

Ein verbessertes Verfahren zur Isolierung und quantitativen Bestimmung von Vincaleukoblastin aus intakten Pflanzen und Gewebekulturen von *Catharanthus roseus* G. DON.

An Improved Method of Isolation and Quantitative Determination of Vincleucoblastine from Intact Plants and Tissue Cultures of *Catharanthus roseus* G. DON.

W. Hofmann, K.-H. Kubeczka und Franz-C. Czygan

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität, Mittlerer Dallenbergweg 64, D-8700 Würzburg

Z. Naturforsch. **38 c**, 201–206 (1983); received December 28, 1982

Catharanthus roseus, Vincleucoblastine, TLC-Scanning, Plant Cell and Tissue Cultures

Improved methods of extracting vincleucoblastin from leaves and tissue cultures of *Catharanthus roseus* and of the quantitative determination of this dimeric indole-alkaloid by reflectance densitometry of TLC-plates have been established. Approximately 0.05% VLB were found in the leaves and, using high-performance-thin-layer-chromatography, 0.00013% VLB in callus cultures (not in suspension cultures!) derived from this plant.

Einleitung

Das als Zytostatikum u. a. bei Morbus Hodgkin in Form des Sulfats eingesetzte dimere Indol-Alkaloid Vincleukoblastin (= VLB) [1] wird ausschließlich aus dem Kraut der Apocynacee *Catharanthus roseus* G. DON. isoliert (vgl. 2). VLB kommt (zusammen mit dem ebenfalls onkolytisch genutzten Leurocristin) nur in sehr geringen Konzentrationen (ca. 0,005% berechnet auf die Trockenmasse der Pflanze) neben etwa 90 weiteren monomeren und dimeren Indol-Alkaloiden in *Catharanthus* vor. Es ist daher von Interesse, Verfahren zu entwickeln, die es erlauben, zum einen VLB möglichst vollständig aus wenig Pflanzenmaterial zu isolieren, zum anderen aber möglichst genau quantitativ zu bestimmen. Das ist besonders wichtig für Serienuntersuchungen zur Selektion von Hochleistungspflanzen. Es liegt nahe, auch hier den derzeit von einigen Laboratorien zur Bestimmung geringster Mengen von Sekundärstoffen genutzten Radio-Immuno-Assay einzusetzen [3]. Allerdings kann sich – bedingt durch den hohen technischen Aufwand – nicht jedes Laboratorium dieses Verfahrens bedienen, zumal wenn es sich nur um eine überschaubare Zahl von Einzelanalysen handelt.

Im Rahmen einer Dissertation [4] wurde ein Extraktionsverfahren entwickelt, das ausgehend von den Angaben von Masoud *et al.* [5] aufgebaut wurde, jedoch die Ausbeute an VLB um etwa das 15-fache

steigerte. Zusätzlich wurde eine Bestimmungsmethode erarbeitet, die die Quantifizierung von ca. 0,5 µg VLB je g Trockensubstanz erlaubt. Diese Verfahren wurden zunächst zur Bestimmung von VLB in Pflanzenmaterial von *Catharanthus roseus* genutzt und später in modifizierter Form auch für die Analyse von entsprechenden Zell- und Gewebekulturen verwendet. Über methodische Einzelheiten und über Analysenergebnisse soll im folgenden berichtet werden.

Experimenteller Teil und Ergebnisse

a) Bestimmung von VLB in Blättern von *Catharanthus roseus*

Aufarbeitung der Blätter

1 g gefriergetrocknete, pulverisierte Blätter von *Catharanthus roseus* werden mit insgesamt 50 ml einer Mischung von 2-prozentiger Weinsäurelösung und Methanol (2+3) versetzt, mit einem Magnet-rührer gerührt und danach durch eine Glasfritte (G3) filtriert. Der Rückstand wird mit weiteren 50 ml der gleichen Weinsäure/Methanol-Lösung erneut extrahiert und abermals filtriert. Die vereinigte Extraktionsflüssigkeiten werden am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck auf ca. 30 ml eingengt und die erhaltene trübe Flüssigkeit durch eine Glasfritte direkt in einen Scheidetrichter überführt. Kolben und Fritte werden mit wenigen Millilitern 2-prozentiger Weinsäurelösung nachgewaschen. Das erhaltene Filtrat wird zur Reinigung mit 40 ml

