

## FLAVONOID-MUSTER, SYSTEMATIK UND EVOLUTION BEI *VALERIANELLA*

HARALD GREGER

Botanisches Institut der Universität Wien, Austria

und

DETLEF ERNET

Institut für systematische Botanik der Universität Graz, Austria

(Eingegangen 15. Oktober 1972. Angenommen 10. Januar 1973)

**Key Word Index**—*Valerianella*; Valerianaceae; flavonoids; chemotaxonomy, evolution of biosynthetic pathways.

**Abstract**—Leaf extracts from 40 *Valerianella* species were hydrolyzed and subjected to 2-D chromatography. Luteolin and its methyl ethers, diosmetin and chrysoeriol, are evidently typical for the genus. The distribution of these derivatives and of 6-hydroxyluteolin parallel recent cytological and morphological findings and support a new systematic arrangement. Asiatic species form flavonols, while the North American and Mediterranean-Oriental groups appear progressively more advanced by the appearance of flavones and some 6-hydroxylation.

**Zusammenfassung**—Laubblatextrakte von 40 *Valerianella*-Arten wurden hydrolysiert und zweidimensional chromatographiert. Luteolin und seine beiden Methyläther Diosmetin und Chrysoeriol sind für die Gattung charakteristisch. Die unterschiedliche Verteilung dieser Derivate und die Bildung von 6-Hydroxyluteolin stützt neue cytologische und morphologische Befunde und ergibt Ansätze für eine neuartige systematische Gliederung. In der asiatischen Artengruppe werden noch Flavonole gebildet, während die nordamerikanischen und mediterran-orientalischen Gruppen durch Reduktion der Flavonole bzw. 6-Hydroxylierung fortschreitend abgeleiteter erscheinen.

### EINLEITUNG

Die GATTUNG *Valerianella* umfaßt ca. sechzig einjährige Arten mit meist unscheinbaren mehr oder weniger autogamen Blüten. Innerhalb der Valerianaceen bestehen enge Beziehungen zu der monotypischen Gattung *Fedia*. Die bisherige systematische Gliederung von *Valerianella* beruht im wesentlichen auf fruchtmorphologischen Unterschieden,<sup>1-3</sup> erweist sich aber aufgrund eingehender morphologischer<sup>4</sup> und karyologischer<sup>5</sup> Untersuchungen als recht problematisch.

Kürzlich von uns durchgeföhrte phytochemische Merkmalsvergleiche<sup>6</sup> zeigten, daß unterschiedliche Flavonoidmuster wesentlich zur Klärung der intragenerischen Zusammenhänge von *Valerianella* beitragen können. Die vorliegende Untersuchung soll nun bei einer größeren Anzahl von Arten über den verwandtschaftlichen Zeigerwert der charakteristischen

<sup>1</sup> KROK, T. O. B. N. (1864) *Kungl. Svenska Vet.-Akad., N.F. Handl.* **5**, (1), 1.

<sup>2</sup> BOISSIER, E. (1875) *Flora Orientalis* **3**, 94, Genéve-Basel.

<sup>3</sup> HÖCK, F. (1891) in *Die Natürlichen Pflanzenfam.* **4**, (4), 177.

<sup>4</sup> ERNET, D. unveröffentlicht.

<sup>5</sup> ERNET, D. (1972) *Taxon* **21**, 495.

<sup>6</sup> GREGER, H. und ERNET, D. (1971) *Naturwissenschaften* **58**, 416.

