

Natürliche Hemmstoffe von Keimung und Wachstum, I Ausarbeitung eines quantitativen Biotests und Anwendung auf Extrakte aus Spelzen von *Avena sativa* L.

Natural Inhibitors of Germination and Growth, I.

Development of a Quantitative Biotest and Application upon Extracts from Husks of *Avena sativa* L.

Rudolf Karl und Wolfhart Rüdiger

Botanisches Institut der Universität München, Menzinger Str. 67, D-8000 München 19

Z. Naturforsch. 37 c, 793–801 (1982); received April 27, 1982

Avena sativa L., *Amaranthus caudatus*, Seed Germination, Growth of Roots and Oat Coleoptiles, Extracts from Oat

Extracts from oat husks inhibit germination of a variety of seeds including *Avena sativa* L., *Sorghum* spec., *Phalleris* spec., *Raphanus* spec., *Amaranthus caudatus*, *Lepidium sativum* L. A quantitative assay for this inhibition was developed on the basis of percentage of root growth of *Avena* in the presence of extracted material compared with root growth of water controls. Fractionation of the extracts revealed that about half of the total inhibitory activity was found in the fraction of free organic acids. The inhibition was not due to known inhibitors. Abscissic acid was not found in this extract. Phenolic carbonic acids were determined in the extract. Their concentration was too low to significantly contribute to the observed inhibitory activity.

Einleitung

Die Samen vieler Pflanzen durchlaufen eine Periode der Keimruhe (engl. „dormancy“), während der sie auch unter günstigen Umweltbedingungen nicht auskeimen. Die Regulation der Keimruhe durch den Menschen, ein sowohl für einen Entwicklungsphysiologen als auch für Praktiker interessantes Problem, setzt die Kenntnis der natürlichen Ursachen der Keimruhe voraus. Von den verschiedenen, möglichen Ursachen (vgl. Khan [1]) seien hier die Impermeabilität der Umgebung des Embryos (z. B. der Samenschale) für Wasser bzw. Sauerstoff [2–5] und das Vorkommen von Keimungsinhibitoren in Samen, Früchten usw. (Zusammenfassungen [6, 7]) genannt.

Eigene Beobachtungen zeigten, daß frisch-geerntete, bespelzte Karyopsen von *Avena sativa* L. deutlich langsamer keimten als dieselben nach Entfernen der Spelzen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits früher bei *A. sativa* [8] und *A. fatua* [9] gemacht. In wäßrigen Extrakten aus *A. sativa* und *A. fatua* wurde von mehreren Autoren eine Hemmwirkung auf die Keimung festgestellt [10–14], jedoch konnte zunächst kein Hemmstoff identifiziert

werden. Berrie [15–16] konnte dann neben Abscissinsäure flüchtige Fettsäuren als Keimungshemmstoffe nachweisen. Es gelang jedoch nicht, die gesamte Hemmwirkung mit der gefundenen Hemmstoffkonzentration in Übereinstimmung zu bringen.

Nach Black [10] ist bei *A. fatua* nicht die Hemmstoff-Konzentration in den Spelzen für die Keimruhe verantwortlich, vielmehr sollen die Spelzen ein Auslaugen von Inhibitoren aus den Karyopsen verhindern. Impermeable, lipidhaltige Schichten sind bei anderen Graminen (z. B. *Aristida contorta*) mit der Keimruhe korreliert worden [17].

Für die eigenen Untersuchungen sollte zunächst ein quantitativer Biotest entwickelt werden, damit die Inhibitorwirkung von Extrakten und daraus gewonnenen Fraktionen bzw. Reinsubstanzen mit der Wirkung der Spelzen verglichen werden konnte.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Für Vorversuche wurden Spelzen von Saathafer (*Avena sativa* L. var. „Husar“, Baywa) manuell gewonnen. Für Extraktionsversuche in großem Maßstab wurden Spelzen verwendet, die als Abfall bei der Herstellung von Haferkörnerprodukten anfallen (Bezugsquelle = Mayer-Mühle, Landshut). Dieses Spelzenmaterial wurde durch Sieben (Maschenweite

zunächst 1,3 mm, dann kurzes Sieben bei 2–4 mm) gereinigt. Ganze Karyopsen, Pflanzenteile oder Samen anderer Pflanzen wurden gegebenenfalls durch anschließendes Verlesen von Hand entfernt.

Für Keimversuche wurde folgendes Saatgut verwendet: Saathafer (*Avena sativa* L. var. „Husar“), Silberhirse (*Sorghum* spec.), Glanz (*Phalleris* spec.), Rettich (*Raphanus* spec. var. „Münchner Bier“), Fuchsschwanz (*Amaranthus caudatus*), Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.). Die Samen (bis auf Hafer) wurden von der Firma Dehner (Rain a. Lech) bezogen.

Biotest

Keimtests wurden in Petrischalen (Ø 9 cm) ausgeführt, die 2 Lagen Filterpapier enthielten. Es wurden jeweils 6 ml der Probelösung einpipettiert. Nach Aussaat der Haferkaryopsen (25 Stck) wurden die Schalen verschlossen 48 h lang bei 27 °C im Dunkeln bei 90% relativer Luftfeuchtigkeit (Brutschrank) inkubiert. Danach wurden die Proben entweder sofort ausgewertet oder eingefroren und bis zur Auswertung bei –20 °C aufbewahrt. Zur Auswertung wurde die Länge von Keimwurzel und (bei einigen Versuchen) der Koleoptile bestimmt. Bei allen quantitativen Untersuchungen wurden jeweils 3 Bestimmungen mit je 3 Petrischalen à 25 Karyopsen durchgeführt.

Für die Untersuchungen von chromatographischen Fraktionen wurden Petrischalen (Ø 4 cm) mit 1 Lage Filterpapier verwendet, in die jeweils 1 ml Probelösung einpipettiert wurde. 25 Samen von *Amaranthus caudatus* wurden wie oben 48 h inkubiert. Ausgewertet wurde die Länge der „Keimwurzel“ (von Wurzelspitze bis zum Hypokotylhaken) oder nur die Keimrate.