Dichloräthan ausgeschüttelt, diese organische Phase verworfen, dann mit 25-prozentiger Ammoniaklösung auf einen pH von 5,2 eingestellt und viermal mit 40 ml Dichloräthan extrahiert. Die über Natriumsulfat getrockneten, vereinigten Dichloräthanfraktionen werden am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Der so erhaltene – mit VLB angereicherte – Extrakt rückstand wird nach Lösen in Toluol quantitativ in einen 1-ml-Meßkolben überführt und dient als 1 ml Maßlösung zur Bestimmung des VLB-Gehaltes.

Herstellung der Eichlösung

11,21 mg VLB-Sulfat der Firma Eli Lilly, Indianapolis, (entsprechend 10 mg freier VLB-Base) werden in einem Scheidetrichter in wenigen ml destillierten Wassers gelöst und nach Alkalisieren mit Ammoniaklösung mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten, über Natriumsulfat getrockneten Chloroformfraktionen werden unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht und der Rückstand in 5 ml Toluol gelöst. Durch Verdünnen dieser Stammlösung erhält man die Vergleichslösungen zum Aufstellen der VLB-Eichgerade. Die Stammlösung wird so verdünnt, daß VLB-Konzentrationen im Bereich von 0,5–2,0 µg/µl resultieren. Das Auftragsvolumen beträgt 2 µl. Die Lösungen sind gekühlt (4 °C) mindestens 2 Wochen lang verwendbar.

Chromatographische Bedingungen

Der mit VLB angereicherte Alkaloidextrakt wird auf Kieselgel-Fertigplatten (Kieselgel 60 F 254; Nr. 5554, Fa. Merck) chromatographiert. Dabei werden Extraktvolumina von 3–6 µl als 3 mm langer Strich mit dem DC-Autoliner Typ TLC 2 (Fa. ICN) halbautomatisch auf die Dünnschicht aufgetragen. Die Entwicklung erfolgt mit den Fließmitteln Chloroform/Methanol (98+2) und nach Zwischentrocknung mit Chloroform/Methanol (97+3).

Absorptionsspektrum von VLB in Remission

Um bei der Absorptionsmessung ein möglichst großes Meßsignal zu erhalten, muß auch bei *in situ* Bestimmungen die Messung bei der Wellenlänge eines Absorptionsmaximums der entsprechenden Substanz durchgeführt werden. Da die Lage eines Absorptionsmaximums einer an Kieselgel sorbierten Substanz durch die Sorbens beeinflusst werden kann

[6, 7], wurde eine Absorptionskurve von Vincaleukoblastin auf Kieselgel 60 in Remission aufgenommen. Abb. 1 zeigt, daß das (kürzerwellige) Absorptionsmaximum gegenüber einer methanolischen Lösung (Abb. 2) um 4 nm bathochrom verschoben ist und hier bei 218 nm liegt.

Messung und Auswertung

Die quantitative *in situ* Bestimmung des Vincaleukoblastins wird mit dem Spektralphotometer der Firma C. Zeiss in Verbindung mit dem Z-Scanner (CAMAG) vorgenommen. Vor dem eigentlichen Scannen erfolgt die exakte Positionierung des jeweiligen DC-Flecks im Meßstrahl. Die einzelnen Meßbahnen werden vom Start in Richtung Fließmittelfront in der Meßanordnung Monochromator-Probe-Empfänger vermessen. Die Registrierwellenlänge beträgt 218 nm, die Spaltgröße 6×0,5 mm und die Meß-Geschwindigkeit 40 mm/min. Die Peakflächenbestimmung erfolgt nach der Näherungsmethode Höhe × Breite in halber Höhe. Mit den errechneten Peakflächen der verschiedenen VLB-Standardkonzentrationen wird eine Eichgerade erstellt, indem die Flächenintegrale gegen die entsprechenden Substanzmengen aufgetragen werden.

