

**Untersuchungen zur Gibberellinkonjugation in Gerstenkaryopsen
(*Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome)**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Bianca Senns
geb. am: 27. 08. 1968 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. G. Adam
2. Prof. Dr. habil. F. Bangert
3. Prof. Dr. habil. H. Müller

Halle/Saale, den 08. 10. 1999

Bibliographische Beschreibung

Senns, Bianca

Untersuchungen zur Gibberellinkonjugation in Gerstenkaryopsen
(*Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome)

106 S., 35 Abb., 21 Tab., 118 Lit.

Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

Dissertation A

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Phytohormongruppe der Gibberelline	1
1.2	Die Gibberellinbiosynthese der höheren Pflanzen	2
1.3	Gibberellinstruktur und physiologische Wirkung	6
1.4	Gibberellinabhängige Induktion von Enzymen	7
1.5	Die Gibberellinkonjugation	8
1.6	Zielstellung der Arbeit	13
2	Experimenteller Teil	14
2.1	Das Pflanzenmaterial	14
2.2	Die Extraktion der Gerstenkaryopsen	14
2.3	Die chromatographische Reinigung der Extrakte	16
2.4	GC-MS	17
2.4.1	Geräteparameter und Bedingungen	17
2.4.2	Derivatisierung	19
2.4.3	Interne Standards	20
2.4.4	Bestimmung der Kalibrierungskurven für Gemische aus markierten und unmarkierten Standards	22
2.5	Wiederfindungsraten	23
2.6	Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	26
2.6.1	Identifizierung von GA-O-glucosiden und Gibberellinen in den reifen Karyopsen von <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Himalaya und cv. Salome	26
2.6.2	Quantifizierung der GA-O-glucoside und der Gibberelline in den Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome während der Reifung	28
2.6.3	Metabolische Markierung des GA ₂₀ -13-O-Glc in cv. Himalaya und cv. Salome durch Applikation von [17-D ₂]GA ₂₀ , Nachweis der metabolisch gebildeten [17-D ₂]-markierten Verbindungen und Keimung der mit [17-D ₂]GA ₂₀ gefütterten Karyopsen (Rekonversion)	33
2.6.4	Kompartimentierung von GA ₂₀ und GA ₂₀ -13-O-Glc in den reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome	36

2.7	Bestimmung der α -Amylase in inkubierten Kompartimenten	38
3	Ergebnisse und Diskussion	41
3.1	Identifizierung der GA-O-glucoside und der Gibberelline in den reifen Gerstenkaryopsen von <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Himalaya und cv. Salome	41
3.1.1	Voraussetzungen	41
3.1.2	Ergebnisse	43
3.1.3	Diskussion	49
3.2	Quantifizierung der Pools von GA ₂₀ , GA ₈ , GA ₂₀ -13-O-Glc und GA ₈ -2-O-Glc während der Samenreifung von cv. Himalaya und cv. Salome mittels Isotopenverdünnung in der GC-MS	51
3.2.1	Voraussetzungen	51
3.2.2	Ergebnisse	54
3.2.3	Diskussion	62
3.3	Metabolische Markierung von GA ₂₀ -13-O-Glc und Versuche zu seiner Rekonversion während der Keimung der Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome	64
3.3.1	Voraussetzungen	64
3.3.2	Ergebnisse	65
3.3.3	Diskussion	74
3.4	Kompartimentierung von GA ₂₀ -13-O-Glc und GA ₂₀ in reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome	75
3.4.1	Voraussetzungen	75
3.4.2	Ergebnisse	76
3.4.3	Diskussion	78
3.5	Bestimmung der α -Amylase in den Kompartimenten von cv. Himalaya und cv. Salome während der Keimung	78
4	Zusammenfassung	80
5	Literaturverzeichnis	83
6	Anhang	