Extraktion und Fraktionierung von Hemmstoffen

60 g Spelzen wurden mit 500 ml dest. Wasser 1 h unter Rückfluß gekocht (Zeit ab Siedebeginn). Nach Abkühlen wurde über ein Sieb abgesehen und anschließend 20 min bei 18 000 × g zentrifugiert. Der klare Überstand (ca. 400 ml) wurde gefriergetrocknet (Lyophilisator L2, WFK, Brandau). Der Rückstand wurde in 100 ml dest. Wasser aufgenommen und ca. 15 min gerührt. Nach Zentrifugation wurde die klare Lösung auf eine mit Acrylex-P2 gefüllte Säule (10 × 26 cm) gegeben, die vorher mit dest. Wasser äquilibriert war. Elution mit dest.

Wasser (Durchfluß ca. 250 ml/h). Die Eluate der Fraktionen I, II und III (vgl. Abb. 3) wurden gefriergetrocknet, die Rückstände für Biotests in jeweils 40 ml Wasser gelöst und nach Bedarf weiter verdünnt.

Der Rückstand von Fraktion II wurde in 100 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 5-prozentiger H₂SO₄ bzw. 5-prozentigen NaHCO₃ auf pH 7,0 eingestellt und dann 3mal mit je 100 ml Ether (peroxidfrei) ausgeschüttelt („Etherphase pH 7,0“). Die verbleibende wäßrige Phase wurde mit 5-prozentiger H₂SO₄ auf pH 1,0 gebracht und ebenfalls 3mal mit je 100 ml Ether extrahiert („Etherphase pH 1,0“). Die jeweils vereinigten Etherphasen wurden mittels Rotationsverdampfer vom Ether befreit, die Rückstände wurden in definierten Volumina (Biotest: 40 ml) Wasser aufgenommen. Der Rückstand der „Etherphase pH 1,0“ ließ sich erst durch Erhitzen weitgehend in Wasser lösen. Es wurde nach Abkühlen zentrifugiert; nur die klare Lösung wurde weiterverwendet.

In diesen und analogen Versuchen wurde der pH-Wert der Lösung vor Ausführung des Biotests bestimmt, notfalls wurde der pH-Wert mit wenig NaOH (oder HCl) auf einen Wert zwischen 6 und 8 eingestellt. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Keimung in ungepufferter Lösung erst unterhalb pH 3,5 und oberhalb pH 9 deutlich gehemmt wird.

Die nach Etherextraktion bei pH 1,0 erhaltene stark saure wäßrige Phase wurde zunächst mit wäßriger Ba(OH)₂-Lösung auf pH 7,0 gebracht. Das ausgefallene BaSO₄ wurde abzentrifugiert. Zum Test auf etwa vorhandene Barium-Ionen wurde CO₂ eingeleitet. Die klare Lösung wurde gefriergetrocknet, der Rückstand für Biotests in Wasser aufgenommen (s. oben).

Chromatographische Verfahren

Für Versuche zur Hochdruckflüssigchromatographie wurde der Rückstand der „Etherphase pH 1“ in 2 ml Wasser aufgenommen (entspr. 200fache Konzentration bezogen auf das Volumen des Rohextrakts). Nach Abzentrifugieren nichtgelöster Partikel (1 h bei 78 000 × g) wurden jeweils 50 µl dieser Lösung zur Chromatographie in die Apparatur eingespritzt (Waters liquid injector U6K, solvent programmer 660, chromatography pump 6000 A). Säule: Reverse-Phase µC18, Länge 30 cm. Elution mit einem Methanol-Wasser-Gradienten (10:90 →

30:70), Dauer des Gradienten 20 min. Ergebnisse in Abb. 6.

Für die *Dünnschichtchromatographie* wurden mit Kieselgel G_F (mit Fluoreszenzindikator) beschichtete Platten verwendet. Als geeignetes Fließmittel erwies sich die Mischung Benzol/Methanol/Essigsäure (45:8:4, v:v:v). Phenolcarbonsäuren ließen sich unter UV-Licht direkt erkennen, daneben wurden als Sprühmittel diazotierte Sulfanilsäure und Anisaldehyd-Schwefelsäure [23] zur Sichtbarmachung verwendet. Mit letzterem Sprühmittel ergab authentische Abscisinsäure eine Grünfärbung, die auf keinem Chromatogramm aus Spelzenextrakten zu beobachten war. Die Phenolcarbonsäuren ergaben rot-violette Flecken.

Für die *Gaschromatographie* wurde der Rückstand der „Etherphase pH 1“ in 15 ml Methanol aufgenommen. Davon wurde ein Aliquot (1 ml) mit einer Lösung von Diazomethan in Ether bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Die Mischung blieb 2 h bei Raumtemperatur stehen. Danach wurde das Lö-

sungsmittel i. Vak. bei Raumtemperatur entfernt. Der Rückstand wurde in 5 ml *n*-Hexan aufgenommen. Vergleichssubstanzen wurden entsprechend methyliert. Eingespritzt wurde jeweils 1 µl der Hexanlösung. Verwendet wurde ein Gaschromatograph Modell 23100 (Carlo Erba, Mailand) mit Glaskapillarsäule (50 m Länge, belegt mit SF 96), Trägergas Wasserstoff, Injektortemperatur 225 °C, Temperaturprogramm 5° min⁻¹ von 100 °C bis 220 °C. Ergebnisse in Abb. 7.

