

Sukkulenz – Induktion bei *Kalanchoe bloßfeldiana* im Langtag durch eine lipophyle Fraktion aus blühenden Kalanchoe und MS-Identifikation von Pterosteron

Succulence – Induction in *Kalanchoe bloßfeldiana* under Long-Day Conditions by a Lipophilic Fraction out of Flowering Kalanchoe and MS-Identification of Pterosterone

Boris Janistyn

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg i. Br. Schänzlestr. 1, D-7800 Freiburg i. Br.

Z. Naturforsch. **36 c**, 455–458 (1981); received February 9, 1981

Kalanchoe bl., Succulence, Pterosterone

Succulence-induction in *Kalanchoe bloßfeldiana* is demonstrated under long-day condition by application of a lipophilic fraction from flowering *Kalanchoe*. Different preparative TC separation steps yielded a partial purification of this fraction and the MS-identification of pterosterone (10^{-6} M), which is not necessary correlated with the above described physiological activity.

Bei der Kurztagspflanze *Kalanchoe bloßfeldiana* (Crassulaceae) ist im Kurztag (K. T.) eine deutlich verstärkte Sukkulenz und der zeitlich hiermit verbundene Eintritt in die generative Phase (Blütenbildung) zu beobachten. Im Langtag (L. T.) hingegen wächst die Pflanze streng vegetativ [1, 2].

Die gute Charakterisierbarkeit der photoperiodisch bedingten morphologischen Veränderungen führten einerseits zu Untersuchungen über damit direkt einhergehende physiologische Veränderungen, andererseits zu Versuchen, die morphologischen Merkmale substantiell zu induzieren. Im ersten Fall wurde eine mit der Blüh- und Sukkulenz-Induktion zeitgleiche und phytochromabhängige lag-Phase (7 Tage) für die Aktivierung verschiedener Enzymsysteme gefunden [3]. Im zweiten Fall ließ sich zeigen, daß Preßsaft aus Blättern vegetativer Pflanzen in Blätter induktiv gehaltener Pflanzen injiziert, das Blühen verhindert; die Umkehrung der Versuche ergab keine Wirkung [4].

Über den Bereich von *Kalanchoe* hinaus häuften sich in den letzten Jahren Befunde, daß lipophyle Inhaltsstoffe, insbesondere Steroide, für die genannten Merkmalsveränderungen in Frage kommen könnten [5]. So wurde aus *Achlya bisexualis*, einem Wasserpilz, das erste steroidale Sexualhormon im Pflanzenreich, Antheridiol [6] und aus Rapspollen ein neuer steroidaler Wuchsstoff, Brassinolid [7] isoliert und charakterisiert.

Um festzustellen, ob lipophylen Inhaltsstoffen bei *Kalanchoe* ein physiologischer Respons zugeordnet werden könnte, wurden Methylenchloridextrakte bis zu der Stufe einer lipophylen Gesamtfraction vorgeeignet und sodann appliziert.

Material und Methoden

Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Beckmann DB Spektrometer, die IR-Spektren mit einem Perkin-Elmer-Gerät, Modell 257 und mit einem Beckmann, Mikrolab 600 Computing IR-Spectrophotometer aufgenommen.

Pflanzenmaterial

Die Samen von *Kalanchoe bloßfeldiana* wurden von der Samenhandlung Hambrecht, D-7800 Freiburg bezogen.

Aufzucht

Die Samen wurden im Warmhaus zum Keimen gebracht und die Keimlinge bei einer Höhe von 1–2 cm pikiert. Diese wurden im Kalthaus unter L. T. (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bis zur Ausbildung von 6–8 Blattpaaren wachsen gelassen.

Photoperiodische Bedingungen

Je 300 Pflanzen wurden in Phytokammern 10000 Lux, 22 °C, 65% rel. Luftfeuchte) unter K. T. (8 h

Reprint requests to Dr. Boris. Janistyn.
0341-0382/81/0500-0455 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Licht, 16 h Dunkelheit) und L. T. (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) gehalten. Alle unter K. T. gehaltenen Pflanzen zeigten nach 7–8 Tagen steigende Sukkulenz und nach 34 Tagen gut ausgebildete Blütenstände.