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

D	Deuterium
DEAE-	Diethylaminoethylen-
FG	Frischgewicht
FS	Full scan
GA	Gibberellin
GA-GE	Gibberellinglucosylester
GA-O-glucosid (Glc)	Gibberellin-O-glucosid
ID	Innendurchmesser
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
NF	Neutrale Fraktion
RT	Raumtemperatur
R ^I	Retentionsindex
SF	Saure Fraktion
SIM	Selected Ion Monitoring
Stl	Stammlösung
TKM	Tausendkornmasse
T	Tritium
u	uniform markiert

1 Einleitung

1.1 Die Phytohormongruppe der Gibberelline

Im Jahre 1926 wurde durch die Arbeiten des japanischen Phytopathologen Kurosawa die Grundlage für die Entdeckung der Gibberelline als phytotoxisches bzw. bioaktives Prinzip des pathogenen Pilzes *Gibberella fujikuroi* gelegt [1]. Dieser Pilz befällt Reispflanzen und bewirkt durch das Ausscheiden eines Wirkstoffes ein pathologisches Längenwachstum, die "Bakanae Krankheit". Im Jahre 1938 gelang den japanischen Forschern Yabuta und Sumiki die Isolierung und Kristallisation einer biologisch aktiven Substanz aus dem Kulturmedium dieses Pilzes. Bei der isolierten Substanz, welche als Gibberellin (GA) bezeichnet wurde, handelte es sich jedoch um ein Gemisch strukturell verwandter Verbindungen [2]. Erst 1954/55 gelang die Strukturaufklärung der Gibberellinsäure (GA₃), als erster Verbindung einer neuen Substanzklasse, den Gibberellinen [3, 4].

Eine in den Folgejahren einsetzende intensive Bearbeitung der Gibberelline und ihrer Wirkungen zeigte, daß die exogene Applikation von Gibberellinen eine Reihe pflanzlicher Wachstums- und Entwicklungsprozesse beeinflusst. Diese Befunde führten bald zu der Schlußfolgerung, daß die Gibberelline auch in höheren Pflanzen endogen vorkommen könnten [5-8].

Das erste aus einer höheren Pflanze isolierte Gibberellin war GA₁, welches MacMillan und Suter 1958 aus den unreifen Samen von *Phaseolus coccineus* isolierten [9].

Standen am Anfang nur klassische Methoden der Strukturaufklärung in Verbindung mit Biotests für die Isolierung zur Verfügung, so wurden mit der Entwicklung und dem Einsatz neuer Analysemethoden rasch weitere Gibberelline sowohl aus pilzlichem als auch pflanzlichem Material isoliert. Bis heute sind insgesamt 116 Gibberelline isoliert und strukturell aufgeklärt worden [10].

Nach einer Konvention, vorgeschlagen von MacMillan und Takahashi im Jahre 1968, werden alle natürlich vorkommenden und strukturell aufgeklärten Gibberelline, nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert: GA₁, GA₂ ... GA₁₁₆ [11].

Die systematische Nomenklatur der Gibberelline basiert auf dem von Rowe vorgeschlagenen tetracyclischen Ringsystem des *ent*-Gibberellans (Abb.1).

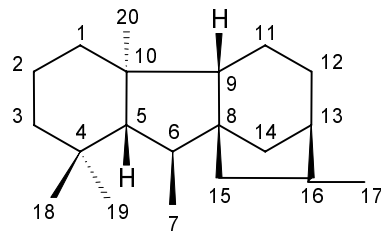


Abb.1: Struktur des *ent*-Gibberellans [12]

Die zur Gruppe der diterpenoiden Verbindungen gehörigen Gibberelline können formal in zwei Gruppen eingeteilt werden: die C₂₀-Gibberelline, welche die vollständige Kohlenstoffanzahl der Diterpenoide besitzen und die C₁₉-Gibberelline, bei denen unter Verlust des Kohlenstoffatoms C-20 ein γ -Lacton gebildet wurde (Abb.2).

