

Pilzpigmente VII¹Nachweis und chemotaxonomische Bedeutung
von Pulvinsäuren in *Rhizopogon*
(Gasteromycetes)Pigments of Fungi, VII¹Identification and Chemotaxonomic Evaluation of
Pulvinic Acids in *Rhizopogon* (Gasteromycetes)

W. STEGLICH und I. PILS

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität
München

und A. BRESINSKY

Botanische Staatssammlung München

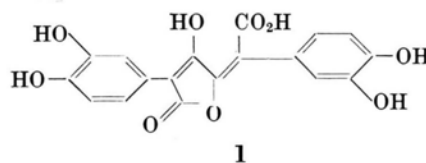
(Z. Naturforsch. 26 b, 376–377 [1971]; eingegangen am 14. Januar 1971)

Der verwandtschaftliche Anschluß von oberirdisch (epigäisch) fruchtenden Blätter- und Röhrenpilzen (*Agaricales*, *Boletales*, *Russulales* etc.) an unterirdisch (hypogäisch) wachsende Bauchpilze („Gasteromycetes“) ist in pilzsystematischen Untersuchungen mehrfach glaubhaft gemacht worden. Unabhängig voneinander zeigen verschiedene Verwandtschaftsreihen eine Variation der Fruchtkörperform vom Organisationsniveau eines Blätter- und Röhrenpilzes bis zu dem eines Bauchpilzes. Besonders deutlich sichtbar gemacht werden konnte die Richtigkeit derartiger Vorstellungen in der Ordnung der *Russulales*^{2, 3}: *Russula*, *Lactarius*, *Elasmomyces*, *Macowanites*, *Martellia*, *Arcangeliella* und *Zelleromyces* sind Gattungen, die trotz sehr verschiedener Fruchtkörperformen auf nähere Verwandtschaft weisende gemeinsame Merkmale besitzen^{4, 5}.

Werden verwandtschaftliche Zusammenhänge der genannten Gattungen unumstritten anerkannt, so bestand bisher weitgehend Unklarheit, ob die zu den Boletaceen gehörenden Röhrenpilze an bestimmte Bauchpilze, etwa an die Gattung *Rhizopogon*, anzuschließen sind oder nicht. Seitdem der auf morphologischen Kriterien beruhende verwandtschaftliche Zusammenschluß von Boletaceen mit Röhrenhymenophor einerseits sowie Gomphidiaceen und Paxillaceen mit Lamellenhymenophor andererseits⁶ auch durch das offensichtlich sehr spezifische Vorkommen von Pulvinsäure-Derivaten bestätigt werden konnte^{7–9}, lag der Gedanke nahe, jene

gastroiden Pilze auf Pulvinsäure-Vorkommen zu untersuchen, welche in der systematischen Literatur entweder in die Nähe der Röhrenpilze gebracht werden, oder bei denen zumindest verwandtschaftliche Beziehungen in Erwägung gezogen wurden (gastroboletoides Serie). Es handelt sich um die Genera *Gastroboletus*, *Brauniellula*, *Truncocolumella*, *Chamonixia* und *Rhizopogon*^{10, 11}. Während *Boletales*-Merkmale bei *Gastroboletus*, *Brauniellula*, *Truncocolumella* und *Chamonixia* mehr oder minder deutlich sind, blieb ein Anschluß von *Rhizopogon* an die Boleten auf Grund morphologischer Merkmale sehr fraglich¹². Immerhin wird auf Übereinstimmungen der unzweifelhaft zur gastroboletoiden Serie gehörenden *Truncocolumella* mit *Rhizopogon* verwiesen, wenn auch SMITH in SMITH und ZELLER¹³ gleichzeitig entgegenhält: „At present I am not satisfied that *Truncocolumella citrina* is a bonafide connection to *Rhizopogon*“. Daß die chemische Merkmalsausstattung weitere Kriterien für einen verwandtschaftlichen Zusammenschluß liefern könnte, wird durch die beobachtete Blauverfärbung bei *Rhizopogon*, *Chamonixia*, *Truncocolumella* und *Gastroboletus* angedeutet. Sie tritt verbreitet auch bei Boletaceen auf und ist hier auf Polyhydroxy-pulvinsäuren wie Variegat- und Xerocomsäure⁷ zurückzuführen.