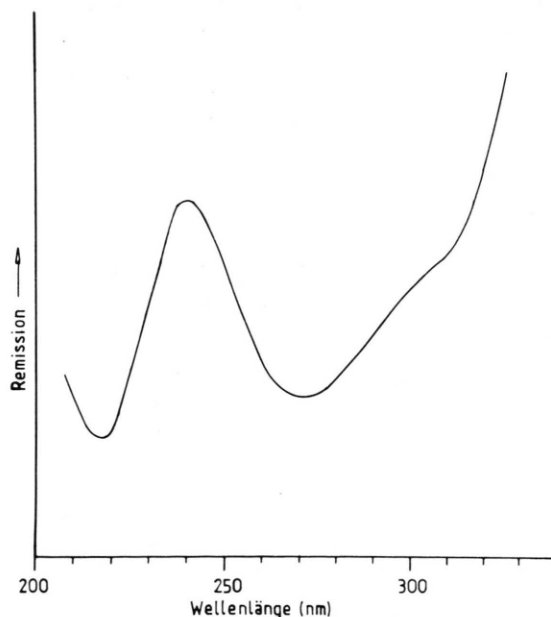


Abb. 1. Absorptionsspektrum von Vincaleukoblastin in Remission aufgenommen relativ gegen den Plattenuntergrund mit dem PMQ 2 (C. Zeiss) in Verbindung mit dem Z-Scanner (CAMAG).

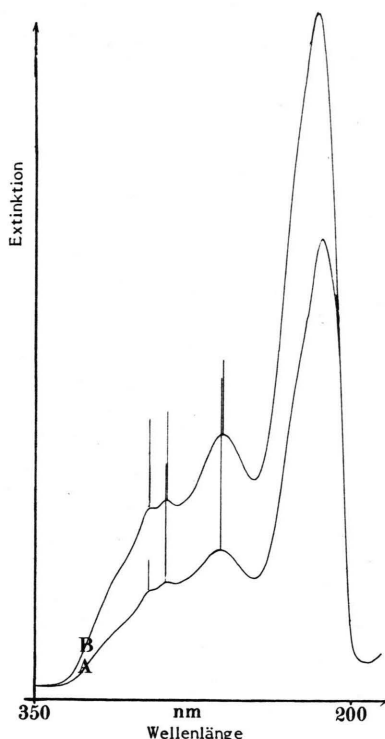


Abb. 2. UV-Spektren von aus Kalluskulturen von *Catharanthus roseus* isoliertem (untere Kurve: A) und authentischem (obere Kurve: B) Vincaleukoblastin. Maxima: 214, 259, 288, 296 nm. Aufnahmebedingungen: Gerät: DMR 21 (Fa. C. Zeiss); Registriergeschwindigkeit: 6 min/Trommelumdrehung; Registrierdispersion: $1 \text{ mm} \cong 1 \text{ nm}$; Extinktionsbereich: 0–1; Meßbereich 350–190 nm; Küvetten: 1 cm Quarz, Halbmikro MT4; Lösungsmittel: Methanol (UVASOL).