Ergebnisse und Diskussion

In Vorversuchen war festgestellt worden, daß bespelzte Karyopsen von Hafer deutlich langsamer keimten als dieselben nach Entfernen der Spelzen. Eine Beeinträchtigung der Keimung war auch durch Zusatz eines wäßrigen Spelzen-Extraktes zu den entspelzten Karyopsen zu erzielen. Offensichtlich enthielten die Spelzen einen oder mehrere wasserlös-

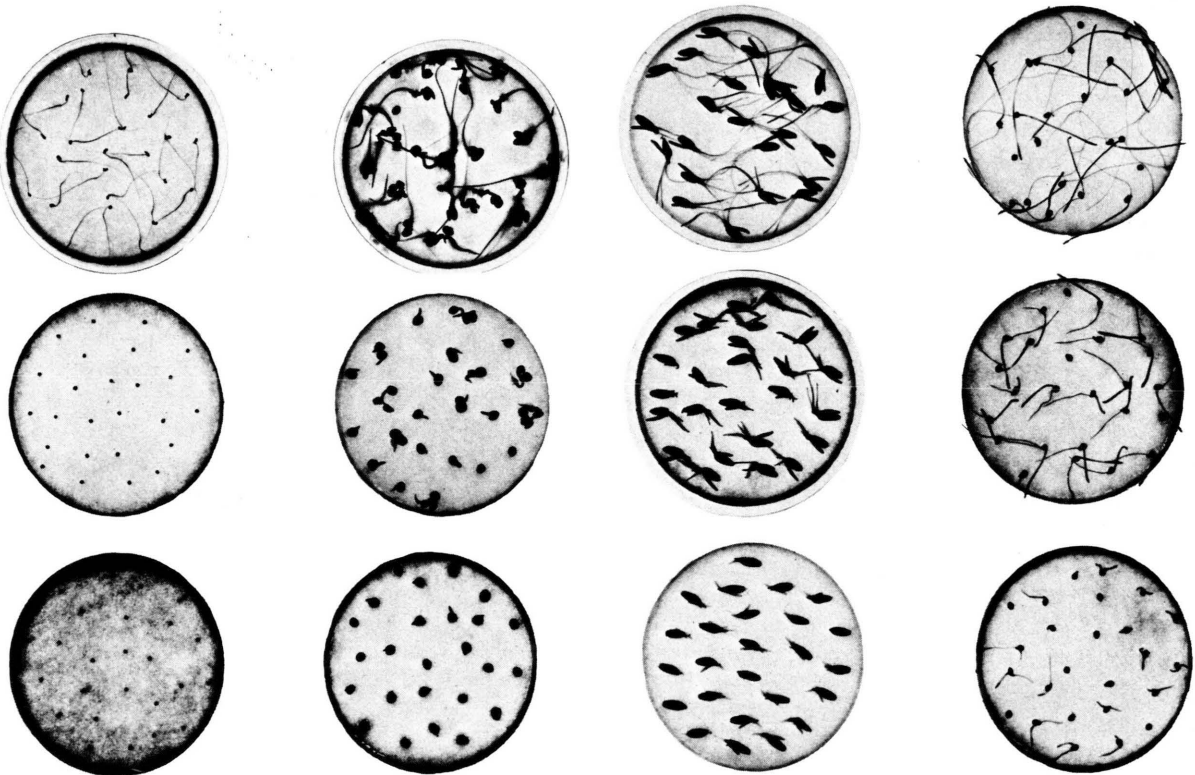


Abb. 1. Wirkung eines Extraktes aus Spelzen von *Avena sativa* (60 g Spelzen, 500 ml Wasser, 1 h 100 °C, Volumen des Rohextraktes 400 ml) auf die Keimung verschiedener Samen. Der Rohextrakt wurde gefriergetrocknet, der Rückstand in versch. Volumina Wasser gelöst: 400 ml (oben), 135 ml (Mitte), 40 ml (unten). Von links nach rechts: *Amaranthus caudatus*, *Raphanus spec.*, *Avena sativa* L. (entspelzt), *Sorghum spec.*

liche Hemmstoffe. Zur Untersuchung der besten Extraktionsbedingungen wurden gleiche Mengen Spelzen (60 g) mit 500 ml Wasser einmal 48 h bei 4 °C und einmal 1 h bei 100 °C extrahiert. Die Hemmwirkung war im Hitze-Extrakt erheblich höher als im Kälte-Extrakt, vermutlich aufgrund unvollständiger Extraktion in der Kälte. Der Versuch zeigte ferner, daß die gesuchten Hemmstoffe offensichtlich hitzestabil sind. Für weitere Versuche wurde nur noch die Extraktion bei 100 °C angewendet, zumal durch die Hitzesterilisation das Wachstum von Mikroorganismen im Extrakt unterbunden wurde.

Um zu untersuchen, ob die Hemmstoffe artspezifisch sind (d. h. nur auf Hafer wirken) oder als universelle pflanzliche Hemmstoffe angesehen werden müssen, wurden Keimtests mit verschiedenen monokotylen und dikotylen Pflanzen ausgeführt. Wie Abb. 1 exemplarisch zeigt, läßt sich bei allen untersuchten Pflanzen eine Keimungshemmung feststellen. Allerdings ist das Ausmaß der Hemmung bei verschiedenen Pflanzen unterschiedlich. Während z. B. bei Hafer und Rettich das Wachstum stark beeinträchtigt wird, ist die Hemmung bei Hirse weit aus geringer. Beim Fuchsschwanz findet man dagegen eine Totalhemmung der Keimung (jeweils mit dem gleichen Extrakt, d. h. derselben Konzentration an Hemmstoffen). Eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen wurde bei Fuchsschwanz im Vergleich zu Hafer immer wieder (d. h. mit frisch geerntetem wie mit länger gelagertem Saatgut) gefunden, so daß es sich wohl um artspezifische Unterschiede handelt. Jedoch darf nicht jeder beobachtete Unterschied so interpretiert werden, da es für die Keimung von Bedeutung ist, ob das Testsaatgut sich in der Keimruhe befindet oder nicht. Etwa vorhandene endogene Hemmstoffe könnten die Reaktion auf von außen zugesetzte Hemmstoffe verstärken und dadurch eine höhere Empfindlichkeit vortäuschen.