Wir haben daher *Rhizopogon* auf Pulvinsäuren untersucht. Zur Verfügung stand uns ein Fruchtkörper von *R. roseolus* (Corda in Sturm) Th. M. Fries [= *R. rubescens* (Tul.) Tul.], der drei Monate in der Tiefkühltruhe aufbewahrt worden war. Er wurde zerkleinert und mit angesäuertem Äthanol extrahiert. Man dampfte ein und entfernte den größten Teil der braunen Begleitstoffe durch Ausziehen mit Petroläther. Präparative Dünnschichtchromatographie des Rückstands an Kieselgel G [Laufmittel: Benzol/Ameisensäuremethylester/Ameisensäure (13 : 5 : 4)] ergab hauptsächlich eine gelbe und eine rote Zone, die im *R_f*-Wert mit Variegatsäure **1**⁷ und Variegatorubin **2**¹⁴ übereinstimmen.



Sonderdruckanforderungen an Dr. WOLFGANG STEGLICH, Organ.-Chem. Institut d. T.U. München, D-8000 München 2, Arcisstr. 21.

¹ 6. Mitt.: W. STEGLICH, F. ESSER u. I. PILS, Z. Naturforsch. 26 b, [1971], im Druck.

² E. GÄUMANN, Die Pilze, S. 390, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart 1964.

³ H. KREISEL, Grundzüge eines natürlichen Systems der Pilze, S. 163, Cramer, Weinheim 1969.

⁴ G. MALECON, Trav. Crypt. déd. à L. Mangin, 1931, 337.

⁵ R. SINGER u. A. H. SMITH, Mem. Torrey Bot. Club 21, 1 [1960].

⁶ R. SINGER, Agaricales in modern Taxonomy, S. 694, J. Cramer, Weinheim 1962.

⁷ Boletaceen: z. B. R. L. EDWARDS u. G. C. ELSWORTHY, Chem. Commun. 1967, 373; P. C. BEAUMONT, R. L. ED-

WARDS u. G. C. ELSWORTHY, J. chem. Soc. [London], C. 1968, 2968; W. STEGLICH, W. FURTNER u. A. PROX, Z. Naturforsch. 23 b, 1044 [1968]; A. BRESINSKY u. P. ORENDI, Z. Pilzkunde 36, 135 [1970].

⁸ Gomphidiaceen: W. STEGLICH, W. FURTNER u. A. PROX, Z. Naturforsch. 24 b, 941 [1969].

⁹ Paxillaceen: M. C. GAYLORD, R. G. BENEDICT, G. M. HATFIELD u. L. R. BRADY, J. pharmac. Sci. 59, 1420 [1970].

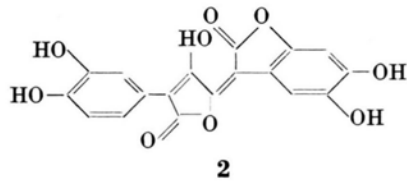
¹⁰ A. H. SMITH u. R. SINGER, Mycologia 50, 927 [1958].

¹¹ A. H. SMITH u. R. SINGER, Brittonia 11, 205 [1959].

¹² A. H. SMITH u. S. M. ZELLER, Mem. New York Bot. Gard. 14 (2), 1 [1966].

¹³ Loc. cit.¹², S. 22.

¹⁴ W. STEGLICH, W. FURTNER u. A. PROX, Z. Naturforsch. 25 b, 557 [1970].



Zur Sicherung der Zuordnung wurden die Pigmente eluiert und in verschiedenen Systemen dünnstichtchromatographisch mit den authentischen Verbindungen verglichen. Es ergab sich kein Unterschied, ebenso stimmten die UV-Spektren und die Farbreaktionen mit $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$ überein. In luftgetrockneten Fruchtkörpern (Ernte September 1970) ließ sich nur noch Variegatorubin nachweisen.