Identitätsnachweis des Vincaleukoblastins

Die Einführung einer neuen Extraktionsmethode für Vincaleukoblastin machte eine exakte Identifizierung der zunächst anhand relativ unspezifischer R_f -Wert- und Farbreaktionsvergleiche [8] als VLB angesehenen Substanz notwendig. Dazu wurden von der in Frage stehenden Substanz, die nach der vorgestellten Methode extrahiert und abgetrennt worden war, nach Elution mit einer Mischung von Methanol/Dichloräthan (1+4) vom Sorbens, UV-IR- und EI-MS-Spektren aufgenommen. Zum Vergleich wurde authentisches Vincaleukoblastin (Velbe, Fa. Eli Lilly, Indianapolis) dem gleichen Aufarbeitungsprozeß unterworfen und unter identischen apparativen Bedingungen vermessen. Die auf diese Weise erhaltenen Spektren stimmen untereinander und auch mit entsprechenden Literaturangaben überein [9–12].

VLB-Bestimmung in Blättern von *Catharanthus roseus*

Die nach dem hier geschilderten Verfahren extrahierte und bestimmte VLB-Menge betrug in den Blättern der von uns verwendeten *Catharanthus*-Pflanzen im Durchschnitt von 9 Einzelbestimmungen $518 \mu\text{g}$ VLB je 1 g Trockensubstanz.

b) Bestimmung von Vincaleukoblastin in Zellkulturen

Aufarbeitung der Zellkulturen

2 g gefriergetrocknetes, pulverisiertes Gewebe (zur Anlage und Anzucht der Gewebe vgl. [4]) werden zunächst wie die Blätter von *Catharanthus roseus* extrahiert.

Chromatographische Bedingungen

Der Extraktückstand wird in wenigen μl Chloroform aufgenommen und quantitativ als 35 mm langer Strich mit dem DC-Autoliner (Fa. ICN) auf eine 10 cm breite und 5 cm hohe HPTLC-Platte mit Kieselgel 60 F 254 (Merck Nr. 5628) aufgetragen. In gleicher Weise erfolgt daneben der 35 mm lange, strichförmige Auftrag einer VLB-Vergleichslösung. Die Platte wird nacheinander in den Fließmittelgemischen Chloroform/Methanol (98+2) und nach Zwischentrocknung in Chloroform/Methanol (97+3) jeweils bis zum oberen Rand entwickelt. Auf der Bahn der Analysenprobe wird eine entsprechend große Zone, die auf gleicher Höhe wie die VLB-Referenzbande liegt, markiert, von der Glasplatte abgetragen und eluiert.

Elution erfolgt in einem 60 mm langen ausgezogenen Glasrohr von 3 mm Innendurchmesser, das am oberen Ende trichterförmig erweitert ist. Um ein Durchlaufen von feinen Adsorbenspartikeln beim Elutionsvorgang zu verhindern, füllt man über den locker eingepreßten Wattepropf in der Spitze der Glassäule zusätzlich noch eine ca. 5 mm hohe Schicht von geglähtem Seesand [13]. Es wird dreimal mit 0,3 ml einer Mischung aus Methanol und Dichloräthan (1+4) desorbiert. Als Vorlage dient ein kleines Reagenzglas (NS 10/19, $10 \times 60 \text{ mm}$), dessen Boden kegelförmig ausgezogen ist und ein Fassungsvermögen von etwa $10 \mu\text{l}$ besitzt. Das Elutionsmittel wird in diesem Gefäß unter vermindertem Druck vollständig entfernt.

Zur Quantifizierung wird der Rückstand in genau $10 \mu\text{l}$ Toluol aufgenommen. Von dieser Lösung wer-

den zweimal 1,0 µl und zweimal 1,5 µl punktförmig auf der Längsseite einer 100×50 mm großen HPTLC-Platte (Kieselgel 60 F 254; Merck 5628) abwechselnd mit einer Vergleichslösung aufgetragen. Die Reihenfolge des Auftrags von Standard- und Extraktlösungen richtet sich dabei nach einem Vorschlag von Bethke [14], der von Hetzel [15] für die HPTLC-Platte modifiziert wurde (*Data-Pair-Technik*). Durch diesen Applikationsmodus werden eventuelle Variationen der chromatographischen Parameter innerhalb einer Platte gemittelt, was zu einer höheren Genauigkeit der quantitativen Bestimmung führt. Die so vorbereitete HPTLC-Platte wird zweimal in dem Fließmittelgemisch Chloroform/Methanol (97+3) bis zum oberen Rand entwickelt. Nach dem Entfernen des Fließmittels erfolgt die *in situ* Bestimmung des Vincaleukoblastins.