Aufarbeitung

Die Pflanzen wurden ohne Wurzeln geerntet (Frischgewichte: K. T. 2800 g; L. T. 3010 g) unter fl. Stickstoff zerkleinert und bei -20°C lyophilisiert (Trockengewichte: K. T. 260 g; L. T. 300 g). Das Pflanzenmaterial wurde sodann jeweils zwei Mal mit je 1,5 l Methylenchlorid am Soxhlet über 48 h extrahiert und das Methylenchlorid am Rotationsverdampfer abgezogen (Rückstände; K. T. 28,50 g; L. T. 30,41 g). Beide Rohextrakte wurden mit je 150 ml Dimethylformamid aufgenommen und über 72 h im Kutscher-Steudel mit 2,5 l Petroläther ($40-60^{\circ}\text{C}$) perkoliert. Der Dimethylformamidauszug diente einerseits zur Abtrennung der Hauptmenge an Chlorophyll, andererseits zur Untersuchung der bei *Kalanchoe* bekannten Säureakkumulation [3, 8]. Die abgetrennten Petrolätherphasen wurden am Rotationsverdampfer abgezogen und die Rückstände im Hochvakuum bei 22°C getrocknet; K. T.: 3,64 g, L. T.: 2,92 g. Mittels Säulenchromatographie (150 cm \times 5 cm) an Kieselgel (E. Merck)/Äthylacetat wurden Chlorophyllreste und die Carotinoide abgetrennt. Alle weiteren mit Äthylacetat eluierten Fraktionen wurden zusammengefaßt und ergaben nach Abziehen des Elutionsmittels: K. T.: 2,230 g und L. T.: 1,120 g.

Sukkulenzwertbestimmung

Von 33 etwa gleich großen L. T. Pflanzen wurden 9 für die Kontrolle und je 12 zur Applikation der jeweiligen K. T.- und L. T.-Extrakte unter L. T. Bedingungen gehalten. Von jedem Extrakt wurden 600 mg mit 600 mg Lanolin (DAB 7, Fa. Roth) gründlich verrieben und je 50 mg auf ein oder zwei (je nach Blattgröße) der untersten Blätter blattoberseitig aufgestrichen. Anschließend wurden diese Blätter blattober- und -unterseitig mit Aluminiumfolie vollständig abgedeckt. Bei den Kontrollpflanzen

wurde nur mit Lanolin ebenso verfahren. Im Abstand von 3–4 Tagen wurden je Pflanze drei der oberen Blätter dekapiert, die Blattoberflächen bestimmt, (Größte Länge \times Größte Breite), die Blätter gewogen und über Nacht bei 105°C im Trockenschrank belassen und wieder gewogen (Differenz \approx Wassergehalt). Der Quotient: Wassergehalt [g]/Oberfläche [cm^2] ist gleich dem relativen Sukkulenzwert [9].

Präparative DC

Die verbliebenen 1,630 g K. T. – und 0,520 g L. T.-Extrakte wurden jeweils der präp. DC an Kieselgelfertigplatten F-254 (E. Merck) mit dem Laufmittelgemisch Aceton-Benzol (50:50, v/v) unterworfen. Unter Teilabdeckung der Platten wurde mit Antimon-III-chlorid (SbCl_3 gesättigt in CHCl_3 ; $110^{\circ}\text{C}/10\text{ min.}$) detektiert.

Die Zonen mit den R_f -Werten: 0,75 und 0,58 (stark im K. T.); 0,37; 0,12 und 0,054 wurden eluiert (Äthylacetat). Die Eluate mittels verschiedener Laufmittel, Umkehrphasentechnik (Undecan) und Silicagel G (E. Merck) – Silbernitrat (10%) – Schichten weiter gereinigt und die IR- und UV-spektroskopischen Daten ermittelt. Aus der Zone 0,75 ließ sich neben anderen, noch nicht identifizierten Steroidestern, Cholesterinacetat IR-spektroskopisch nachweisen: IR (KBr): 2960, 1740, 1470, 1445, 1370, 1250 und 1045 cm^{-1} . Die Zone 0,58 ergab nach weiterer Auftrennung drei, für *Kalanchoe* bereits bekannte Verbindungen, welche im IR identisch waren mit authentischem: β -Sitosterin, Cholesterin und Stigmasterin [10].