Man kann wohl annehmen, daß die charakteristische Rotverfärbung der Sporocarpium von *R. roseolus* auf der Oxydation von Variegatsäure zu Variegatorubin¹⁴ basiert. Bei unseren Untersuchungen fanden wir kein Pigment, das in seinen Eigenschaften der von HARTSEN¹⁵ aus *R. roseolus* isolierten und von OUDEMANS¹⁶ näher untersuchten Rhizopogonsäure entspricht. Die Aufklä-

rung ihrer chemischen Natur muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Der Nachweis des „Leitpigments“ der Boletaceen, Variegatsäure, und ihres Oxydationsprodukts **2** in Rhizopogon stellt eine starke Stütze für die eingangs diskutierte verwandtschaftliche Beziehung von Boletaceen zu manchen Gasteromyceten dar.

Wie eine vorläufige Untersuchung zeigte, enthält *Chamonixia caespitosa* Roll. ebenfalls gelbe, blauende Pigmente, die aber in ihren R_f -Werten mit keiner der bekannten Pulvinsäuren übereinstimmen. Für ihre nähere Charakterisierung zwar zu wenig Material vorhanden.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeiten über Pilzpigmente sowie Herrn J. STANGL, Augsburg, für die Hilfe bei der Materialbeschaffung. Herbarbelege der untersuchten Pilzproben befinden sich im Staatsherbarium München. *Rhizopogon roseolus* (Corda in Sturm) TH. M. FRIES, Pupplinger Au bei Wolftrathausen, September 1970, leg. K. ZIPFEL und R. STEGLICH; *Chamonixia caespitosa* Roll., Mertinger Gemeindegewald, Lkr. Donauwörth, 7. 9. 1968, leg. J. STANGL.

¹⁵ M. F. A. HARTSEN, Neue chemische Untersuchungen, Ferd. Förstmann's Verlag, Nordhausen 1875.

¹⁶ A. C. OUDEMANS, JR., Recueil Trav. chim. Pays-Bas **2**, 155 [1883].

Zur Photosynthese grüner Pflanzen, VI¹

Isolierung von Diatoxanthin aus *Euglena gracilis*

Photosynthesis in Green Plants VI.

Isolation of Diatoxanthin from *Euglena gracilis*

B. JOHANNES, H. BRZEZINKA und H. BUDZIKIEWICZ

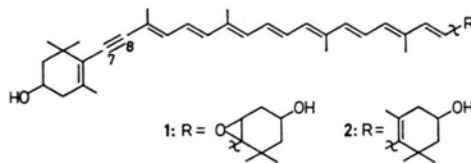
Institut der Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung
D-3301 Stöckheim

(Z. Naturforsch. **26 b**, 377—378 [1971]; eingegangen am 20. Januar 1971)

An Stelle der bei höheren Pflanzen an der lichtinduzierten Sauerstoffbindung beteiligten Pigmente Zeaxanthin, Antheraxanthin und Violaxanthin treten bei einer Reihe von Algen Diadinoxanthin (**1**) und Diatoxanthin (**2**)^{2, 3} auf. Während **1** in *Euglena gracilis* eindeutig nachgewiesen worden ist⁴, ist die Anwesenheit von **2** nur durch Vergleich der Chromatogramme verschiedener Algenextrakte wahrscheinlich gemacht worden⁵. Wir möchten nun über die Isolierung und Identifizierung von **2** aus *Euglena gracilis* berichten.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. BUDZIKIEWICZ, Institut f. Organ.-Chem. d. Univ. Köln, Lehrstuhl II, D-5000 Köln, Zülpicher Str. 47.

¹ V. Mitt.: H. BUDZIKIEWICZ u. K. TARAZ, Tetrahedron [London], im Druck.



