

Chemistry. — *Über die Chemie des Wuchsstoffs.* Von F. KÖGL und A. J. HAAGEN SMIT. (Communicated by Prof. F. A. F. C. WENT.)

(Communicated at the meeting of December 19, 1931.)

I.

Die Untersuchungen über das pflanzliche Wachstum haben in den letzten Jahren zu wichtigen neuen Erkenntnissen geführt. Es hat sich zeigen lassen, dass bei der Zellteilung und der Zellstreckung unbekannt chemische Stoffe eine massgebende Rolle spielen; diese Stoffe erinnern in mancher Hinsicht an die Hormone des Tierreichs. Am eingehendsten ist bisher die physiologische Wirkungsweise des Wuchsstoffs studiert worden, der den Anstoss zum Zellstreckungs-Wachstum gibt. Wenn man bis jetzt auch noch nicht mit vielen Pflanzenarten experimentiert hat, so steht doch bereits fest, dass der Wuchsstoff wohl sehr allgemein verbreitet und nicht spezifisch ist. Bei dem wichtigsten Untersuchungsobjekt, den Graskoleoptilen, hatte BOYSEN—JENSEN¹⁾ schon vor mehr als zwanzig Jahren die Existenz solcher Substanzen vermutet und von PAAL²⁾ konnte sie im Jahre 1919 bewiesen werden; durch die PAALSche Arbeit ergab sich vor allem auch der Zusammenhang zwischen den wachstumsfördernden Stoffen und den phototropischen Krümmungen. In der jüngsten Zeit sind aus dem Utrechter Botanischen Institut eine grosse Zahl wichtiger Arbeiten über den Wuchsstoff hervorgegangen; von diesen kommt der Untersuchung von F. W. WENT³⁾ insofern eine ganz besondere Bedeutung zu, als hier eine einfache und zuverlässige Methodik zur quantitativen Bestimmung des Wuchsstoffs entwickelt wurde. Die Methode besteht im wesentlichen darin, Wuchsstoff (z.B. aus Koleoptilspitzen) in Agar-Agar-Würfelchen diffundieren zu lassen. Diese werden dann nach einer hier nicht näher zu beschreibenden Arbeitsweise einseitig auf dekapitierte Koleoptilen aufgesetzt. Bei genügend grossen Verdünnungen ist die Ablenkung der Spitze proportional der Wuchsstoffmenge, sodass man durch eine einfache Winkelmessung am Schattenbild der Koleoptilen Rückschlüsse auf die Konzentrationen ziehen kann. Mit dieser Methodik hat F. W. WENT ein Testverfahren geschaffen, durch welches das Gebiet auch der chemischen Erforschung zugänglich wurde.

¹⁾ Ber. dtsch. bot. Ges. 28, 118 (1910).

²⁾ Ber. dtsch. bot. Ges. 32, 499 (1914); Jahrb. wiss. Bot. 58, 406 (1919).

³⁾ Rec. Trav. bot. néerl. 25, (1928). Dort auch die übrige Literatur; vgl. auch Lehrb. der Pflanzenphysiologie von S. KOSTYTSHEW und F. A. F. C. WENT; 2. Band, 1931, Berlin, Verl. J. SPRINGER.

II.

Die Arbeit, über welche hier berichtet wird, ist vor einem Jahre in Angriff genommen worden; es wäre nicht möglich gewesen, in dieser Zeit zu einem chemischen Ergebnis zu gelangen, wenn uns nicht Prof. F. A. F. C. WENT in entgegenkommender Weise mit der experimentellen Tradition seines Instituts bekannt gemacht hätte. Wir konnten die physiologischen Versuche in einem neu eingerichteten Dunkelraum des Utrechter botanischen Instituts durchführen und schulden auch hierfür besonderen Dank.