TABELLE 1. VERBREITUNG DER FLAVONOID-AGLYCA IN DEN LAUBBLÄTTERN VON *Valerianella*

VALERIANELLA	Sekt. n	Flavone					Flavonole			6-Hydroxy Flavone		Unaufgeklärte Verbindungen	
		L	D	C	A	Ac	Q	I	K	6L	6D	(b)	(d)
<b>Gruppe A</b>													
<i>turkestanica</i>	15												
Regel & Schmalh.		++	+++				++	+++	+++	++			
<i>tuberculata</i> Boiss.	a 8	++	+++				++	+++	+++	++			
<i>uncinata</i> (Bieb.) Durf.	a 8	+++	+++					+++	+++	++			
<i>oxyrrhyncha</i> Fisch. & Mey.	a 8	++	+++				++	++		++			
<i>cymbicarpa</i> C.A. Mey.	b	+++	+++				++	+++	++	++			
<i>triplicaris</i> Boiss. & Buhse	a	++	+++				++	++		+			
<i>stephanodon</i> Coss. & Dur.		++	+++				++	++		+			
<i>szovitsiana</i> Fisch. & Mey.	b	++	++				++	+++		+			
<i>diffracta</i> Boiss.	g 8?	+++	+++				+	+++		++			
<i>sclerocarpa</i> Fisch. & Mey.	b 16?	++	+++					++		+			
<i>lipskyi</i> Lincz.		++	++					+++		+			
<i>antilibanotica</i> Rech. fil.		++	++					+++		+			
<b>Gruppe B</b>													
<i>dactylophylla</i> Boiss. & Hohen.	a 8	++		+++	+++	++							
<b>Gruppe C</b>													
<i>annarella</i> (Lindh.) Krok.		+	+				+	+++		++			
<i>radiata</i> (L.) Durf. var. <i>radiata</i>	45	+++	+++				+	+++					
<i>woodiana</i> (T. & G.) Walp.	44	+++	+++				++	+++					
<i>chenopodiifolia</i> (Pursh) DC.		+++		++	+			+++		+			
<i>ozarkana</i> Dyal.	15	++		++?			++		++				
<i>patellaris</i> (Sull.) Wood	15	++	+++						++				
<i>florifera</i> Shinners	15	++	+++						+				
<b>Gruppe D</b>													
<i>echinata</i> (L.) DC.	c 8	+++	+++				++						
<i>martini</i> Loscos		+++	+++				+	+					
<i>costata</i> (Stev.) Betsche	d	+++	+++					++					
<i>turgida</i> (Stev.) Betsche	f	+++	+++					++					
<i>carinata</i> Lois.	f 8	+++	+++					+					
<i>locusta</i> (L.) Laterrade	d 8	+++	+++										
<i>orientalis</i> (Schlecht.) Boiss. & Bal.	c	+++	+++				+						
<b>Gruppe E</b>													
<i>coronata</i> (L.) DC.	g 7	++		++	+			+					
<i>discoidea</i> (L.) Lois.	g 7	++		++	+	+		+					
<i>obtusiloba</i> Boiss.	g	++		++	+				+				
<i>vesicularia</i> (L.) Moench	g 7	++		++?					+				
<i>kotschyi</i> Boiss.	g	++		++	+								
<i>pumila</i> (L.) DC.	f 7	++		++	+	+		+					
<i>hirsutissima</i> Link.	h	++		++	+	+		+					
<b>Gruppe F</b>													
<i>eriocarpa</i> Desv.	e 8								+++	+++	+++	+++	+++
<i>rimosa</i> Bast.	f 8								+++	+++	+++	+++	+++
<i>dentata</i> (L.) Poll.	e 8								+++	+	+++	+++	+++
<i>muricata</i> (Stev.) W. Bast.	e 8								+++		+++	+++	+++
<i>microcarpa</i> Lois.	e 8								++	+	+++	+++	+++
<i>fallax</i> Krok.									++	+	+++	+++	+++

Sekt. = Sektionsgliederung nach Boissier: a—*Physocoelae*; b—*Sclerocarpace*; c—*Cornigerae*; d—*Locustae*; e—*Siphonocoelae*; f—*Platycarpace*; g—*Coronatae*; h—*Eriocarpace*. n = haploide Chromosomenzahl. **Flavone:** L—Luteolin; D—Diosmetin; C—Chrysoeriol; A—Apigenin; Ac—Acacetin; 6L—6-Hydroxy-luteolin; 6D—vermutlich 6-Hydroxydiosmetin. **Flavonole:** Q—Quercetin; I—Iisorhamnetin; K—Kämpferol. Unaufgeklärte Verbindungen: (b); (d). + + = in größeren Mengen; + + = in kleinen Mengen; + = in Spuren.