Zur Ausarbeitung eines quantitativen Biotests, eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Isolierung des Hemmstoffs, mußte daher ein bestimmtes Saatgut unter Standardbedingungen zur Keimung gebracht werden. Als Testsaatgut dienten entspelzte Haferkaryopsen, bei denen unter den gewählten Bedingungen (s. Material und Methoden) der Austritt der Keimwurzel ca. 20 h nach Aussaat, das beginnende Wachstum der Koeptile einige Stunden später zu beobachten war. In den Wasser-

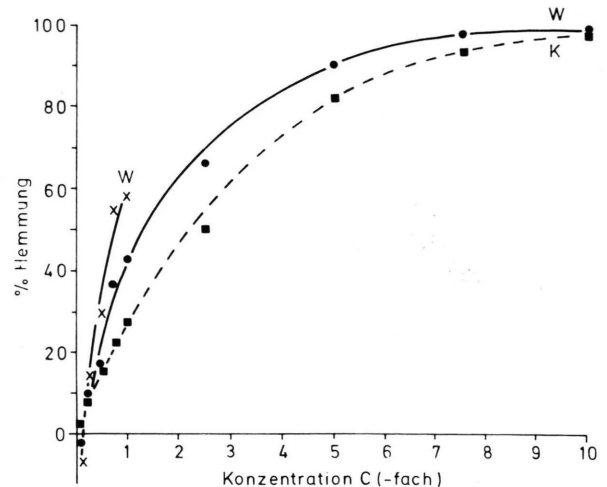


Abb. 2. Hemmung des Wachstums von Wurzel und Koeptile von *Avena sativa* L. durch einen Spelzenextrakt und der daraus nach Gefriertrocknung erhaltenen Lösung (Konzentration bezogen auf den ursprünglichen Extrakt = 1). Spelzenextrakt direkt: X-X Wurzel; nach Gefriertrocknung: ●-● Wurzel, ■-■ Koeptile. Alle Werte durch Längenmessung gewonnen, bezogen auf die Wasserkontrolle (= 0% Hemmung). Eine Förderung des Längenwachstums gegenüber den Wasserkontrollen ergibt negative Werte der Hemmung.

kontrollen waren 48 h nach Aussaat die Keimwurzeln auf 28 ± 1 mm, die Koeptilen auf $12 \pm 0,7$ mm herangewachsen. In hemmstoffhaltigen Lösungen war der Austritt der Keimwurzel ebenfalls ca. 20 h nach Aussaat zu beobachten, jedoch war das anschließende Wachstum je nach Hemmstoff-Konzentration mehr oder weniger vermindert. Zur Auswertung im Biotest wurde jeweils die Länge der Keimwurzel 48 h nach Aussaat gemessen und in % des Wertes für die Wasserkontrollen registriert („% Wachstum“). Als Hemmwert wurde jeweils die Differenz dieses Wachstum-Wertes zu den Wasserkontrollen angegeben (% Hemmung = 100% minus % Wachstum).

In anfänglichen Versuchen wurde auch die Länge der Koeptilen ausgemessen und entsprechend ausgewertet (vgl. Abb. 2). Aufgrund der geringen Länge der Koeptile ist jedoch die Messung der Keimwurzel vorzuziehen. Die Längenbestimmung beider Organe bringt keine zusätzliche Information für das hier angestrebte Ziel.

Bei der chromatographischen Auftrennung aktiver Fraktionen ergab sich die Notwendigkeit, den Biotest mit möglichst wenig Hemmstoff ausführen zu können. Für diese Zwecke wurden – bei kleinerem

Testvolumen – kleinere Samen mit hoher Keimrate und geringer Keimdauer benötigt. Als geeignet erwiesen sich Samen von Fuchsschwanz, bei denen 48 h nach Aussaat die Länge der Wurzel bestimmt werden konnte. Die Auswertung erfolgte wie bei Hafer. Da der Übergang von vollem Wachstum bis zur Totalhemmung beim Fuchsschwanz in einem sehr kleinen Konzentrationsbereich der Hemmstoffe liegt, genügte hier häufig bereits die Bestimmung der Keimrate.

Bei der chromatographischen Reinigung der Hemmstoffe war zu erwarten, daß diese je nach Volumen der einzelnen Fraktionen in unterschiedlicher Verdünnung vorliegen würden. Für quantitative Vergleiche mußte deshalb eine „Standard-Verdünnung“ definiert werden. Als solche wurde die im Standard-Rohextrakt (Volumen 400 ml, gewonnen aus 60 g trockenen Spelzen, 500 ml Wasser, 100 °C, s. oben) vorliegende Verdünnung gewählt. Sie wird im folgenden als „1fache Konzentration“ bezeichnet. Bei stärkerer Verdünnung war ein Konzentrierungsschritt notwendig. Als schonendes Konzentrierungsverfahren wurde die Gefriertrocknung gewählt. Durch Auflösen des Lyophilisats in einem definierten Volumen konnte dann jede gewünschte Konzentration der Hemmstoffe erhalten werden. Flüchtige Hemmstoffe [15, 16] gehen bei diesem Verfahren zwar verloren, diese machen aber nur einen kleinen Teil der gesamten Hemmwirkung aus (vgl. Abb. 2). Bei sehr niedriger Konzentration (0,1fache Konzentration) des Spelzenextraktes findet man statt der Hemmwirkung eine fördernde Wirkung des Extraktes auf das Längenwachstum der Keimwurzel („negative Hemmwirkung“ in Abb. 2). Der Effekt tritt bei der Koleoptile nicht auf. Für die quantitative Auswertung wurden im folgenden vorwiegend höhere Konzentrationen der Hemmstoffe (Bereich 0,5 bis 10fache Konzentration) herangezogen. Wie Abb. 2 zeigt, ist die Hemmwirkung des (gefriergetrockneten) Rohextraktes auf das Wachstum der Koleoptile in diesem Konzentrationsbereich etwas niedriger als auf das Wachstum der Keimwurzel; bei 8–10facher Konzentration wird bei Koleoptilen und Keimwurzel Totalhemmung erreicht.