Bevor wir auf unsere Versuche zur Reindarstellung des Wuchsstoffs eingehen, müssen wir die Wuchsstoff-Einheit definieren, die wir unserer Arbeit zugrunde gelegt haben. Wir bezeichnen als Avena-Einheit (AE) jene Menge wirksamen Stoffes, die bei einer Temperatur von 22—23° und 92 % Feuchtigkeit unter den unten angegebenen Versuchsbedingungen innerhalb zwei Stunden die dekapitierte Koleoptile von *Avena sativa* um 10° krümmt, wenn der wirksame Stoff in einem Agar-Würfelchen von 2.0 cmm. einseitig auf diese dekapitierte Koleoptile aufgesetzt wird. Hierbei sind folgende Einzelheiten von Bedeutung:

1. Verwendet wurde SVALÖFS „Siegess“-Hafer; 1)
2. Die Körner wurden eine Stunde in Wasser geweicht und dann auf feuchtem Filtrierpapier im diffusen Tageslicht bei 23—24° zur Keimung angesetzt. Nach 24 Stunden sind die Keimlinge für die Wasserkultur bereit.
3. Die Agar-Agar-Würfelchen sind aus 3 %igem Agar-Agar bereitet; ihr Volumen ist $2 \times 2 \times 0.5$ cmm.
4. Die erste Dekapitation findet eine Stunde vor dem Versuch statt; kurz vor der eigentlichen Auswertung wird nach den Angaben von H. G. VAN DER WEY²⁾ neuerdings dekapitiert und das Agarwürfelchen aufgesetzt.

Als wir den Wuchsstoff weitgehend angereichert hatten, zeigten sich Schwierigkeiten bei den Auswertungen dieser Lösungen. Die Ursache wurde darin erkannt, dass diese Lösungen zu arm an Elektrolyten oder anderen gelösten Stoffen waren; hierdurch werden vielleicht die Zellen an der Schnittfläche geschädigt. Durch Zusatz von Kaliumchlorid (160 mg. KCl pro Liter) konnte diese Fehlerquelle behoben werden. Ferner hat es sich bewährt, bei diesen angereicherten Lösungen eine geringe Menge Essigsäure zuzusetzen (0.2 ccm. pro Liter).

III.

Wir mussten von vorneherein damit rechnen, dass in den Spitzen von Hafer- und Maiskoleoptilen nur äusserst geringe Wuchsstoffmengen

1) Wir haben für die Ueberlassung des Materials Herrn Dr. ÅKERMANN zu danken.

2) Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam 34, 880 (1931).

hervorgebracht werden, sodass dieses Material für eine chemische Untersuchung schwerlich als Ausgangsprodukt dienen konnte. In einer Arbeit von NIELS NIELSEN¹⁾ ist jedoch ein neues Ausgangsmaterial beschrieben worden; die Pilze *Rhizopus suinus* Nielsen und *Absidia ramosa* geben an die Nährlösungen Wuchsstoff — oder Wuchsstoffe — ab. Der Autor machte ferner die wichtige Feststellung, dass „Rhizopin“ in Wasser, Äther, Alkohol und Aceton löslich ist; es wurde auch bereits ein Präparat erhalten, das 7000 fach angereichert war. Wir konnten die Ergebnisse NIELSENS bestätigen und ferner auch bei *Rhizopus*²⁾ *Delemar* (Boid.) Wehm. et Hanz., *Rh. nigricans* Ehrenberg, *Rh. reflexus* Bainier, *Rh. tritici* Saïto die Bildung wachstumsfördernder Stoffe nachweisen. Wir haben vor allem mit *Rh. reflexus* gearbeitet, den wir auf Sand kultivierten, der mit den üblichen Nährlösungen befeuchtet war. Auch in Kulturen von *Bacillus coli* und im Waschwasser von gewöhnlicher Bäckerhefe haben wir ziemlich grosse Wuchsstoffmengen angetroffen. In der Zwischenzeit hat BOYSEN—JENSEN³⁾ die Bildung von „Wachstums-Regulatoren“ bei *Aspergillus niger* und bei zahlreichen Bakterien beschrieben und NIELS NIELSEN⁴⁾ hat schon vorher Wuchsstoffproduktion bei der Hefe festgestellt, sodass unsere hier mitgeteilten Befunde nur eine Bestätigung darstellen.