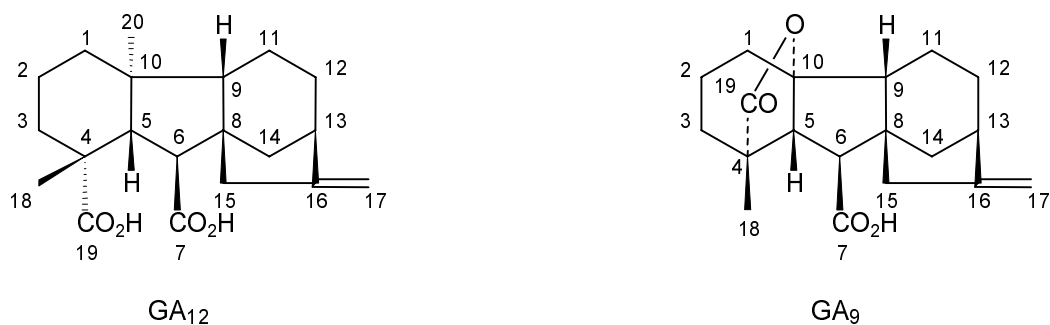


Abb.2: Struktur der C₂₀-Gibberelline (GA₁₂) und der C₁₉-Gibberelline (GA₉)

1.2 Die Gibberellinbiosynthese der höheren Pflanzen

Trotz der sehr geringen endogenen GA-Mengen in höheren Pflanzen (pg/g Frischgewicht) wurde in den letzten Jahren die GA-Biosynthese durch die Entwicklung geeigneter Analysemethoden, wie z. B. der GC-MS und dem Einsatz von GA-Mangelmutanten, sowohl im Pilz als auch in der höheren Pflanze weitgehend aufgeklärt [13]. Viele der an der GA-Biosynthese beteiligten Enzyme konnten isoliert und charakterisiert sowie ihre Gene geklont werden [14]. Die GA-Biosynthese kann man in drei Abschnitte unterteilen:

1. die Synthese des *ent*-Kaurens aus der Mevalonsäure
2. die Synthese des GA₁₂-Aldehyds aus dem *ent*-Kauren
3. die Synthese der Vielfalt an C₂₀- und C₁₉-Gibberellinen aus dem GA₁₂-Aldehyd.

Entsprechend der diterpenoiden Herkunft der Gibberelline wird im ersten Abschnitt Mevalonsäure über Geranylgeranyldiphosphat und *ent*-Copalyldiphosphat zum *ent*-Kauren zyklisiert.

Im zweiten Abschnitt der GA-Biosynthese wird das *ent*-Kauren (durch eine Monooxygenase) über das *ent*-Kaurenol, das *ent*-Kaurenal, die *ent*-Kaurensäure und die *ent*-7- α -OH-Kaurensäure zum GA₁₂-Aldehyd oxidiert [15]. Diese beiden ersten Abschnitte der GA-Biosynthese kommen in allen höheren Pflanzen und auch dem Pilz *Gibberella fujikuroi* vor (Abb.3).

Ausgehend vom GA₁₂-Aldehyd entsteht im dritten Abschnitt der GA-Biosynthese durch sukzessive Oxydationsschritte die bekannte Vielfalt der C₂₀-Gibberelline bzw. der C₁₉-Gibberelline. Bevor die oxidative Eliminierung der C-20-Methylgruppe stattfindet, bestimmt eine Hydroxylierung am C-3 des GA₁₂ zum GA₅₃ oder am C-13 des GA₁₅ zum GA₃₇ die Zuordnung zum:

- "early 13-hydroxylation pathway",
- "early 3-hydroxylation pathway" und
- "non-3,13-hydroxylation pathway" (Abb.4) [17].