Die Zonen 0,37, 0,12 und 0,054 lieferten folgende Spektraldaten:

Zone: 0,37

IR (KBr): 3560, 3500, 2910, 1640, 1600, 1340, 1250, 1080, 1020 und 790 cm^{-1} . – UV (CH_3OH): max: 241 nm. – Fp.: $220-222^{\circ}\text{C}$.

Zone: 0,12

IR (KBr): 2920, 2850, 1780, 1460, 1375, 1260, 1090, 1020 und 800 cm^{-1} . – UV (CH_3OH): max. 244 nm.

R_f -Werte der K. T.-Zonen:	0,82	0,75	0,58	0,54	0,45	—	0,25	0,15	0,12	0,054
R_f -Werte der L. T.-Zonen:	0,82	0,75	0,58	—	0,45	0,37	0,25	0,15	—	—

Zone: 0,054

IR (KBr): 3440, 2920, 1650, 1630 w, 1440, 1370, 1240, 1215, 1050 und 875 cm^{-1} . – UV (CH_3OH): max: 243 nm. – UV ($\text{CH}_3\text{OH} + \text{HCl}$): max: 242 und 296 nm. – Fp.: 228–230 °C.

Massenspektrum der Substanz aus der Zone: 0,054

Das Massenspektrum der underivatisierten Substanz wurde per Direkteinlaß mittels eines Finnigan GC (9610) 1 MS Model 4000 aufgenommen (Elektronenenergie: 70 eV., E. J.; Quellentemp.: 200 °C; Verdampfungstemp.: 300–320 °C). Die gefundenen Massenpeaks (Molekülion: $m/e = 480$; 462, 444, 426, 408, jeweils 1 H_2O ; 363, 345, 328, 327, 117, 99 und 81) stimmen mit der Literatur [11, 12] und authentischem Vergleichsmaterial überein; ebenso die gegenüber Ecdysteron geringere Peakintensität der Massen 99 und 81 [12].

Dimethylformamidauszüge

Die Hauptmenge des DMF wurde im Hochvakuum abdestilliert und die so erhaltenen Extrakte direkt der präp. DC mit dem Laufmittelgemisch: Petroläther (40–60 °C)-Diäthyläther-Eisessig (70:30:2, v/v) unterworfen. Bei der Vordetektion mittels Wasserbesprühung (Unterscheidung von höheren und niederen Carbonsäuren) fiel für den K. T. DMF-Extrakt eine am Start verbleibende Verbindung auf ($\text{SbCl}_5/110$ °C; gelbliche Fluoreszenz bei 365 nm). Durch weitere präp. DC mit der Oberphase des Laufmittelgemisches: Äthylacetat-Essigsäure-Methanol-Cyclohexan-Wasser (140:30:35:10:100, v/v) konnte die Verbindung aus der Zone mit dem R_f -Wert von 0,60 in geringer Menge eluiert ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) werden. Die Verbindung hat eine ölige Konsistenz und folgende Spektraldaten:

IR (KBr): 3400, 3005, 2960, 2860, 1715, 1605, 1455, 1410, 1240, 975 und 700 cm^{-1} .

UV ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): max: 212, (s 242) 248, 254 und 266 nm.

Ergebnisse und Diskussion

Wie aus der Abb. 1 ersichtlich ist, stiegen die Sukkulenzwerte gegenüber der Kontrolle nach einer, wie auch unter K. T.-Bedingungen üblichen, lag-Phase von 7 Tagen [2, 3] bis zu einem Maximalwert, welcher über weitere 4 Wochen konstant blieb. Die nach dem 30–34 Tag unter K. T.-Bedingungen übliche Infloreszenzbildung unterblieb völlig. Es ist dies ein weiteres Beispiel dafür, daß unter bestimmten Bedingungen Sukkulenz und Infloreszenzbildung voneinander getrennt auftreten können [1, 2].

Die Applikation der lipophylen L. T.-Fraktion ergab hingegen eine gegenüber der Kontrolle gerade noch meßbare Sukkulenzabnahme.

Die bisherige Untersuchung der K. T.- und L. T.-Fraktionen bestätigte das Vorliegen von: β -Sosterin, Cholesterin und Stigmasterin in *Kalanchoe* [10]. Zusätzlich konnte in beiden Fraktionen Cholesterinacetat nachgewiesen werden. Die Konzentrationen der isolierten Steroide, wie auch der vorher abgetrennten Carotinoide lagen im K. T. um 50% über denen des L. T.