Wir hatten mit Versuchen begonnen, uns grössere Mengen der Kulturflüssigkeiten von *Rhizopus reflexus* und *Bacillus coli* zu verschaffen, als wir in der Schlempe ein viel leichter zugängliches Ausgangsmaterial fanden. Trotzdem die Anreicherung des Wuchsstoffs aus diesen Materialien gute Fortschritte machte, haben wir die weiteren Versuche hiermit für später zurückgestellt, da wir bald darauf im Harn eine Wuchsstoffquelle fanden, die bei weitem am ergiebigsten war. Dies zeigt sich in folgender Zusammenstellung, bei welcher der Wuchsstoffgehalt pro mg. Trockengewicht angegeben ist:

Diffusionsprodukt aus Maisspitzen ⁵⁾	ca 300	AE pro mg
<i>Rhizopus reflexus</i>	40—110	„ „ „
Bäckerhefe	30—40	„ „ „
<i>Bacillus coli</i>	ca 50	„ „ „
Menschliche Faeces	5—10	„ „ „
Menschen-Harn ⁶⁾	ca 400	„ „ „

1) Jahrb. f. wiss. Bot.; herausgeb. v. H. FITTING 73, 189 (1930).

2) Für die freundliche Ueberlassung der *Rhizopus*kulturen haben wir Frl. Prof. Dr. JOH. WESTERDIJK, Baarn, sehr zu danken.

3) Biochem. Zeitschr. 236, 205; 239, 243 (1931).

4) Biochem. Zeitschr. 237, 244 (1931).

5) Für die freundliche Uebersendung grösserer Mengen Mais haben wir der „Landbouwkundige Onderafdeeling van het algemeen Proefstation voor den Landbouw“ in Buitenzorg und der „Proefstation“ in Paramaribo (Suriname) sehr zu danken.

6) In letzter Zeit wurde bei pathologischen Fällen ein Gehalt bis zu 2600 AE pro mg festgestellt; hierauf, sowie auf die Verhältnisse bei der Schwangerschaft werden wir demnächst zurückkommen.

Schon E. SEUBERT¹⁾ hatte gefunden, dass menschlicher Speichel eine geringe Menge Wuchsstoff enthält und BOYSEN—JENSEN²⁾ wies kürzlich nach, dass die Speichelbakterien Wuchsstoff produzieren. Es ist möglich, dass der Wuchsstoff des normalen Harns durch die Darmbakterien hervorgebracht wird; über diese Frage sind Versuche im Gange. Man kann natürlich daran zweifeln, ob die wachstumsfördernden Stoffe aus diesen verschiedenen Ausgangsmaterialien miteinander identisch sind. Auf jeden Fall halten wir es zur Zeit für wahrscheinlich, dass es sich zum mindesten um eine Gruppe von nahe verwandten Stoffen³⁾ handelt. Soweit wir die Anreicherung des Wuchsstoffs bei den verschiedenen Ausgangsmaterialien bereits durchgeführt haben, hat sich nämlich kein Unterschied in den chemischen Eigenschaften des aktiven Prinzips gezeigt. Es lässt sich aus sauren Lösungen mit organischen Lösungsmitteln, wie peroxydfreiem Äther oder Butylalkohol, extrahieren. Aus diesen Extrakten kann es mit verdünnter Natriumbicarbonatlösung ausgeschüttelt und nach dem Ansäuern mit Essigsäure wieder in Äther übergeführt werden. Der wirksame Stoff zeigt also das Verhalten einer Säure.

IV.

Aus praktischen Gründen haben wir für die weitere Arbeit Wuchsstoff aus Schwangerenharn verwendet, da die Bicarbonatfraktion hieraus in der Technik als Nebenprodukt bei der Darstellung der Sexualhormone anfällt. Wir sind der I. G. Farbenindustrie A. G., Werk Elberfeld, für die freundliche Bereitstellung dieses Ausgangsmaterials sehr zu Dank verpflichtet.

