Isotopic Carbon. John Wiley & Sons, New York, 376 S.
- CLAUSON-KAAS, N., PL. A. PLATTNER und E. GÄUMANN, 1944: Über ein welkeerzeugendes Stoffwechselprodukt von *Fusarium lycopersici* Sacc. B. Schweiz. Bot. Ges. 54, 523—528.
- COBB, I. and A. K. SOLOMON, 1948: Rev. Sci. Instruments 19, 441. Zit. nach KAMEN, M. D., 1951: Radioactive Tracers in Biology. 2nd. Ed. Academic Press Inc., New York.
- DAVIŠ, D., 1953: The role of enzymes in the etiology of Fusarium wilt of Tomato. Phytopathology 43, 470.
- DEUEL, H., 1954: Über Störungen des Spurenelementhaushaltes der Pflanzen durch Welktoxine. Phytopath. Z. 21, 337—348.
- DIMOND, A. E. and P. E. WAGGONER, 1953: On the nature and the role of vivotoxins in plant disease. Phytopathology 43, 229—235.
- ETTLINGER, L., 1955: Wirkungsweise und Wirkungsmechanismus der Antibiotica. Schweiz. Med. Wochenz. 85, 271—282.
- FLÜCK, V. und K. H. RICHLER, 1955: Papierchromatographische Untersuchungen über den Aminosäuren-Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. 24, 455 bis 461.

- FCSTER, R. E., 1946: The first symptom of Fusarium wilt: clearing ultimate veinlets in the leaf. *Phytopathology* 36, 691—694.
- FÜHNER, H. und W. BREIPOHL, 1933: Temperatur und Giftempfindlichkeit. *Arch. f. experiment. Pathol.* 173, 146—158.
- GÄUMANN, E., 1951 a: Problems of pathological wilting in plants. *Adv. Enzymology* 11, 401—437.
- —, 1951 b: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Birkhäuser Verlag, Basel, 681 S.
- — und W. LOEFFLER, 1957: Über die Wirkung der Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität der Markzellen von Tomatenpflanzen. *Phytopath. Z.* 28, 319—328.
- — und ST. NAEF-ROTH, 1954: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. *Phytopath. Z.* 21, 349—366.
- — und — —, 1955: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. II. Die Verschiebung der Toxizität durch steigende Zusätze von Asche aus jungen Tomatensprossen. *Phytopath. Z.* 23, 147—160.
- — und — —, 1956: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. IV. Die Verschiebung der Toxizität durch steigende Absättigung mit verschiedenen Schwermetallionen. *Phytopath. Z.* 25, 418—444.
- —, — — und F. KOBEL, 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. *Phytopath. Z.* 20, 1—38.
- —, — — und G. MIESCHER, 1950: Untersuchungen über das Lycomarasmin. *Phytopath. Z.* 16, 257—288.
- —, — —, P. REUSSER und A. AMMANN, 1952: Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. *Phytopath. Z.* 19, 160—220.
- —, CH. STOLL und H. KERN, 1953: Über Vasinfuscarin, ein drittes Welketoxin des *Fusarium lycopersici*. *Phytopath. Z.* 20, 345—347.
- GOTHOSKAR, S. S. and R. P. SCHEFFER, 1953: Pectic enzymes in the physiology of Fusarium wilt in tomato. *Phytopathology* 43, 472.
- —, — —, M. A. STAHMANN and J. C. WALKER, 1955: Further studies on the nature of Fusarium resistance in tomato. *Phytopathology* 45, 303—307.
- —, — —, J. C. WALKER and M. A. STAHMANN, 1953: The role of pectic enzymes in Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 43, 535—536.
- GOTTLIEB, D., 1943: The presence of a toxin in tomato wilt. *Phytopathology* 33, 126 bis 135.
- —, 1944: The mechanism of wilting caused by *Fusarium bulbigenum* var. *lycopersici*. *Phytopathology* 34, 41—59.
- HARDEGGER, E. und E. NIKLES, 1956: 25. Welkestoffe und Antibiotica. Fusarinsäure — (carboxyl-¹⁴C) und quarternäre Derivate der Fusarinsäure. *Helv. Chim. Acta* 39, 223—229.
- HIS, W., 1887: *Arch. exp. Path. u. Pharmakol.* 22, 253. Zitiert nach WILLIAMS, R. T., 1949: *Detoxication mechanisms*. London.
- IRVING, G. W., TH. D. FONTAINE and S. P. DOOLITTLE, 1945: Lycopersicin a fungistatic agent from the tomato plant. *Science* 102, 9.
- KAMEN, M. D., 1951: *Radioactive Tracers in Biology*. 2nd. Ed. Academic Press Inc., New York, 429 S.
- KERN, H., 1952: Über die Beziehung zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen *Fusarium lycopersici*. *Phytopath. Z.* 19, 351—382.
- — und D. KLUEFFEL, 1956: Der Nachweis von Fusarinsäure in mit *Fusarium lycopersici* Sacc. infizierten Tomatenpflanzen. *Experientia* 12, 181—182.