Die Oxydation der C-20-Methylgruppe über eine Hydroxymethyl- und eine Aldehydfunktion führt zum einen zur Bildung einer Säure und zum anderen durch Eliminierung von Kohlendioxid zum monohydroxylierten GA₂₀, dihydroxylierten GA₄ und nicht hydroxylierten GA₉, welche alle eine γ -Lactonfunktion besitzen. Die gesamte Oxydationsfolge an C-20 wird wahrscheinlich nur von einem einzigen Enzym, einer Dioxygenase, katalysiert [18].

Weitere Hydroxylierungsschritte dieser C₁₉-Gibberelline führen zu tri- und tetrahydroxylierten Gibberellinen, wobei es dabei zu Übergängen der einzelnen Biosynthesewege kommt und sie sich somit untereinander vernetzen, z.B. die Hydroxylierungen am C-3 vom GA₉ zum GA₄, am C-13 vom GA₄ zum GA₁ und am C-3 vom GA₂₀ zum GA₁ (s. Abb.4).

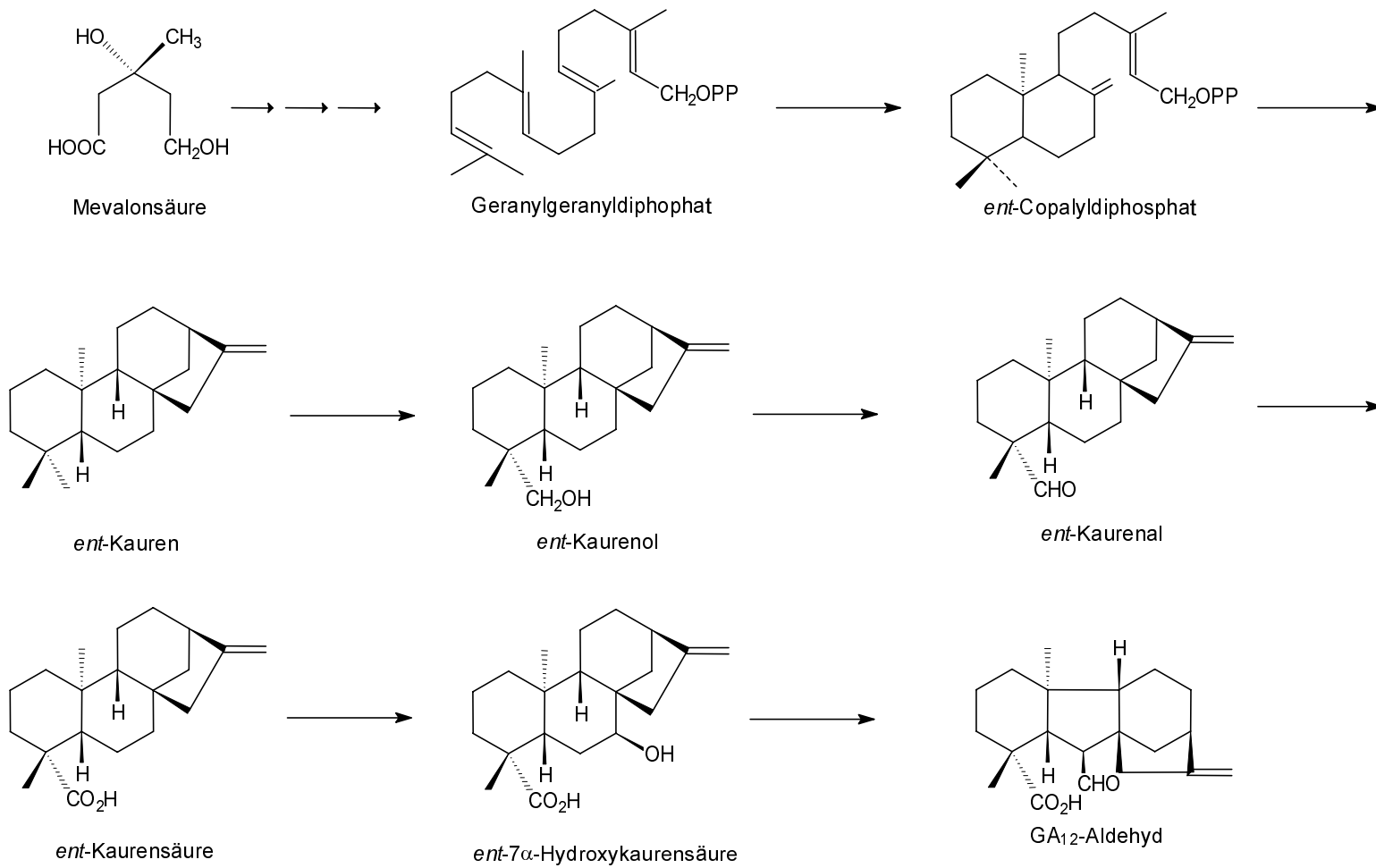


Abb.3: Die Bildung des GA₁₂-Aldehyds ausgehend von der Mevalonsäure (modifiziert nach [16])