Das aus den Bicarbonatauszügen durch Ansäuern und Ausäthern zu gewinnende Rohprodukt lässt sich nun durch Extraktion mit siedendem Petroläther und Ligroin von etwa $\frac{4}{5}$ der unwirksamen Begleitstoffe befreien. Der in Ligroin unlösliche Rückstand, welcher bereits pro mg 130.000 AE enthält, wird nun in wässrigem Alkohol aufgenommen und wiederholt mit Benzol ausgeschüttelt. Der Wuchsstoff bleibt in der wässrig-alkoholischen Phase. Die weitere Anreicherung gründen wir auf den sauren Charakter des Wuchsstoffes und zwar auf die fraktionierte Abscheidung eines in wässrigem Alkohol schwerlöslichen Bleiniederschlags. Aus diesen Niederschlägen lässt sich die wirksame Verbindung nach dem Ansäuern mit Essigsäure leicht durch Ausäthern zurückgewinnen. Die wirksamste Fraktion enthält nach dieser Aufarbeitung 1.000.000 AE pro mg. Hieran schliesst sich nun eine in ähnlicher Weise durchgeführte Fraktionierung der Calciumsalze, bei welcher vor allem einige gefärbte Begleitstoffe entfernt werden.

In diesem Stadium der Reindarstellung haben wir erst nach längerem Suchen dadurch weiteren Fortschritt erzielen können, dass wir das

¹⁾ Zeitschr. f. Bot. **17**, 49 (1925).

²⁾ Biochem. Zeitschr. **236**, 205 (1931).

³⁾ Da für die Verschiedenheit der aktiven Stoffe kein experimenteller Hinweis vorliegt, wollen wir vorläufig auch weiterhin von "dem Wuchsstoff" sprechen.

hochaktive wuchsstoffhaltige Öl mit siedendem Methanol behandeln, das einige Prozent Chlorwasserstoff enthielt. Beim Ausschütteln der Ätherlösung des Reaktionsproduktes mit Natriumbicarbonat- und Sodalösung blieb die Hauptmenge des aktiven Stoffes in der Neutralfraktion. Wie wir später festgestellt haben, ist der Wuchsstoff hierbei in eine Laktonform¹⁾ übergegangen, die bei der Auswertung an Avenakoleoptilen hochwirksam war (1.430.000 AE pro mg). Bei der Aufspaltung des Laktons wurde keine wesentliche Änderung der Aktivität beobachtet; diese Verhältnisse müssen aber — besonders in Zusammenhang mit dem pH der Versuchslösungen — noch genau untersucht werden.

Während die Hochvacuumdestillation vor der Laktonisierung zu erheblichen Verlusten an aktiver Substanz führte, war das neutrale Produkt mit gutem Erfolg im Hochvacuum zu fraktionieren. Eine bei 125—130° und 0.1 mm. destillierende Fraktion enthielt pro mg. mehr als 5.000.000 AE und war bereits grösstenteils krystallisiert; sie wurde zweimal aus wässrigem Aceton umkrystallisiert, wobei farblose Prismen vom Schmelzpunkt 172° (unkorr.) erhalten wurden. *Die Wirksamkeit betrug pro Gramm etwa 30.000.000.000 AE.* Bei einer zweiten Darstellung des Stoffes wurde dieselbe Aktivität festgestellt. Es ist also

$$1 \text{ AE} = \frac{1}{30.000.000} \text{ mg} = \frac{1}{30.000} \gamma.$$

An dieser Stelle möchten wir Frl. Dr. HANNI ERXLEBEN für die Mitarbeit bei den letzten Stufen der Reindarstellung und der folgenden analytischen Untersuchung danken. Wir hatten bisher etwa 10 mg. des krystallisierten Wuchsstoffs in Händen. Wir haben festgestellt, dass die Verbindung frei von Stickstoff, Schwefel²⁾ und Phosphor²⁾ ist.

Die Molekulargewichtsbestimmung in Campherlösung nach RAST ergab folgende Werte: 342, 353, 330. Diese Zahlen stimmen recht gut mit der Angabe von F. W. WENT überein, der aus der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Wuchsstoff der Avena-Spitzen ein Molekulargewicht von 376 errechnet hat.

Da bei der Behandlung mit chlorwasserstoffhaltigem Methylalkohol eine Veresterung unseres Produktes stattgefunden haben konnte, haben wir als nächste Analyse eine Mikro-Zeisel-Bestimmung durchgeführt. Diese ergab keinen Methoxyl-Gehalt; wir ziehen daraus den Schluss, dass in unserer Verbindung ein Lakton vorliegt.