- KERN, H., und B. D. SANWAL, 1954: Untersuchungen über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* mit Hilfe von radioaktivem Kohlenstoff. *Phytopath. Z.* **22**, 449—453.
- KOBEL, F., 1951: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. *Phytopath. Z.* **18**, 157—195.
- LAKSHMINARAYANAN, K. and D. SUBRAMANIAN, 1955: Is fusaric acid a vivotoxin? *Nature* **176**, 697—698.
- LEIFER, E., L. J. ROTH, D. S. HOGNESS and M. H. CORSON, 1951: The metabolism of radioactive nicotinic acid and nicotinamid. *J. Biol. Chem.* **190**, 595—602.
- LISSITZKY, S. et R. MICHEL, 1952: Substances organiques marquées par les radioisotopes. *Bull. Soc. Chim., France* **1952**, 891—903.
- LUZ, G., 1934: Über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* und *Fusarium lini*. *Phytopath. Z.* **7**, 585—638.
- MUNIER, R. et M. MACHEBOEUF, 1949: Microchromatographie de partage des alkaloides et de diverses bases azotées biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **31**, 1144—1162.
- PLATTNER, PL. A., und N. CLAUSON-KAAS, 1944: Über ein welkeerzeugendes Stoffwechselprodukt von *Fusarium lycopersici* Sacc. *Helv. Chim. Acta* **28**, 188—195.
- —, — —, A. BOLLER und U. NAGER, 1948: Der hydrolytische Abbau des Lycocarmins. *Helv. Chim. Acta* **31**, 860—869.
- —, W. KELLER und A. BOLLER, 1954: Konstitution und Synthese der Fusarinsäure. *Helv. Chim. Acta* **37**, 1379—1392.
- ROCHE, J., S. LISSITZKI et R. MICHEL, 1954: Chromatographic analysis of radioactive iodine compounds from Thyroid gland and body fluid. Aus GLICK, D., *Methods of biochemical analysis* **1**, 243—264.
- SANWAL, B. D., 1955: Isotopentechnik. Aus LINSKENS, H. F., *Papierchromatographie in der Botanik*. Springer-Verlag, Berlin.
- —, 1956: Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc., with the aid of radioactive Carbon. *Phytopath. Z.* **25**, 333—384.
- STODDARD, E. M., and A. E. DIMOND, 1948: Influence of nutritional level on the susceptibility of tomatoes to *Fusarium* wilt. *Phytopathology* **38**, 670—671.
- STOLL, CH., 1954: Über Stoffwechsel und biologische wirksame Stoffe von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll., dem Erreger der Bakanae-Krankheit. *Phytopath. Z.* **22**, 233—274.
- —, J. RENZ und E. GÄUMANN, 1957: Über die Bildung verschiedener Fusarinsäuren durch *Fusarium lycopersici* Sacc. in saprophytischen Kulturen. *Phytopath. Z.* **29**, 388—394.
- TAMARI, K., and J. KAJI, 1952, 1953: Studies on the mechanism of injurious action of fusarinic acid on plant growth. Parts 1—8. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **26**, 223—227, 295—298, 298—303, 345—349, 349—353; **27**, 245—249, 249—252, 303—306.
- VAN SLYKE, D. D. and J. FOLCH, 1940: Manometric carbon determination. *J. Biol. Chem.* **136**, 509—541.
- —, J. PLAZIN and I. R. WEISIGER, 1951 a: Reagents for the VAN SLYKE-FOLCH wet carbon combustion. *J. Biol. Chem.* **191**, 299—304.
- —, R. STEELE and J. PLAZIN, 1951 b: Determination of total carbon and its radioactivity. *J. Biol. Chem.* **192**, 769—805.
- DU VIGNEAUD, V., M. COHN, J. P. CHANDLER, J. R. SCHENK and S. SIMMONDS, 1941: The utilization of the methyl group of methionin in the biological synthesis of choline and ceratine. *J. Biol. Chem.* **140**, 625—641.
- WALKER, J. C. and M. A. STAHMANN, 1955: Chemical nature of disease resistance in plant. *Ann. Rev. Plant Physiology* **6**, 351—366.

- WELLMAN, F. L., 1939: A technique for studying host resistance and pathogenicity in tomato Fusarium wilt. *Phytopathology* 29, 945—956.
- WILLIAMS, R. T., 1949: Detoxication mechanisms. 2nd Ed. New York, 288 S.
- WINSTEAD, N. N. and J. C. WALKER, 1954: Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. *Phytopathology* 44, 153—158.
- YABUTA, T., K. KAMBE and T. HAYASHI, 1934: Biochemistry of the bakanae fungus. I. Fusaric acid, a new product of the bakanae fungus. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 10, 1059—1069.
- YANKWICH, P. E., T. H. NORRIS and J. HUSTON, 1947: Correcting for the adsorption of weak β -particles in thick samples. *Anal. Chem.* 19, 439—441.
- ZÄHNER, H., 1954: Bestimmung der Fusarinsäure mit Hilfe der Papierchromatographie. *Phytopath. Z.* 22, 227—228.
- —, 1955: Über den Einfluß der Ernährung auf die Toxinempfindlichkeit von Tomatenpflanzen. *Phytopath. Z.* 23, 49—88.

Lebenslauf

Geboren am 7. Oktober 1930 in Darmstadt (Deutschland). 1937 Übersiedlung nach Zürich. Acht Jahre Rudolf-Steiner-Schule in Zürich. Ein Jahr Berufswahlschule des Institutes Juventus und anschließend drei Jahre Vorbereitung auf die Maturität am gleichen Institut. Frühjahr 1950: Eidgenössische Maturität, Typus C, in Bern. Herbst 1950: Eintritt in die Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Studium der biologisch-chemischen Richtung. Im April 1954: Diplom der Abteilung für Naturwissenschaften. Seither Assistent und wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Herrn Prof. Dr. E. Gäumann am Institut für spezielle Botanik der E.T.H.