Die vom Nährmedium (10 l) abzentrifugierten Algen wurden mit 1 l 40° warmem Methanol versetzt, 2 Stdn. im Dunkeln gerührt und nach Abfiltrieren der Methanollösung noch fünfmal mit Methanol-Aceton-Gemischen (1 : 1) in der Kälte extrahiert. Der aus den vereinigten Lösungen durch Einengen i. V. erhaltene Rückstand wurde in 100 ml Äther gelöst, mit 200 ml 10-proz. methanolischer KOH 1 Stde. im Dunkeln verseift und nach Versetzen mit der gleichen Menge Wasser fünfmal mit peroxidfreiem Äther extrahiert. Die Carotinoid-Pigmente konnten nach Waschen der Ätherlösung mit Wasser bis zur Alkalifreiheit, Trocknen über Na_2SO_4 und Einengen durch Plattenchromatographie (Kieselgel H/Ca(OH)₂ 98 : 2; Petroläther/Aceton 7 : 3 und anschließend basisches Al_2O_3 ; Benzol/Essigester 7 : 3)

² K. EGGER, H. NITSCHKE u. H. KLEINIG, Phytochemistry **8**, 1583 [1969].

³ H. STRANSKY u. A. HAGER, Arch. Mikrobiol. **71**, 164 [1970].

⁴ K. AITZEMÜLLER, W. A. SVEC, J. J. KATZ u. H. H. STRAIN, Chem. Comm. **1968**, 32.

⁵ A. HAGER u. H. STRANSKY, Arch. Mikrobiol. **73**, 77 [1970].

aufgetrennt werden. Diatoxanthin (aus Äther/Petrol-äther) besitzt auf Kieselgelplatten einen etwas größeren R_f -Wert als Diadinoxanthin, der etwa dem von Zeaxanthin entspricht².

Das EA-Spektrum von Diatoxanthin stimmt mit den Literaturangaben^{2,3} überein. Im IR-Spektrum (CCl_4 , 2 cm-Küvetten) tritt bei 2170 cm^{-1} die für Acetylen-carotinoide typische $\text{C}\equiv\text{C}$ -Bande auf^{4,6}. Das Massenspektrum zeigt im oberen Massenbereich, wie für Hydroxy-carotinoide erwartet⁷, neben M^\ominus (m/e 566, 100%), $M-2$ (m/e 564, 30%), $M-15$ (m/e 551, 15%), $M-18$ (m/e 548, 15%), $M-92$ (m/e 474, 10%), $M-106$ (m/e 460, 3%), was ebenso wie die Abwesenheit einer Farbreaktion beim Räuchern der Chromatographieplatten (Kieselgel) mit HCl das Vorliegen einer Epoxidstruktur ausschließt. Die Anwesenheit von 2 OH-Gruppen ist durch die Bildung eines Diacetates (Veresterung

mit Acetanhydrid/Pyridin analog zur Vorschrift von KARRER und JUCKER⁸) gesichert: M^\ominus bei m/e 650 begleitet von $M-60$, $M-92$ und $M-120$. Für die Struktur 2 spricht weiterhin das NMR-Spektrum, in dem das im Bereich der olefinischen Protonen bei höchstem Feld auftretende Signal (bei nicht-acetylenischen Carotinoiden den C-7-, C-7'-, C-8- und C-8'-Protonen zugeschrieben⁹) nur die halbe Intensität wie bei Zeaxanthin (2 mit 7.8-Doppelbindung) aufweist, während zusätzliche Signale bei tieferen Feldern (wahrscheinlich für die Protonen im C-10–C-12-Bereich in Nachbarschaft zur Acetylenbindung) auftreten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchten wir für finanzielle Unterstützung, Herrn Prof. Dr. A. BETZ und Fräulein Dipl.-Biol. U. SCHWENKER für ihre Unterstützung bei der Anzucht der Algen bestens danken.

⁶ A. K. MALLAMS, E. S. WAIGHT u. B. C. L. WEEDON, Chem. Comm. **1967**, 301.

⁷ H. BUDZIKIEWICZ, H. BRZEZINKA u. B. JOHANNES, Mh. Chem. **101**, 579 [1970].

⁸ P. KARRER u. E. JUCKER, Helv. chim. Acta **28**, 300 [1945].

⁹ U. SCHWIETER, G. ENGLERT, N. RIGASSI u. W. VETTER, Pure appl. Chem. **20**, 365 [1969].