Messung und Auswertung

Die HPTLC-Platte wird entsprechend den Angaben im Abschnitt „Messung und Auswertung“ (s. Seite 202) bei Verringerung der Spaltgröße auf 2,5×0,5 mm vermessen und ausgewertet.

Herstellen der VLB-Vergleichslösungen für die HPTLC-Platte

Zur Aufstellung der Eichgeraden werden die gleichen VLB-Standardlösungen eingesetzt, wie sie für die Bestimmung von VLB in Blättern (auf einer konventionellen DC-Platte) hergestellt und verwendet werden. Das Auftragsvolumen auf die HPTLC-Platte beträgt allerdings nur 200 nL, wodurch eine Eichgerade im Bereich von 100–400 ng VLB/DC-Fleck erhalten wird.

VLB-Bestimmung in Geweben von *Catharanthus roseus*.

Das nach dem soeben geschilderten Verfahren aus Kallus-Kulturen extrahierte VLB war dünnschichtchromatographisch und in seinem UV-Spektrum (Abb. 2) mit authentischer Substanz identisch. Der Gehalt in den Geweben betrug 1,3 µg VLB je g Trockensubstanz. In den Suspensionskulturen war weder in den Zellen noch im Kulturmedium VLB nachzuweisen.

Diskussion

Die quantitative Analyse von VLB in *Catharanthus roseus*-Zellkulturen erfordert eine Methode, die

eine Untersuchung sehr geringer Probenmengen ermöglicht. Voraussetzung für eine quantitative Erfassbarkeit ist eine gute Abtrennung des VLB von den ca. 90 anderen *Catharanthus*-Alkaloiden und weiteren „nichtalkaloidischen“ Begleitsubstanzen. Wünschenswert ist weiterhin eine schnelle Durchführbarkeit der Analyse bei möglichst geringem technischem Aufwand. Bei der Komplexität des Alkaloidgemisches in *Catharanthus roseus* und den geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen, ist eine Lösung des Problems unter den vorausgestellten Bedingungen nur mit Hilfe moderner chromatographischer Methoden möglich. Der Einsatz der Gaschromatographie erwies sich aufgrund der hohen Molekulargewichte und der Labilität der in Frage stehenden Verbindungen als wenig erfolgreich. Von den verbleibenden wichtigen chromatographischen Trennmethoden, wie der Säulenchromatographie und der Dünnschichtchromatographie wurde letzterer wegen der zu erwartenden größeren Analysenzahlen der Vorzug gegeben. Eine entsprechende Analysenmethode, die bereits mit relativ geringen Mengen Pflanzenmaterial auskommt und auf einer zweidimensionalen Trennung der Alkaloide mit anschließender Elution des Vincaleukoblastins und photometrischer Messung desselben beruht, wurde von Masoud [5] beschrieben. Untersuchungen von anderen Autoren [16], sowie eigene Experimente zeigten aber, daß neben der sehr zeitraubenden Extraktion und Vorreinigung der Alkaloide diese DC-Trennung unzureichend ist. Nach Entwicklung einer einfacheren, für VLB jedoch selektiveren Extraktions- und Vorreinigungsmethode, konnten mit ebenfalls modifizierten chromatographischen Bedingungen – in Verbindung mit einer *in situ* Messung in Remission – in Blättern von *Catharanthus roseus* etwa 500 µg VLB/g Trockensubstanz nachgewiesen werden: demgegenüber nach Masoud *et al.* [5] nur ca. 30 µg/g Trockensubstanz. Der entscheidende Grund für diese höheren Ausbeuten ist wohl in der besseren Löslichkeit des VLB-Salzes in der methanolischen Phase gegenüber der organischen (Masoud *et al.* [5] verwendeten Benzol) zu suchen.