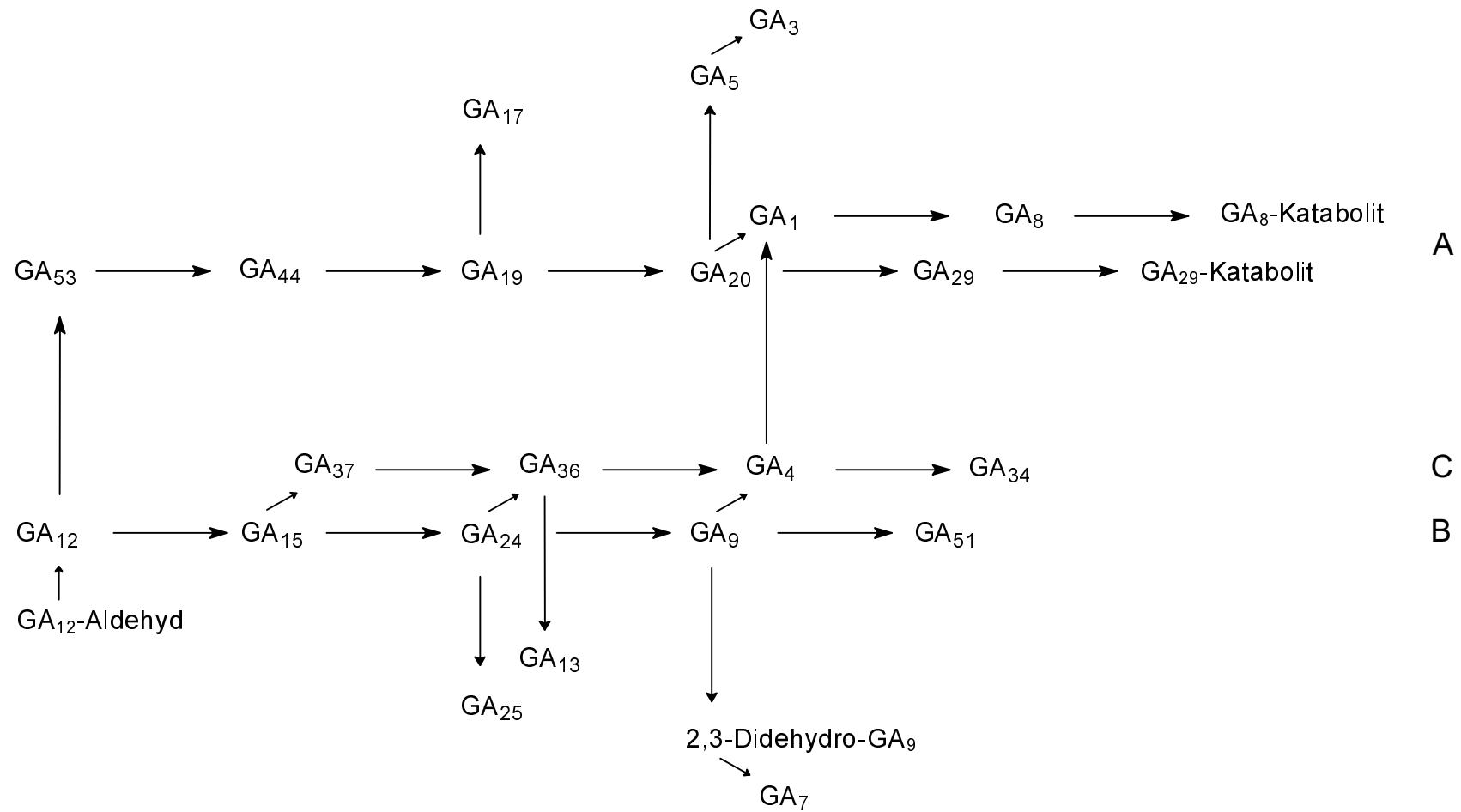


Abb.4: Hauptwege der C₁₉-Gibberelline ausgehend vom GA₁₂-Aldehyd: A - "early 13-hydroxylation pathway", B - "non-3,13-hydroxylation pathway", C - "early 3-hydroxylation pathway" (modifiziert nach [16])

Im Hinblick auf die zu bearbeitende Thematik soll auf die Hydroxylierung im "early 13-hydroxylation pathway" ausführlicher eingegangen werden. Aus dem GA₂₀, dem einfachsten 13-hydroxylierten C₁₉-GA, entsteht durch 3 β -Hydroxylierung das GA₁, das als das aktivste Hormon für das Streckungswachstum in Graminaeen angesehen wird (Kap.1.3, [19]). Ausgehend vom GA₂₀ beobachtet man die Bildung des Δ^2 -ungesättigten GA₅, welches durch eine Verschiebung der Doppelbindung in 1,2-Position und anschließende 3 β -Hydroxylierung in das GA₃ umgewandelt wird. Neben dieser 3 β -Hydroxylierung beobachtet man auch die 2 β -Hydroxylierung der C₁₉-Gibberelline, z.B. die Bildung des GA₈ aus dem GA₁ und die des GA₂₉ aus dem GA₂₀. Diese β -Hydroxylierung am C-2 führt zu einer Entaktivierung der biologisch aktiven Gibberelline. Für die 2 β - und 3 β -Hydroxylierungen als auch die Bildung der ungesättigten Gibberelline GA₅ und GA₃ wird nur ein einziges Enzym diskutiert, was die Multifunktionalität der an der Bildung der C₁₉-Gibberelline beteiligten Enzyme verdeutlicht [20].