Molecular Weight of Polypeptides of the Thylakoid Membrane

WILHELM MENKE und ELISABETH SCHÖLZEL

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung
(Erwin-Baur-Institut), Köln 30

(Z. Naturforsch. **26 b**, 378–379 [1971]; received January 25, 1971)

According to SHAPIRO, VIÑUELA, and MAIZEL¹, the relative electrophoretic mobility of polypeptides in a sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel is inversely proportional to the logarithm of the molecular weight. The validity of this relationship has been confirmed by WEBER and OSBORN², and by DUNKER and RUECKERT³ for a large number of proteins. SMITH and SMITH and PICKELS have reported almost 30 years ago, that the lamellar system of chloroplasts can be dissolved in water in the presence of dodecylsulfate⁴. As this dissolved lamellar system can be separated by gel electrophoresis into a number of different compounds⁵, it appears possible to determine the molecular weight of the polypeptides which build up the thylakoid membrane, using this method.

Materials and Methods

Stroma-freed chloroplasts were prepared from leaves of *Antirrhinum majus* strain 50, as described pre-

viously⁶. For the preparation of protein solutions and the technique of gel electrophoresis the procedure of WEBER and OSBORN² was followed. Preferentially, the 10% polyacrylamide gel was used. Fixation was carried out overnight in 20% sulfosalicylic acid and staining with 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250. The excess dye was removed electrophoretically in 5% acetic acid. The distance of the polypeptide bands from the starting point was determined by means of a simple device which allows a paralaxfree measurement with an accuracy of 0.1 mm. The determination of the molecular weight M was carried out according to the relationship

$$\log M = a \cdot s + b$$

where s is the distance of the center of a given band from the starting point. For the determination of a and b the following proteins were used: bovine serum albumin (cryst.) $M = 68\,000$ (Mann Res. Lab.), ovalbumin, 2 x cryst. $M = 43\,000$ (Mann Res. Lab.), chymotrypsinogen A (beef pancreas) 6 x cryst., $M = 25\,700$ (Mann Res. Lab.), myoglobin (sperm whale cryst.) $M = 17\,200$ (Mann Res. Lab.) and lysozyme 3 x cryst. $M = 14\,300$ (Serva). The relative mobility was obtained by determining the real distance of a band from the starting point in relation to the distance of the myoglobin band from the starting point. The chloroplast peptides were referred to myoglobin in the same

Reprints request to Prof. Dr. MENKE, MPI f. Züchtungsforschung, Abt. Menke, D-5000 Köln-Vogelsang (30).

¹ A. L. SHAPIRO, E. VIÑUELA, and J. V. MAIZEL, JR., Biochem. biophysic. Res. Commun. **28**, 815 [1967].

² K. WEBER and M. OSBORN, J. biol. Chemistry **244**, 4406 [1969].

³ A. K. DUNKER and R. R. RUECKERT, J. biol. Chemistry **244**, 5074 [1969].

⁴ E. L. SMITH, J. gen. Physiol. **24**, 583 [1941]; E. L. SMITH and E. PICKELS, **24**, 753 [1941].

⁵ C. SIRONVAL, H. CLIJSTERS, J. M. MICHEL, R. BRONCHART, and R. M. MICHEL-WOLWERTZ, in: Currents in Photosynthesis, p. 111, Ed. J. B. THOMAS and J. C. GOEDHEER, AD. Donker, Rotterdam 1966.

⁶ W. MENKE, Z. Naturforsch. **25 b**, 849 [1970].

way. If *a* and *b* are calculated following the least squares criterion, *a* was found to be -0.82475 and *b* 5.06961 . In every experiment 4 gels with reference proteins and 4 gels with chloroplast preparations were run electrophoretically at the same time.

Results

The electropherograms of the chloroplast preparations show only one coloured band, which lies in front of the polypeptide band with the lowest molecular weight (11 000), but which sometimes may cover this band. This result does not agree with the finding of SIRONVAL *et al.*⁵, who obtained several coloured bands, in some of which proteins could be detected. In contrast to this, a separation of chloroplast pigments and probably of the colorless lipids from the polypeptides is obtained with this method. This separation of lipids from the protein is the prerequisite for the determination of exact molecular weights.