Flavonoid-Aglyca informieren. Da in neueren Bearbeitungen der Gattung<sup>7-11</sup> im wesentlichen die Gliederung von Boissier<sup>2</sup> übernommen wurde, soll im folgenden bei allen systematischen Erörterungen dessen System als Bezugspunkt dienen.

#### ERGEBNISSE

Zur Feststellung der Flavonoiddifferenzierung wurden getrocknete Laubblätter von 40 Arten untersucht. Um eine eventuelle Denaturierung der Stoffe während des Trocknungsprozesses zu berücksichtigen, wurden in einigen Fällen auch parallele Untersuchungen an frischen Pflanzen durchgeführt. Es konnte dabei aber keine nennenswerte Veränderung der Flavonoidausstattung beobachtet werden. Die Extrakte wurden hydrolysiert und zweidimensional chromatographiert. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über das Vorkommen charakteristischer Aglyca. Die Gruppierung der Arten wurde vorwiegend nach chemischen, teilweise aber auch nach geographischen Gesichtspunkten (Gruppe A, B, C) vorgenommen. Ganz allgemein ergibt sich daraus für die Gattung ein Vorherrschen von Flavonen.

Die meist asiatischen Arten der Gruppe A weisen die reichhaltigsten Stoffmuster auf: sie werden aus Flavonen und Flavonolen gebildet. Wie bei den meisten übrigen *Valerianella*-Arten wird auch hier die Synthese der am B-Ring zweifach substituierten Verbindungen (Schema 1) bevorzugt. Als Hauptkomponenten treten Diosmetin und Quercetin auf. Im Gegensatz zu den anderen Gruppen wurde bisher nur hier bei einigen Arten Isorhamnetin in größeren Konzentrationen festgestellt. Außerdem kommen in dieser Gruppe aber auch Flavonoide mit einfach substituiertem B-Ring vor: In größeren Mengen wird vor allem das Flavon Acacetin gebildet, während das Flavonol Kämpferol meist nur in Spuren auftritt. Durch den Ausfall von Diosmetin und Quercetin und das Auftreten der Flavone Chrysoeriol und Apigenin erscheint die ebenfalls asiatische *V. dactylophylla* stärker abgesetzt. Diese Art wurde daher in eine eigene Gruppe (B) gestellt.

In der Gruppe C sind die nordamerikanischen Arten zusammengefaßt. Ihre Stoffausstattung mit den Hauptkomponenten Luteolin, Diosmetin und Quercetin ist der der Gruppe A weitgehend ähnlich. Die Flavonoide mit einfach substituiertem B-Ring sind hier meist nur in Spuren vertreten. Etwas abweichend verhält sich dabei *V. amarella* durch das deutliche Vorherrschen der Flavonole, Quercetin und Kämpferol, weiters *V. chenopodiifolia* und *V. ozarkana* durch das Vorkommen von Chrysoeriol. Die vorwiegend mediterran-orientalischen Sippen der Gruppen D und E werden durch das Flavon Luteolin und seinen beiden Methyläthern Diosmetin und Chrysoeriol gekennzeichnet; wobei für die Gruppe D Diosmetin, und für die Gruppe E besonders Chrysoeriol charakteristisch ist.

Im Gegensatz zu den relativ einfachen Flavonoidgarnituren der bisher besprochenen Gruppen setzt sich die ebenfalls mediterran-orientalische Gruppe F durch das Auftreten mehrerer, meist noch nicht eindeutig aufgeklärter Substanzen deutlich ab. Trotz der Anwendung verschiedener Laufmittelgemische konnte hier keine zufriedenstellende chromatographische Trennung der Hydrolysate erzielt werden. Durch Besprühen mit Diphenylborsäure-2-aminoäthylester konnte jedoch eine Farbdifferenzierung der sich überlappenden Flecke erhalten werden. Erst nach Fraktionierung der Glykosidkomponenten und anschließender Hydrolyse konnte hier das bei *V. eriocarpa* bereits an anderer Stelle<sup>12</sup> nachgewiesene

<sup>7</sup> LINCZEVSKY, I. A. (1958) *Flora URSS* 23, 642, Moskau-Leningrad.