Versuche zur Quantifizierung von VLB in Zellkulturen von *Catharanthus roseus* zeigten zunächst, daß die Konzentrationen der von Geweben synthetisierten Alkaloide erheblich unter denen der intakten Pflanzen lagen. Durch das noch ungünstigere Verhältnis „nichtalkaloidischer“ Begleitsubstanzen zu den geringen Alkaloidkonzentrationen im Extrakt der Zell-

kulturen gegenüber Extrakten intakter Pflanzen wurde aber auch der sichere Nachweis geringster VLB-Mengen merklich erschwert. Eine Verbesserung im Sinne einer sicheren Identifizierung und Quantifizierung bei geringem Probe- und Zeitbedarf wurde durch Verwendung der HPTLC-Platte erreicht. Aufgrund der bereits erwähnten Trennschwierigkeiten muß der eigentlichen HPTLC-Trennung, die der quantitativen Bestimmung des Vincaläuboblastins dient, ein chromatographischer Reinigungs- bzw. Anreicherungsschritt vorgeschaltet werden. Dieser Vorgang muß wegen der geringen Alkaloid-Konzentrationen ebenfalls auf einer HPTLC-Platte erfolgen, da auf einer „normalen“ DC-Platte infolge der größeren Fleckendurchmesser die geringeren Alkaloidmengen unter die Erfassungsgrenze fallen. Nach Anreicherung des Vincaläuboblastins und erneuter Auftrennung des Eluats auf einer weiteren HPTLC-Platte konnte dann mit dieser Methodik in Oberflächenkulturen (nicht in Suspensionskulturen!) eines *Catharanthus*-Versuchsstammes durchschnittlich 1,3 µg VLB/g getrocknetes Gewebe (daher 1/400 der Konzentration intakter Pflanzen!) nachgewiesen werden.

Vorliegende Ergebnisse zeigen erstmals, daß Kalluskulturen von *Catharanthus roseus* nicht nur monomere Indol-Alkaloide (vgl. u. a. [17]), sondern auch dimere Indol-Indoline biosynthetisieren können. In früheren Versuchen [18] hielten wir zwar ebenfalls den Nachweis, daß Gewebe VLB produzieren kann, für erbracht. Allerdings wissen wir heute, daß wir aufgrund der damals nicht optimalen Abtrennung des VLB von anderen Alkaloiden, zu hohe VLB-Konzentrationen gemessen haben.

Von gleichem Interesse wie der Nachweis von VLB in Oberflächenkulturen ist auch die Beobach-

tung, daß in Suspensionskulturen oder im Nährmedium dieser Kulturen VLB *nicht* zu finden ist. Vermutlich entsprechen aus wenigen Zellen bestehende Aggregate eher Meristemen intakter Pflanzen, die Sekundärstoffe nicht oder nur in Spuren produzieren, als nicht völlig undifferenzierte Kalluskulturen. Hier findet eine Art Differenzierung in frische, junge meristematische und in ältere Zellen der stationären Phase statt. Letztere können in geringen Mengen VLB bilden. Andererseits ist anzunehmen, daß VLB (und andere onkolytische Alkaloide wie z. B. Leurocristin) auch auf Zellen von *Catharanthus roseus* selbst und nicht nur auf Zellen anderer Pflanzen (z. B. auf Wurzelspitzenzellen von *Hordeum sativum*, *Vicia faba* und *Nigella damascena* [19] oder auf Zwiebelzellen [20]) toxisch wirkt. Dies machen Untersuchungen über den mitotoxischen Effekt von 3',4'-Dehydrovinblastin und Leurocristin auf *Catharanthus*-Zellen [21] wahrscheinlich. Es werden daher in Suspensionskulturen VLB produzierende Zellen absterben oder in ihrer Teilungsfähigkeit gehemmt. So kommt es zur Selektion wenig oder gar nicht VLB bildender Zellen. Allerdings wird man von diesen Zellen nicht von Mutanten sprechen können. Es sind Varianten, bei denen die Fähigkeit zur VLB-Biosynthese reprimiert ist. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß aus diesen Zellen regenerierte Pflanzen [22] wie die ursprünglichen Ausgangspflanzen VLB synthetisieren.