Bei hohen Konzentrationen könnte eine Hemmwirkung auch auf dem hohen osmotischen Wert der Lösung beruhen, ohne daß ein spezifischer Hemmstoff zugegen ist. Für den im folgenden gewählten Konzentrationsbereich ist das jedoch nicht der Fall. Das zeigt zum einen der Wiederfund der Hemmak-

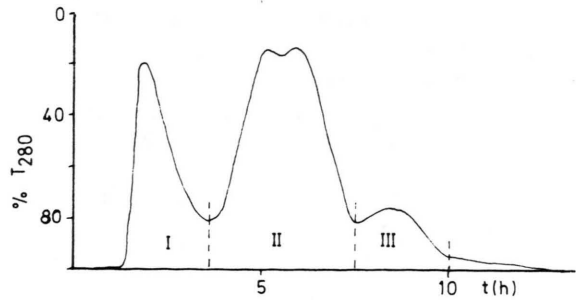


Abb. 3. Gelchromatographie eines Extraktes aus Haferspelzen an Acrylex-P2. Der Rohextrakt wurde nach Gefriertrocknung in 100 ml Wasser aufgenommen, auf die Säule (10 × 26 cm) gegeben und mit Wasser eluiert. Messung der Transmission des Eluats bei 280 nm.

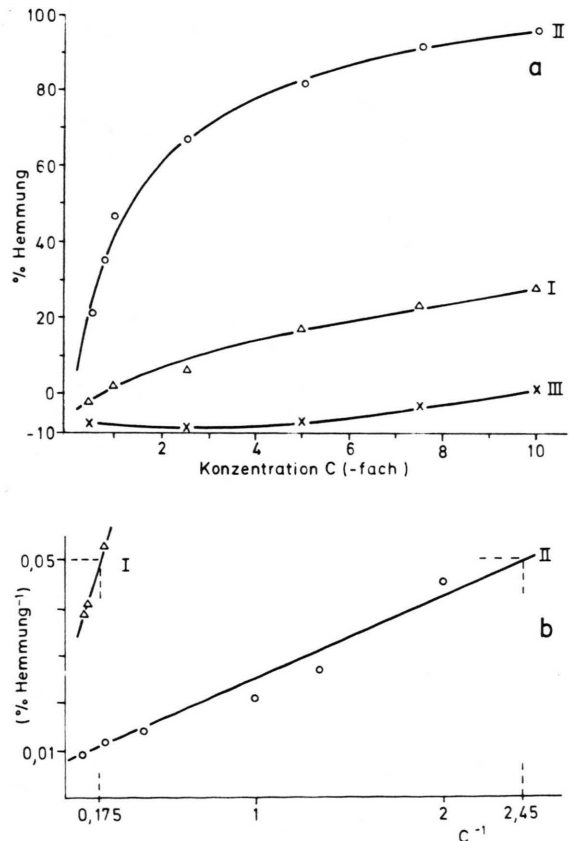


Abb. 4. Hemmung des Wurzelwachstums von *Avena sativa* durch die bei der Gelchromatographie erhaltenen Fraktionen (vgl. Abb. 3). Δ – Δ Fraktion I, \circ – \circ Fraktion II, \times – \times Fraktion III. Bei Fraktion III wurde durchweg eine Förderung des Wurzelwachstums gefunden. a: Lineare Auftragung, b: doppelt reziproke Auftragung.

tivität bei Fraktionierung und Verdünnung (vgl. Abb. 4, 5 und Tab. I) sowie die fehlende Übereinstimmung zwischen gewogener Substanzmenge und Hemmaktivität in den einzelnen Fraktionen, zum anderen die Isolierung eines spezifischen Hemmstoffs [18].

Versuche zur Fraktionierung und Anreicherung gingen jetzt vom Lyophilisat aus. Zunächst wurde das Lyophilisat nach Lösen in Wasser durch Gelchromatographie an Acrylex-P2 aufgetrennt (Abb. 3). Die entsprechend der UV-Absorption erhaltenen Fraktionen I, II und III wurden wieder gefriertrocknet und anhand einer Verdünnungsreihe auf ihre Bioaktivität geprüft (Abb. 4a und b). Die stärk-