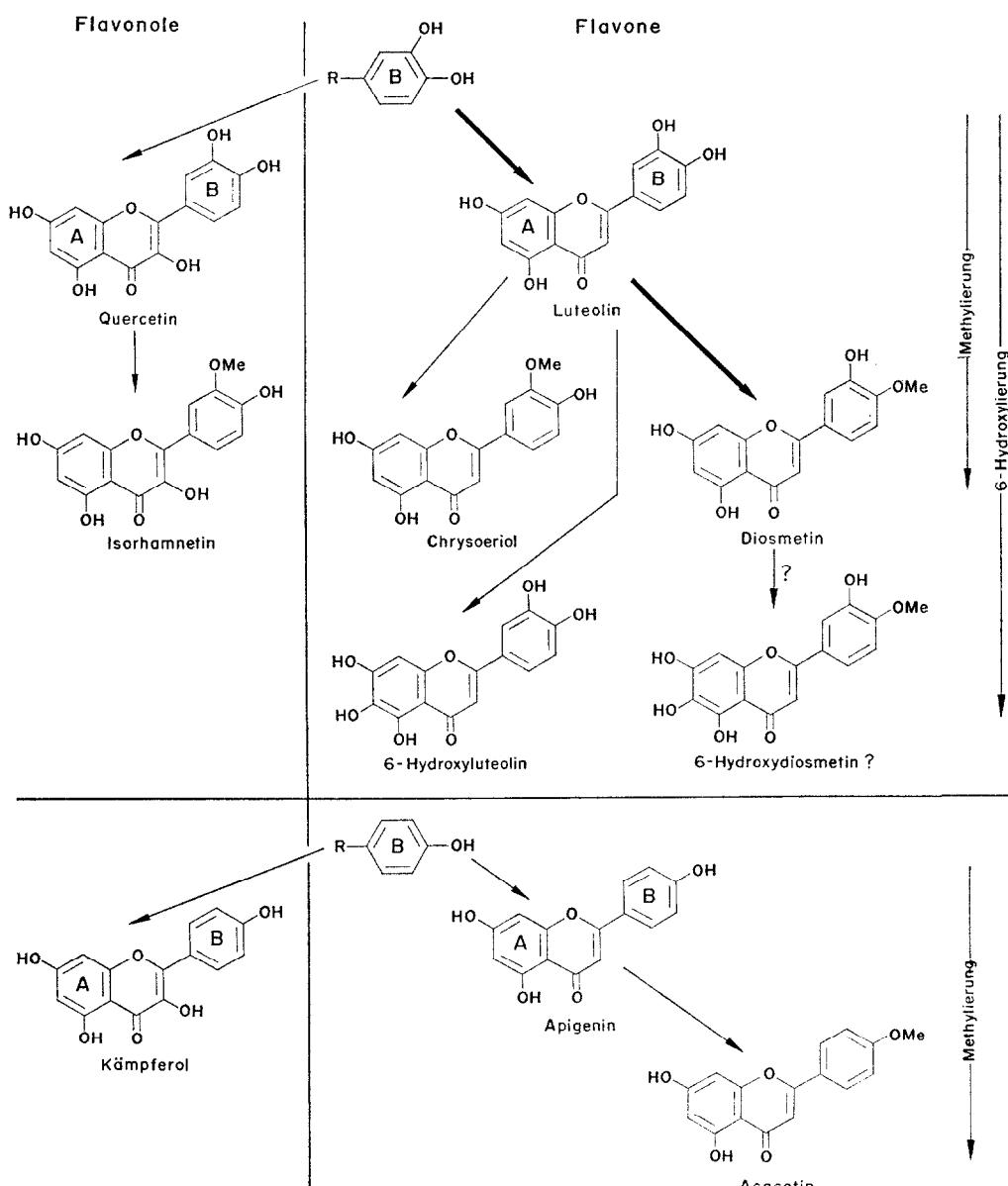
<sup>8</sup> HADAČ, E. (1961) *Bull. Coll. Sci. Baghdad* 6, 31.

<sup>9</sup> SANDA, V. und TUTUNARU, V. (1965) *Comunicări Bot. (Bururești)* 3, 143.

<sup>10</sup> COODE, M. J. E. (1967) *Not. Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 27, 219.