Die biologisch inaktiven Gibberelline GA₂₉ und GA₈ können durch eine weitere Oxidation der Hydroxygruppe am Kohlenstoffatom C-2 zu einer α,β -ungesättigten 2-Ketoverbindung katabolisiert werden [21-22]. Das daran beteiligte Enzym ist eine Dioxygenase [23].

1.3 Gibberellinstruktur und physiologische Wirkung

Zusammen mit den Auxinen, den Cytokininen, der Abscinsäure, dem Ethylen [24-26], der Jasmonsäure [24, 27] und den Brassinosteroiden [28] gehört die Gruppe der Gibberelline [24-26] aufgrund ihrer spezifischen Wirkungen zu den Pflanzenhormonen.

Im Vergleich mit den genannten anderen Pflanzenhormonen zeichnen sich die Gibberelline durch ihre strukturelle Vielfalt einerseits und die multiplen Aktivitäten andererseits aus. So sind die Gibberelline an Prozessen wie Streckungswachstum, Blühinduktion, durch Licht oder Temperatur ausgelöste Dormancy-Effekte und der Samenkeimung beteiligt [24, 29].

Besonders hinsichtlich der Förderung des Streckungswachstums sind umfangreiche Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen durchgeführt worden. Hierbei haben sich GA-Mangelmutanten, wie z.B. die d1-Mutante vom Mais [19], die le-Mutante der Erbse [30], die M117-Mutante der Gerste [31] und die Waito-C-Mutante vom Reis [25] besonders bewährt.