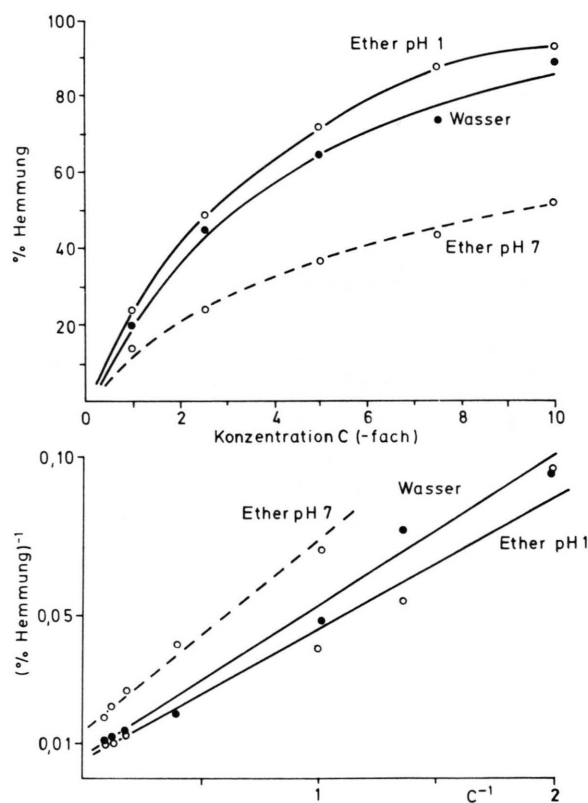


Abb. 5. Hemmung des Wurzelwachstums von *Avena sativa* durch verschiedene bei der Etherextraktion erhaltenen Fraktionen. Fraktion II der Gelchromatographie (vgl. Abb. 4) wurde bei pH 7,0 mit Ether extrahiert (○—○ „Ether pH 7“), dann mit H_2SO_4 auf pH 1,0 gebracht und wieder mit Ether extrahiert (○—○ „Ether pH 1“). Die wäßrige Phase wurde von $Ba(OH)_2$ neutralisiert (●—● „Wasser“). Alle Fraktionen wurden i. Vak. zur Trockene gebracht (ggf. durch Gefriertrocknung), die Rückstände wurden in definierten Volumina Wasser gelöst. Konzentration auf das Volumen des Rohextraktes = 1 bezogen. a: lineare Auftragung, b: doppelt reziproke Auftragung.

Tab. I. Berechnung von Hemmeinheiten in verschiedenen Fraktionen aus Haferspelzen. C = Konzentration der jeweiligen Fraktion (bezogen auf den Rohextrakt = 1), die eine Hemmung des Wurzelwachstums der Haferkaryopsen um 20% bewirkt (zur Auswertung s. Abb. 4a, b und 5a, b). Volumen des Biotests: 6 ml, Volumen des Rohextraktes: 600 ml. Die Zahl der Hemmeinheiten wird entspr. dieser Volumenrelation als $100/C$ definiert.

	C	$1/C$	$100/C$
1. Haferspelzen-Extrakt	0,31	3,2	320
2. = 1 nach Gefriertrocknung	0,37	2,7	270
<i>Gelfiltration nach Acrylex-P2</i>			
3. Fraktion I	5,71	0,18	18
4. Fraktion II	0,41	2,45	245
<i>Etherextraktion von 4.</i>			
5. Ether pH 7	1,75	0,57	57
6. Ether pH 1	0,95	1,05	105
7. wäßrige Phase	1,09	0,91	91
5 + 6 + 7			253

ste Hemmwirkung wurde in Fraktion II gefunden, eine nur minimale Hemmung in Fraktion I. Dagegen wirkte Fraktion III (bis auf die höchste Konzentration) fördernd auf das Wurzelwachstum. Auch bei der Messung des Koleoptil-Wachstums (nicht abgebildet) wurde die stärkste Hemmwirkung in Fraktion II gefunden; eine Förderung des Wachstums ergab sich mit keiner Fraktion. Für die leichtere quantitative Auswertung wurde eine doppelt reziproke Auftragung gewählt (Abb. 4b). Als Bezugspunkt für die Berechnung von Hemmeinheiten wurde der Wert von 20% Hemmung des Wachstums der Keimwurzel gewählt, da diese Hemmung in den meisten Fällen leicht erreicht wurde (Ausnahme: Fraktion III) und durchweg im linearen Bereich der Graphik der Reziprokwerte lag. Der Wert für $1/C$ bei 20% Hemmung ist proportional der Menge an Hemmstoff. Da vom normierten Ausgangsvolumen (600 ml) jeweils 1/100 Teil, d. h. 6 ml für den Hemmtest verwendet wurde, definierten wir die Größe $100/C$ als Maßzahl für die Menge an Hemmstoff („Hemmeinheit“, Werte in Tabelle I).

Die weitere Auftrennung erfolgte dann durch erschöpfende Extraktion der Fraktion II mit Ether bei pH 7,0 und anschließend bei 1,0. Wie Abb. 5a, b zeigt, wird bei pH 7 wenig Hemmstoff mit Ether extrahiert. Dagegen läßt sich nach Ansäuern auf pH 1 etwas mehr als die Hälfte der verbliebenen Aktivität in die organische Phase überführen. Die in

der wäßrigen Phase verbliebene Aktivität ist offensichtlich auf eine (oder mehrere) hydrophile Komponente zurückzuführen; auch häufig wiederholte Extraktion mit Ether ergab keine Abnahme der Aktivität in der wäßrigen Phase. Vorversuche hatten bereits gezeigt, daß bei pH 11–12 keine Hemmaktivität in Ether überführbar war. Organische Basen konnten daher als Hemmsubstanzen ausgeschlossen werden.

Wie die Zusammenstellung in Tab. I zeigt, kann die Verteilung von Hemmstoffen anhand der oben definierten Hemmeinheiten gut verfolgt werden. Von den ursprünglich im Rohextrakt aus 90 g Spelzen (600 ml) enthaltenen 320 Hemmeinheiten gehen 50 durch Gefriertrocknung verloren. Diese flüchtigen Verbindungen wurden hier nicht weiter untersucht. Von den im Lyophilisat enthaltenen 270 Hemmeinheiten wurden nach Gelchromatographie 263 wiedergefunden, davon 245 in Fraktion II. Diese wurden nach den verschiedenen Extraktionsschritten mit Ether im Rahmen der Fehlergrenze quantitativ wiedergefunden (insgesamt 253 Einheiten).

Im folgenden sollen die in der bei pH 1 in Ether extrahierbaren Stoffe näher charakterisiert werden. Die in der wäßrigen Phase verbliebenen Hemmstoffe werden bei Lohaus et al. [18] (nachstehende Arbeit) untersucht.

Tab. II. Quantitative Auswertung der Hemmwirkung einzelner Fraktionen der Hochdruckflüssigchromatographie (vgl. Abb. 6). Jede Fraktion wurde nach Abdampfen des Methanols i. Vak. gefriergetrocknet, der Rückstand in je 4 ml Wasser aufgenommen (entspr. 10fache Konzentration bezogen auf den Rohextrakt). Testsaatgut: *Amaranthus caudatus*. Pro Schale wurde 1 ml dieser Lösung verwendet. Auswertung durch Längenmessung der Keimwurzel, Bezug Wasserkontrolle = 100% Wachstum = 0% Hemmung.