<sup>11</sup> RECHINGER, K. H. (1969) *Flora Iranica*, Lfg. 62, 1, Graz.

<sup>12</sup> HARBORNE, J. B. und WILLIAMS, C. A. (1971) *Phytochemistry* 10, 367.

SCHEMA 1. ARBEITSHYPOTHESE ZUR PHYLOGENIE DER FLAVONOID-BIOSYNTHESEWEGE BEI *Valerianella*.

6-Hydroxyluteolin festgestellt werden. Das dort<sup>12</sup> ebenfalls beschriebene Vorkommen von Luteolin konnte bei dieser Untersuchung nicht bestätigt werden, dagegen ergaben sich Hinweise auf das Vorkommen eines Methyläthers vom 6-Hydroxyluteolin (vermutlich 6-Hydroxydiosmetin). Die übrigen, meist in stärkerer Konzentrationen vertretenen (bei Tageslicht gelb und im UV-Licht dunkelbraun bis schwarz erscheinenden) Substanzen lassen aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens und ihrer spektralanalytischen Daten auf

Chalkone oder Flavanone bzw. diesen nahestehenden chinoiden Verbindungen schließen.

In weitgehender Übereinstimmung mit der genannten Artengruppierung stehen auch die bisher erhaltenen Glykosidmuster von *Valerianella*. Vorläufige Untersuchungen zeigten, daß hier vermutlich Quercetin als 3-Rhamnoglucosid und Luteolin und Diosmetin als 7-Rhamnoglucosid weit verbreitet sind. Es ist geplant, über eine eingehendere Analyse der Glykosidkomponenten in einer anderen Arbeit zu berichten.

#### DISKUSSION

Aufgrund der vorliegenden Untersuchung erscheint die Flavonoidausstattung von *Valerianella* weitgehend nach verwandtschaftlichen Gesichtspunkten ausgerichtet. Zusammen mit neuen morphologischen und karyologischen (*vide* Tabelle 1) Daten ergeben sich dadurch Ansätze für eine verbesserte Gattungssystematik. Die Zusammensetzung der Stoffmuster und ihre Verbreitung lassen ferner auf eine mögliche Abfolge in der Flavonoid-Biosynthese und damit vielleicht auch auf die stammesgeschichtliche Entfaltung der Gattung schließen.

Die mit Ausnahme der nordafrikanischen *V. stephanodon* fast ausschließlich in Asien verbreiteten Arten der Gruppe A gehören nach Boissier vorwiegend den beiden Sektionen *Physocoelae* (a) und *Sclerocarpea* (b) an (*vide* Tabelle 1). Bereits, Höck<sup>3</sup> zweifelte aber daran, daß diese aufgrund der unterschiedlichen Entwicklung der sterilen Fruchtfächer durchgeführte Aufteilung den natürlichen Verhältnissen entspricht. Die einheitliche Flavonoidausstattung der Gruppe spricht jedenfalls auch für eine taxonomische Zusammenfassung. Ferner lassen die Flavonoidmuster eine nähere Beziehung zur Gruppe C vermuten, was möglicherweise auch durch die sekundäre Chromosomengrundzahl von *V. turkestanica* ( $x = 15$ ) zum Ausdruck kommt.

Die ebenfalls asiatische *V. dactylophylla* (Gruppe B) zeigt durch das Vorkommen von Chrysoeriol und das Fehlen von Flavonolen Ähnlichkeiten mit der Gruppe E. Auch bestimmte morphologische Merkmale weisen in diese Richtung, während z.B. die Chromosomengrundzahl  $x = 8$  noch stärker an Gruppe A erinnert.

Durch die Bildung von Flavonolen ähneln die nordamerikanischen Arten der Gruppe C zwar der Gruppe A. Wegen ihrer geographischen Isolierung und weitgehender morphologischer und karyologischer Einheitlichkeit (sekundäre Chromosomengrundzahl  $x = 15$ ) sind sie aber als eigenständiger Verwandtschaftskreis zu betrachten.