Eine Mikro-C-H-Bestimmung³⁾ ergab folgende Werte:

4.849 mg. Subst.: 12.200 mg. CO₂; 4.410 mg. H₂O. Daraus berechnet sich: 68.62 % C, 10.18 % H und 21.20 % O.

Es ist natürlich eine viel grössere Zahl von Analysen erforderlich, um eine gesicherte Formel aufzustellen. Man darf jedoch wohl bereits den

¹⁾ Wir haben übrigens auch bei der Aufarbeitung des Wuchsstoffs aus Hefe einen Hinweis auf die Laktonisierbarkeit des aktiven Stoffes bekommen.

²⁾ An krystallisiertem Rohprodukt geprüft.

³⁾ Ausgeführt von Dr. Ing. A. SCHOELLER, Berlin-Schmargendorf.

Schluss ziehen, dass der Wuchsstoff wegen seines hohen Wasserstoffgehalts nicht aromatisch ist, sondern den aliphatischen Verbindungen nahestehen wird.

V.

Wir schlagen für den Wuchsstoff die Bezeichnung *Auxin* (von $\alpha\upsilon\acute{\xi}\acute{\alpha}\nu\omega$ wachsen machen) vor, wobei es sich zur leichteren Namenbildung bei Derivaten empfehlen wird, hierunter die zugrundeliegende freie Säure zu verstehen. Im *Auxin* liegt der erste Stoff einer Gruppe vor, für deren Vertreter in der botanischen Literatur bisher die Bezeichnungen Korrelations-träger, Regulatoren und Hormone nebeneinander gebraucht werden. Es erscheint zweckmässig, diese Verbindungen, zu denen neben dem *Auxin* auch Zellteilungshormone, Blüten- und Wurzelbildung anregende Stoffe u. s. f. gehören, mit einer einheitlichen Bezeichnung zusammenzufassen. Im Einvernehmen mit Prof. WENT möchten wir hierfür den Begriff *Phytohormone* in Vorschlag bringen. Hiermit wird auf die Analogie zu den auch chemisch bereits besser bekannten „*Zoohormonen*“ hingewiesen, ohne dass die für das Tierreich geltenden Verhältnisse zwangsläufig und unbesehen auf das Pflanzenreich übertragen werden müssen.

In diesem Zusammenhang sei auf eine vor kurzem erschienene Mitteilung von W. SCHOELLER¹⁾ und H. GOEBEL über die Wirkung des Follikelhormons auf Pflanzen hingewiesen. Diese Autoren haben gefunden, dass bei der Wasserkultur von Hyazinthen- und Küchenzwiebeln der Zusatz von technischem *Progynon* eine deutliche Beschleunigung von Wachstum und Blütenbildung²⁾ hervorruft. Bei Versuchen mit krystallisiertem *Oestrin* war eine entsprechende Wirkung zu beobachten, die jedoch, wie die Bilder der Abhandlung zeigen, erheblich geringer blieb. — Wir haben gefunden, dass die *Progynon*-Ampullen des Handels in der Tat einen Stoff enthalten, der auch auf die dekapitierte *Avena*-Koleoptile wachstumsbeschleunigend wirkt; er ist — wie *Auxin* — bicarbonatlöslich. Ein Präparat von PARKE—DAVIS, das nach Angabe dieser Firma im ccm. 50 Ratten-Einheiten krystallisierten Follikelhormons *Theelin* enthält, war bei *Avena*-Koleoptilen völlig wirkungslos. Es wird deshalb nötig sein, die Wuchswirkung der reinsten krystallisierten Stoffe miteinander zu vergleichen.

Es ist möglich, dass *Auxin* als physiologisch definierter, aber chemisch unbekannter Faktor in der Literatur in anderem Zusammenhang bereits beschrieben ist. Wir hoffen zu verschiedenen Fragen, die sich aus unseren Befunden ergeben, z.B. auch über Bedeutung und Wirkung des *Auxins* im Tierkörper, bald Stellung nehmen zu können. Die ausführliche Mitteilung und die Versuchsprotokolle werden an anderer Stelle veröffentlicht werden.

Utrecht, Dezember 1931.

Organisch-Chemisches Laboratorium.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 240, 1 (1931).

²⁾ Auch bei Kulturen von Mais wurden ähnliche Beobachtungen gemacht.