Fraktion	Hemmung [%]
I	20,0
II	10,5
III	9,8
IV	21,6
V	27,0
VI	75,9
VII	26,3

Verschiedene Verfahren zur weiteren Auftrennung des bei pH 1 erhaltenen Etherextraktes wurden erprobt. Bei der Hochdruckflüssigchromatographie (Abb. 6) wurden entsprechend dem Elutionsdiagramm 7 Fraktionen erhalten, deren Hemmaktivität nach Entfernen des Fließmittels getestet wurde (Ergebnisse in Tab. II). Wegen der geringen Volumina wurden Samen von Fuchsschwanz verwendet; die Hemmwerte sind daher nicht direkt mit den bei Hafer erhaltenen Werten (Tab. I) vergleichbar. Man erkennt aber, daß die höchste Hemmaktivität in Fraktion VI erreicht wird. Da aber auch meßbare Hemmwirkungen in anderen Fraktionen vorhanden waren, muß man annehmen, daß eine ganze Reihe unterschiedlicher Stoffe an der Hemmwirkung beteiligt ist. Es wurde daher versucht, bereits beschriebene Hemmstoffe nachzuweisen und gegebenenfalls ihren Anteil an der Gesamthemmung zu ermitteln.

In Abb. 6 ist u. a. das Elutionsverhalten von authentischer Abscisinsäure angegeben. Sie hätte sich in Fraktion VII anreichern müssen. Abscisinsäure ließ sich durch Dünnschichtchromatographie allerdings weder in dieser Fraktion noch in anderen Fraktionen nachweisen. Die Hemmwirkung der Hauptfraktion VI läßt sich nach diesen Ergebnissen nicht auf Abscisinsäure zurückführen. In Übereinstimmung damit hatten Berrie *et al.* [15, 16] die höchste Menge an Abscisinsäure während des Reifens von Hafer gefunden, jedoch wenig oder keine in reifen, keimfähigen Karyopsen. Bei den Versuchen zur Dünnschichtchromatographie fielen mehrere Phenolcarbonsäuren durch ihre UV-Absorption und die Anfärbbarkeit auf den Chromatogrammen auf.

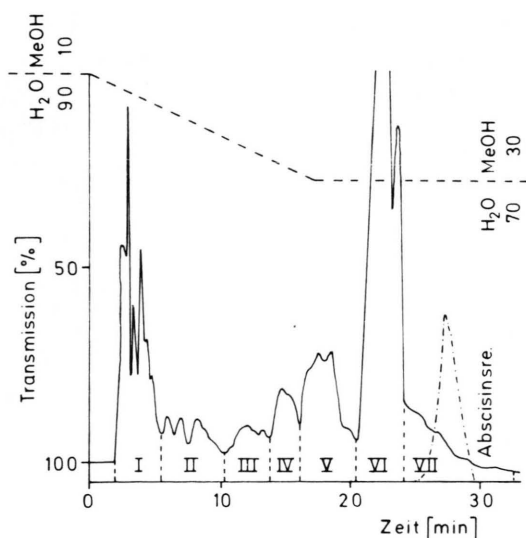


Abb. 6. Elutionsdiagramm der Hochdruckflüssigchromatographie von Fraktion „Ether pH 1“ (vgl. Abb. 5) an Reverse-Phase μ C18 (Bedingungen s. Material und Methoden). — — Verlauf des Fließmittelgradienten. — — Elutionsdiagramm authentischer Abscisinsäure.

Als Hauptkomponente wurde *p*-Cumarsäure (3) erkannt. Daneben scheinen (neben unbekannten Komponenten) Ferulasäure (4), *p*-Hydroxybenzoesäure (1) und Vanillinsäure (2) vorzukommen. Allerdings sind die R_F -Werte von anderen, verwandten Verbindungen sehr ähnlich. Zur Absicherung der Identifizierung wurde die Gaschromatographie der Methylester herangezogen (Abb. 7). Die Methode erlaubt gleichzeitig die quantitative Bestimmung

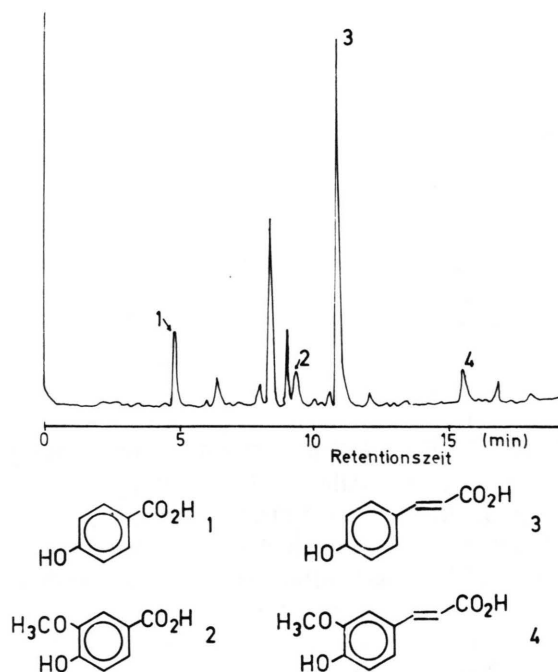


Abb. 7. Gaschromatogramm der Fraktion „Ether pH 1“ nach Methylierung mit Diazomethan. Kapillarsäule (50 m) belegt mit SF 96, Trägergas Wasserstoff, Injektor 225 °C, Temperaturprogramm 5°/min von 100 °C bis 220 °C. Durch Cochromatographie wurden folgende Säuren (nach Methylierung) identifiziert: 1, *p*-Hydroxybenzoesäure; 2, Vanillinsäure; 3, *p*-Cumarsäure; 4, Ferulasäure.