Die vorwiegend mediterran-orientalischen Arten der Gruppe D sind nach Boissier den drei Sektionen *Cornigerae* (c), *Locustae* (d) und *Platycoelae* (f) zuzuordnen. Zwischen den dazu gehörigen Arten bestehen aber sowohl in der Flavonoidausstattung (Vorherrschen von Luteolin und Diosmetin) als auch in verschiedenen morphologischen Merkmalen so auffallende Ähnlichkeiten, daß eine Vereinigung dieser Arten in eine Sektion erwogen werden muß. Darüber hinaus läßt die Stoffgarnitur dieser Gruppe Affinitäten zu der nordafrikanisch-mediterranen Gattung *Fedia* erkennen,<sup>6</sup> die auch durch morphologische Merkmale unterstrichen werden.

Besonders einheitlich sowohl in chemischer (Vorherrschen von Chrysoeriol), als auch in morphologischer und karyologischer Hinsicht (Chromosomengrundzahl  $x = 7$ ) erweisen sich die mediterran orientalischen Arten der Gruppe E. Sie umfaßt in erster Linie Vertreter der Boissier'schen Sektion *Coronatae* (g). Die wegen der stärker reduzierten sterilen Fruchtfächer von Boissier vorgeschlagene Abtrennung von *V. hirsutissima* als eigene Sektion *Eriocephalae* (h) entspricht demnach wohl nicht den natürlichen Verhältnissen. Diesbezügliche Zweifel wurden schon an anderer Stelle<sup>10</sup> geäußert.

In der Gruppe *F* finden sich vor allem die von Boissier zur Sektion *Siphonocoelae* (e) zusammengefaßten, vorwiegend mediterran orientalischen Arten wieder. Die sehr kennzeichnende und von den übrigen Arten der Gattung ziemlich abweichende Stoffausstattung (6-Hydroxyflavone und andere noch unbekannte Verbindungen) deutet auf eine etwas isolierte Stellung dieser Verwandtschaftsgruppe hin. Die Zuordnung von *V. rimosa* zur Sektion *Platycoelae* (f) aufgrund der größeren sterilen Fruchtfächer scheint daher in Frage gestellt.

Die bisher erhaltenen chemischen Daten zeigen eine derart auffallende Übereinstimmung mit fruchtanatomischen und anderen morphologischen, sowie cytologischen und geographischen Aspekten, daß dadurch eine natürlichere systematische Gruppierung von *Valerianella* zu erreichen sein müßte. Vor allem wird daraus ersichtlich, daß der unterschiedlichen Entwicklung der sterilen Fruchtfächer eine zu große systematische Bedeutung beigemessen wurde. Dies kommt vor allem in der Sektion *Platycoelae* (f) zum Ausdruck, die nach den gegenwärtigen Befunden in jeder Hinsicht willkürlich erscheint (*vide* Tabelle 1).

In Anbetracht der bisherigen Erkenntnisse über die chemischen Progressionen der Angiospermen-Flavonoide<sup>13-15</sup> ergeben sich für *Valerianella* folgende Biosynthese-Vorstellungen (Schema 1): Dem abgeleitet krautig-annuellen Wuchs der Gattung entsprechend wird hier besonders die Flavon-Synthese gefördert, während die Flavonolausstattung einer zunehmenden Reduktion unterliegt. Von untergeordneter Bedeutung sind ferner auch die am B-Ring einfach substituierten Verbindungen (z.B. Apigenin), während die Synthese der am B-Ring zweifach substituierten Stoffe, besonders des Luteolins, den Schwerpunkt des Flavonoid-Stoffwechsels darstellt. Ein wichtiger, für die Gattung charakteristischer Synthese-Schritt ist weiters in der Methylierung zu sehen, wobei aber noch nicht sicher ist, ob sie auf der Stufe des Flavons bzw. Flavonols oder vielleicht schon früher erfolgt. Interessant dabei ist das Auftreten zweier, offenbar sehr spezifischer Enzyme, die einerseits die Bildung des hier sehr verbreiteten Diosmetin und andererseits die des isomeren Chrysoeriol bewirken. Eine andere, zweifellos aber sehr späte Synthese-Etappe führt schließlich zur Einführung der 6-Hydroxy Gruppe des 6-Hydroxyluteolin und des vermutlich auch hier vorkommenden 6-Hydroxydiosmetin.