Da die IR- und UV-Daten in der K. T.-Zone mit dem R_f -Wert: 0,054 vorliegenden Substanz auf ein mehrfach hydroxyliertes Steroid mit einer 14-Hydroxy-7-en-6-on-Gruppierung [11] hinwiesen, lag es nahe, hierfür ein Phytoecdysyon anzunehmen. Das Massenspektrum bestätigte das Vorliegen von Pterosteron [12]. Die Konzentration liegt in der Größenordnung von 10^{-6} M. Eine aus dem K. T.-Dimethylformamidauszug isolierte Verbindung zeigt ebenfalls

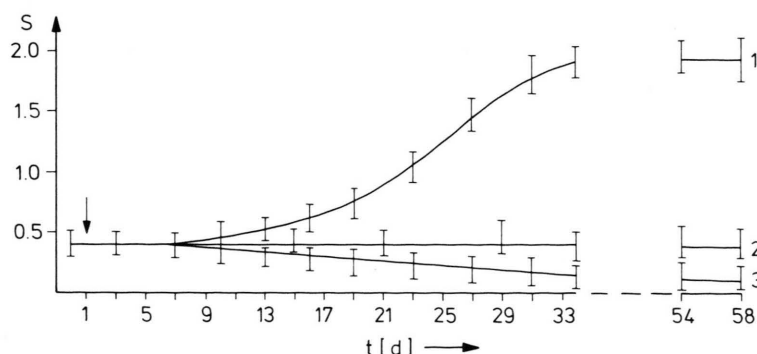


Abb. 1. Änderung des Sukkulenzwertes S (Wassergehalt[g]/Blattoberfläche[cm²]) gegenüber der Zeit t in Tagen nach Applikation der K. T.-Fraktion (Kurve 1) und der L. T.-Fraktion (Kurve 3) gegenüber der Kontrolle (Kurve 2); I, größte Abweichung aus je 3 voneinander unabhängigen Sukkulenzwertbestimmungen (s. Text).

interessante IR- und UV-spektroskopische Daten. Danach dürfte es sich um eine höhere ungesättigte, mehrfach hydroxylierte Carbonsäure handeln, evtl. mit einem Cyclopentanring (IR: 975 cm^{-1}). Eine Strukturaufklärung der letztgenannten Verbindung ist in Vorbereitung.

Die bisherigen Untersuchungen lassen auf weitere, teilweise nur im K. T. vorkommende Steroide schließen. Somit können auch noch keine Rückschlüsse auf die Substanz bzw. Substanzen gezogen

werden, die in der K. T.-Fraktion für eine Sukkulenzauslösung im L. T. in Frage kommen könnten.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. H. Rimpler danke ich für die Vergleichssubstanzen Pterosteron und Ecdysteron, Frau M. Weber für die massenspektrometrischen Aufnahmen und Herrn E. Thoma für geschickte Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

- [1] R. Harder u. J. Lösing, *Naturwissenschaften* **6**, 190 (1946).
- [2] R. Harder, *Naturwissenschaften* **2**, 3 (1946).
- [3] J. Bulfest, D. Guerrier u. Q. Queiroz, *Plant Physiol.* **57**, 220 (1973).
- [4] R. J. Pryce, *Phytochemistry*, **11**, 1911 (1972).
- [5] J. A. D. Zeevaart, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **27**, 321 (1976).
- [6] J. A. Edwards, J. S. Mills, J. Sundeen u. J. H. Fried, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 1248 (1968).
- [7] M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. Mandava, J. F. Worley, J. D. Warthen Jr., G. L. Steffens, J. L. Flippin-Anderson u. J. C. Cook Jr., *Nature* **281**, 216 (1979).
- [8] R. Th. Soderstrom, *Am. J. Botany* **49**, 850 (1962).
- [9] W. Ruhland, *Handbuch d. Pflanzenphysiologie* **IV**, 723; Springer-Verlag, Berlin 1958.
- [10] R. J. Pryce, *Phytochemistry* **10**, 1303 (1971).
- [11] P. Karlson, H. Hoffmeister, H. Hummel, P. Hocks u. G. Spiteller, *Chem. Ber.* **98**, 2394 (1965).
- [12] T. Takemoto, S. Arihara, Y. Hikino u. H. Hikino, *THL*, No. **3**, 375 (1968).