Tab. III. Quantitative Bestimmung von Phenolcarbonsäuren durch Gaschromatographie (vgl. Abb. 7). Die Mengen sind die in der „Etherphase pH 1“ gefundenen Gesamtmengen und die daraus errechneten molaren Konzentrationen der einzelnen Verbindungen im Rohextrakt.

Substanz	gefundene Menge [mg]	errechnete Molarität im Rohextrakt
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure (1)	0,829	$1,52 \times 10^{-5}$
Vanillinsäure (2)	0,724	$1,09 \times 10^{-5}$
<i>p</i> -Cumarsäure (3)	4,647	$7,16 \times 10^{-5}$
Ferulasäure (4)	1,321	$1,72 \times 10^{-5}$

der identifizierten Komponenten. Die Meßwerte (Tab. III) zeigen, daß die Komponenten in sehr unterschiedlichen Mengen vorkommen. Unter der Annahme, daß keine Verluste bei der Aufarbeitung bis zur Bestimmung eintreten, wurde die im ursprünglichen Extrakt vorhandene Konzentration an Phenolcarbonsäuren berechnet (Tab. III, letzte Spalte). Am Beispiel von *p*-Cumarsäure konnte gezeigt werden, daß die gefundene Konzentration (7×10^{-5} M) noch keine, die ca. zehnfache Konzentration (10^{-3} M) nur eine geringe Hemmung (ca. 10%) ergibt (Abb. 8). Die zehnfache Konzentration des Extraktes bzw. der bei pH 1 in Ether überföhrbaren Fraktion ergibt dagegen bereits 90–100% Hemmung (vgl. Abbn. 2, 4, 5). Die hier nachgewiesene *p*-Cumarsäure kann demnach zur Hemmwirkung im Extrakt nur wenig beitragen. Da in Vorversuchen mit *Amaranthus* gezeigt worden war, daß die anderen Phenolcarbonsäuren bei gleicher molarer Konzentration das Wurzelwachstum in ähnlichem Ausmaß hemmen, kommen sie aufgrund ihrer geringen Konzentration als wirksame Substanzen im Spelzenextrakt nicht in Frage. Auch die Mischung der Säuren 1, 2, 3 und 4 im analytisch gefundenen Verhältnis (vgl. Tab. III) ergibt keine anderen Ergebnisse. Die von mehreren Autoren [19–22] diskutierte Rolle von Phenolcarbonsäuren als natürliche Keimungshemmstoffe muß – zumindest für Hafer – bezweifelt werden.

Die Anwendung des quantitativen Biotests zeigt, daß neben dem bisher bei Hafer beschriebenen Keimungshemmstoff [15, 16] Nonansäure, die hier entfernt worden war, unbekannte Stoffe als Keimungshemmstoffe vorkommen müssen.

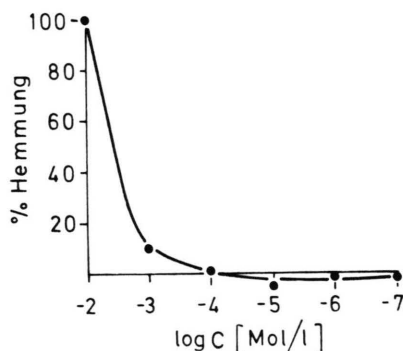


Abb. 8. Hemmung des Wurzelwachstums von *Avena sativa* durch Lösungen von *p*-Cumarsäure (10^{-2} bis 10^{-7} M). Aufgetragen ist die Hemmung bezogen auf die Wasserkontrolle (vgl. Legende zu Abb. 2).

Dank

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

- [1] A. A. Khan (ed.), *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-New York-Oxford 1977.
- [2] J. P. Barnett, *Can. J. For. Res.* **6**, 504 (1976).
- [3] C. J. Gardener, *Aust. J. Agric. Res.* **26**, 281 (1975).
- [4] S. S. Sidhu und P. B. Cavers, *Bot. Gaz.* **138**, 174 (1977).
- [5] J. J. Mott, *Aust. J. Bot.* **22**, 635 (1974).
- [6] M. Evenary, *The Bot. Rev.* **15**, 153 (1949).
- [7] D. L. Ketring, *Seed Sci. Technol.* **1**, 305 (1973).
- [8] L. Kiessling, *Landw. Jahrb. (Bayern)* **1**, 449 (1911).
- [9] A. Zade, *Inaug. Diss. Jena*, pp. 1–48 (1909).
- [10] M. Black, *Can. J. Bot.* **37**, 393 (1959).
- [11] T. Kommedahl, J. E. Devay und C. M. Christensen, *Weeds* **6**, 12 (1958).
- [12] J. R. Hay, *Can. J. Bot.* **40**, 191 (1962).
- [13] M. P. Sharma, D. K. McBeath und W. H. Vanden Born, *Can. J. Plant Sci.* **56**, 611 (1976).
- [14] B. B. Elliott und A. C. Leopold, *Physiol. Plant.* **6**, 65 (1963).
- [15] A. M. M. Berrie, R. Don, D. Buller, M. Alam und W. Parker, *Plant Sci. Letters* **6**, 163 (1975).
- [16] A. M. M. Berrie, D. Buller, R. Don und W. Parker, *Plant Physiol.* **63**, 758 (1979).
- [17] J. J. Mott und P. W. Tynan, *Aust. J. Bot.* **22**, 647 (1974).
- [18] E. Lohaus, W. Rüdiger und W. Schäfer, *Z. Naturforsch.* **37 c**, 802 (1982).
- [19] H. Börner, *Naturwissenschaften* **42**, 583 (1955).
- [20] H. Börner, *Naturwissenschaften* **43**, 129 (1956).
- [21] K. Herrmann, *Naturwissenschaften* **45**, 111 (1958).
- [22] K. Jayachandran-Nair und R. Sridhar, *Biol. Plant.* **17**, 318 (1975).
- [23] E. Stahl, Springer-Verlag B. H. N.Y., 2. Auflage, 1962.