Wird diese Biosynthese-Interpretation akzeptiert, so nimmt die Gruppe *A* mit ihren Flavonol- und Flavongarnituren eine ursprüngliche und zentrale Stellung in der Gattung ein. Gruppe *C* aus dem östlichen und südlichen Nordamerika resultiert offenbar aus einer frühen transatlantischen Wanderung verbunden einerseits mit Polyploidisierung, andererseits aber mit weitgehender Konservierung der ursprünglichen Flavonoidausstattung. Weitere parallele Entwicklungslinien führen offensichtlich von der Gruppe *A* zu den mediterran-orientalischen Gruppen *D* und *E*, die durch die Reduktion der Flavonole chemisch stärker abgeleitet erscheinen. Hier ist dann möglicherweise auch die weiter abseits stehende Gruppe *F* anzuschließen: Durch das Zurücktreten der für die Gattung üblichen Flavonoide und das Vorkommen von 6-Hydroxyflavonen wirken die Arten dieser Gruppe besonders fortgeschritten.

Weitere Merkmalsstudien werden zeigen müssen, in welchem Ausmaß sich diese dynamisch-chemische, stammesgeschichtliche Interpretation als Arbeitshypothese bestätigen läßt.

<sup>13</sup> BATE-SMITH, E. C. (1962) *J. Linn. Soc.* **58**, 95.

<sup>14</sup> HARBORNE, J. B. (1966) in *Comparative Phytochemistry* (SWAIN, T., ed.), p. 271, Academic Press, London.

<sup>15</sup> KUBITZKI, K. (1968) *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **80**, 757.

TABELLE 2. UV-SPEKTRALDATEN DER LUTEOLINDERIVATE

Verbindung	MeOH	NaOMe	$\lambda_{\max}$ (nm) in		
			AlCl <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub> -HCl	NaOAc-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
Diosmetin	240,* 250, 266, 343	383	359, 386	350, 380*	346
Chrysoeriol	241, 249,* 267, 345	405	364, 388	350, 384	349
6-Hydroxyluteolin	234,* 245,* 281, 346	390	414	372	370
6-Hydroxydiosmetin	233,* 244,* 284, 343	374	380	365	

\* Schulter.

### EXPERIMENTELLES

*Pflanzenmaterial.* Die zur Extraktion verwendeten getrockneten Laubblätter stammten von (im Botanischen Garten der Universität Graz) kultivierten, teilweise aber auch wild gesammelten Pflanzen, von denen Herbarbelege angelegt wurden. Diese Belege, sowie eine Liste über andere Herbarherkünfte sind im Herbarium des Botanischen Instituts der Universität Graz (GZU) hinterlegt.

*Extraktion und Identifizierung der Flavonoide.* Die Blattproben wurden ca. 10 min mit kochendem H<sub>2</sub>O extrahiert, der Auszug eingeengt und mit MeOH aufgenommen. Die vom Niederschlag befreite MeOH Lösung wurde nach neuerlichem Einengen zur Chromatographie der Glykoside verwendet. Die Aglyca wurden daraus durch einstündige Hydrolyse mit 1 N HCl auf 100° gewonnen, mit ÄtOAc ausgeschüttelt und mittels Papier-(Schleicher und Schüll Nr. 2045 b) und DC-chromatographie (Cellulose-Alufolien, Merck) getrennt. Neben den Laufmittelgemischen n-BuOH-HOAc-H<sub>2</sub>O (4:1:5), PhOH-H<sub>2</sub>O, Forestal bewährte sich hier besonders CHCl<sub>3</sub>-HOAc (2:1), wassergesättigt<sup>16</sup> für die 1. Dimension und 30% HOAc für die 2. Dimension. Die Identifizierung der Flavonoide erfolgte durch direkten Vergleich mit Testsubstanzen und durch UV-Spektralanalyse (Beckman DB-GT).

*Anerkennung*—Der Österreichischen Nationalbank danken wir für den Ankauf eines Spektralphotometers.

<sup>16</sup> EGGER, K. (1961) *J. Chromatog.* **5**, 74.