Danksagung

Die Untersuchungen werden in dankenswerter Weise vom Bundesministerium für Forschung und Technologie finanziell unterstützt

- [1] E. Mutschler, Arzneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1981.
- [2] W. I. Taylor u. N. R. Farnsworth, The *Catharanthus* Alkaloids: Botany, Chemistry, Pharmacology, and Clinical Use, Marcel Dekker, Inc. New York 1975.
- [3] E. W. Weiler, Radioimmuno-Screening methods for secondary plant products, pp. 266–277 in: Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application, (W. Barz, E. Reinhard, M. H. Zenk, eds.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977.
- [4] W. P. Hofmann, Dissertation, Würzburg 1982.
- [5] A. N. Masoud, N. R. Farnsworth, L. A. Sciuchetti, R. N. Blomster u. W. A. Meer, *Lloydia* **31**, 202 (1968).
- [6] H. York, III. Intern. Chromatogr. Symp., Brüssel 1964.
- [7] K. Kraus, E. Mutschler u. H. Rochelmeyer, *J. Chromatogr.* **40**, 244 (1969).
- [8] N. R. Farnsworth, R. N. Blomster, D. Damratowski, W. A. Meer u. L. V. Cammarato, *Lloydia* **27**, 302 (1964).
- [9] J. H. Burns, Vinblastine sulfate, pp. 444–468 in: Analytical Profiles of Drug Substances, **Vol. 1**, (K. Florey, ed.), Acad. Press, New York-London 1972.
- [10] G. H. Svoboda, I. S. Johnson, M. Gorman u. N. Neuss, *J. Pharm. Sci.* **51**, 707 (1962).
- [11] N. Neuss, I. S. Johnson, J. G. Armstrong u. C. J. Janzen, *Advan. Chemotherapy* **1**, 133 (1964).

- [12] M. Hesse, Indolalkaloide, Teil 1 und 2 in: Progress in Mass Spectrometry, Fortschritte der Massenspektrometrie, **Vol. 1**, (H. Budzikiewicz, ed.) Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- [13] M. Wotschokowsky, Kontakte (Merck) 1/75, 14 (1975).
- [14] H. Bethke, W. Santi u. R. W. Frei, J. Chromatog. Sci. **21**, 392 (1974).
- [15] U. Hezel, pp. 117–181 in: Einführung in die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie, (R. E. Kaiser ed.), Verlag des Instituts für Chromatographie, Bad Dürkheim 1976.
- [16] A. Herisset, A. Cave u. R. P. Paris, Plantes médicinales et phytothérapie, **Tome VI**, n° 2, 152 (1972).
- [17] F. Constabel, S. Rambold, K. B. Chatson, W. G. M. Kurz u. J. P. Kutney, Plant Cell Reports **1**, 3 (1981).
- [18] F.-C. Czygan, Planta Med. Suppl. pp. 169 (1975).
- [19] N. Degraeve u. J. Gilot-Delhalle, Experientia **28**, 581 (1972).
- [20] M. Segawa u. K. Kondo, Experientia **34**, 996 (1978).
- [21] F. Constabel, S. Rambold, J. P. Shyluk, D. LeTourneau, W. G. W. Kunz u. J. P. Kutney, Z. Pflanzenphysiol. **105**, 53 (1981).
- [22] A. A. Abou-Mandour, S. Fischer u. F.-C. Czygan, Z. Pflanzenphysiol. **91**, 83 (1979).