Es hat sich gezeigt, daß eine hohe biologische Aktivität mit folgenden strukturellen Merkmalen korreliert werden kann: freie Carboxygruppe an C-6, 19-10 γ -Lactongruppierung, C-17-Methylengruppe und 3 β -Hydroxygruppe, deren Wirkung durch eine gleichzeitig vorliegende 13-Hydroxygruppe und/oder eine 1,2-Doppelbindung noch verstärkt wird [16, 32-35].

Neben der Stimulierung des Internodienwachstums werden heute außerdem Untersuchungen zur physiologischen Rolle der Gibberelline während der Fruchtentwicklung und des Blattwachstums in GA-Mangelmutanten durchgeführt [36, 37].

1.4 Gibberellinabhängige Induktion von Enzymen

Ein sehr intensiv untersuchtes Beispiel für die Hormonwirkung der Gibberelline in den Pflanzen ist die gibberellinabhängige Induktion hydrolytischer Enzyme in der Aleuronschicht keimender Getreidekaryopsen. Diese erstmals von Paleg und Yomo im Jahre 1960 durch GA₃ beschriebene Enzyminduktion in Getreidekaryopsen wird seitdem im großen Umfang untersucht [38, 39].

Das exogen applizierte GA diffundiert dabei in das Endosperm und induziert dort in der Aleuronschicht die Synthese hydrolytischer Enzyme, wie z. B. der α -Amylase, der 1,3 β -Glucanase aber auch von Proteinasen und Ribonucleasen [40-42]. Bereits im Jahre 1967 konnte durch Varner und Chrispeel die *de novo* Synthese dieser Proteine durch die direkte Einwirkung der Gibberelline auf das Genom dieser Enzyme nachgewiesen werden [43].

Weiterführende Arbeiten von Jacobsen, Higgins [44] und Akazawa [45] zeigten, daß die in den keimenden Getreidekaryopsen vorkommende α -Amylase aus mehreren Isoenzymen besteht, die unterschiedliche GA-Abhängigkeit und Verteilung in der Karyopse zeigen [46]. Die von der Aleuronschicht im Reis als Massenzym produzierte Amy 1A ("high pI"), welche während des frühen Keimungsstadiums auch im Scutellum vorliegt, besitzt in der Promotorregion des Genomes ein sogenanntes *Gibberelline Acid Response Element (GARE)*, welches im Reis, Weizen und der Gerste vergleichbar ist [47, 48].

Bei den meisten Untersuchungen wurde die Induktion der α -Amylase in der Aleuronschicht von Getreidekaryopsen nur durch die exogene Zugabe des GA₃ untersucht, welches jedoch endogen in den Getreidekaryopsen nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Für den Ablauf im endogenen Korn wird angenommen, daß Gibberelline aus der Biosynthese, die im Scutellum stattfindet [49], durch das Endosperm diffundieren und in den Zellen der Aleuronschicht die Enzyminduktion bewirken. Zumindest für die Anfangsphase der Keimung sprechen jedoch Ergebnisse von Großelindemann [50] und Lenton [51] gegen diese Theorie. Es konnte gezeigt werden, daß:

1. die örtlich voneinander getrennte GA-Biosynthese im Scutellum und die Induktion der α -Amylase in der Aleuronschicht zeitlich parallel ablaufen und
2. trotz des Einsatzes von GA-Biosyntheseinhibitoren eine α -Amylaseproduktion nachgewiesen werden konnte.

Für die Erklärung der Startphase der GA-abhängigen α -Amylaseinduktion müssen daher alternative Mechanismen oder GA-Quellen angenommen werden, die von der *de novo* Synthese, insbesondere der des *ent*-Kaurens, unabhängig sind. Hierfür könnten inaktive Präkursoren [50], wie z.B. reversibel deaktivierte GA-Konjugate angenommen werden [52, 53].