With Coomassie Blue, 14 bands are visible (Fig. 1). Two of these are rather intense and correspond to polypeptides with molecular weights 66 000 and 24 000 respectively. The latter band is rather broad and may

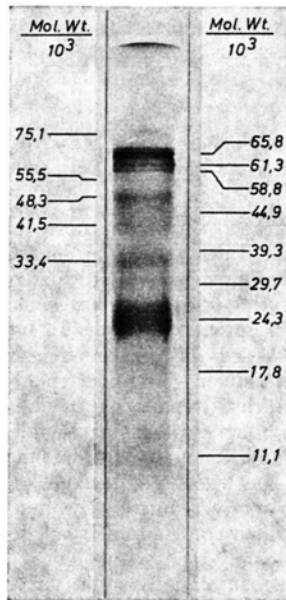


Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate electrophoresis of thylakoid polypeptide chains. The molecular weights are averages of several experiments. The last position of the given values is uncertain.

show a tendency towards splitting into two bands. The band with a molecular weight of 66 000 is followed by two very narrow but intensely coloured bands, to which molecular weights of 61 000 and 59 000 can be attri-

buted. These are followed by an equally narrow but very weak band of polypeptides with a molecular weight of 55 500. Polypeptides with molecular weights of 48 000 and 33 000, which show medium strength bands, are found still in relatively high amounts. Polypeptides with molecular weights of 75 000, 41 500, 39 000 and 30 000 are present in low or very low concentration and can only be detected if a sufficient amount of the chloroplast preparation is used. In particular we wish to draw attention to two fast running broad, but weak bands, which correspond to polypeptides with molecular weights of approximately 18 000 and 11 000. The band with molecular weight 18 000 sometimes splits into two bands.

From these experiments it can be concluded that at least 16 polypeptides with different molecular weights are contributing to the composition of the thylakoid membrane. From these, two or three polypeptides are present in high concentrations, 4 are in medium and the remainder in low concentrations. It must be borne in mind that a not insignificant part of the polypeptides penetrates very little into the gel or not at all. Whether these are polypeptides with very high molecular weight or aggregated peptide chains requires further investigation. Furthermore it must be determined whether peptides with a molecular weight of less than 10 000 occur. The results presented herein contradict findings that the membrane proteins contain only one major component⁷. It confirms, however, the earlier suggestion, based on terminal amino acid determination that the lamellar structural protein contains a number of polypeptides: 10–13 amino- and carboxyl-terminal amino acids having been detected⁸. Using different systems of gel electrophoresis, a separation into several components has been observed by other authors^{5, 9}.

In conclusion the accuracy of the molecular weight values as determined by our method should be discussed. According to the literature, the molecular weights of proteins determined by gel electrophoresis in general deviate by less than 10% from those values determined by other methods. In our experiments differences of more than 10% were seldom observed. However, the reproducibility of our measurements was better by one order of magnitude. The measurements on 20 to 30 gels yielded a mean error of the average value of almost always less than 1 per cent. An uncertainty of the molecular weights presented in this paper, may be due to the fact that the polypeptides are associated with roughly equal amounts of lipids in the membrane. As long as we do not know whether these lipids are quantitatively separated from the polypeptides, the presented values must be considered to be apparent molecular weights.

We would like to thank Dr. G. SCHMID and Dr. G. A. CODD for assistance in the preparation of the manuscript.

⁷ R. S. CRIDDLE, in: *Biochemistry of Chloroplasts I*, p. 203, Ed. T. W. GOODWIN, Academic Press, London, New York 1966.

⁸ W. MENKE u. E. JORDAN, *Z. Naturforsch.* **14b**, 234 [1959].

⁹ J. L. BAILEY, J. P. THORNER, and A. G. WHYBORN, in: *Biochemistry of Chloroplasts I*, p. 243, Ed. T. W. GOODWIN, Academic Press, London, New York 1966; G. BRAUNITZER u. G. BAUER, *Naturwissenschaften* **54**, 70 [1967].