1.5 Die Gibberellinkonjugation

Gibberelline können neben ihrem Vorkommen in freier Form, d.h. mit underivatisierten Carboxy- und Hydroxygruppen, auch als sogenannte Konjugate im pflanzlichen Gewebe vorliegen. Bei diesem Metabolit-Typ ist ein Gibberellinmolekül kovalent mit einem niedermolekularen Rest, z.B. Zucker verknüpft [54]. Solche Konjugatformen sind für alle Pflanzenhormone bekannt [55, 56]. Für die Gibberelline sind die Glucosekonjugate die wichtigste Gruppe. Darüber hinaus wurden auch Alkylester und Acylderivate gefunden [57].

Die GA-Glucosekonjugate können in 2 Gruppen unterteilt werden: die GA-O-glucoside (GA-O-Glc), bei denen die Glucose an eine der Hydroxygruppen gebunden und die GA-glucosylester (GA-GE), bei denen die Glucosylierung an der Carboxygruppe des Kohlenstoffatoms C-7 erfolgt ist (Abb.5).

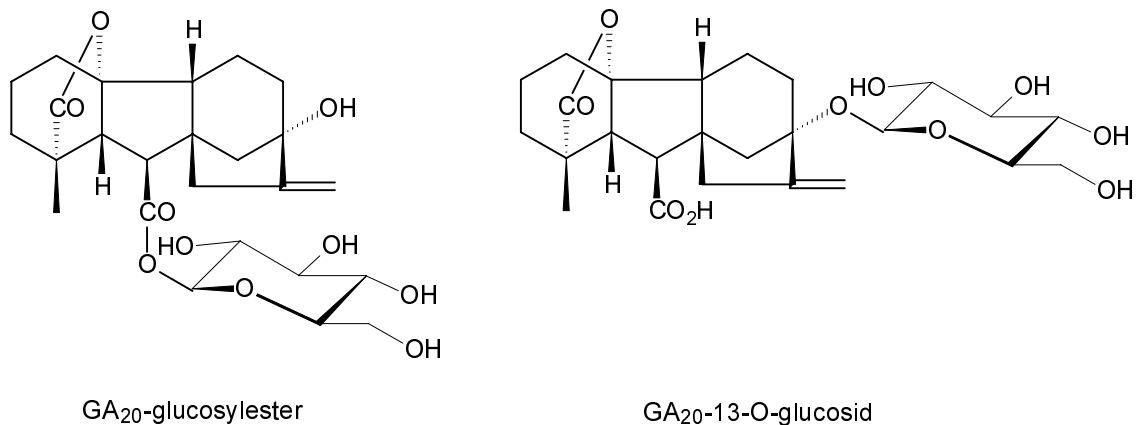


Abb.5: Struktur des GA₂₀-glucosylesters und des GA₂₀-13-O-glucosides

In beiden GA-Glucosekonjugaten besitzt der Zuckerrest eine β -D-Glucopyranosidstruktur.

Die bisher endogen nachgewiesenen GA-O-glucoside (Tab.1) zeigen eine breite Varianz der Verknüpfungsstellen. So kann die Glucose über die Hydroxyfunktion an den Kohlenstoffatomen C-2, C-3, C-11, C-13 und C-17 gebunden sein.

Das erste aus einer höheren Pflanze isolierte und identifizierte GA-O-Glc war das GA₈-2-O-Glc, welches Schreiber et. al. 1968 aus den reifen Samen von *Phaseolus coccineus* isolierten [75].

Erfolgte der Nachweis von GA-Konjugaten anfangs mit klassischen Methoden der Strukturaufklärung, so konnte mit der Entwicklung neuer Trenn- und Analysemethoden, wie der HPLC, der GC-MS und der LC-MS eine Reihe weiterer GA-O-glucoside identifiziert werden (s. Tab.1). Während sich für die Analyse der GA-O-glucoside die GC-MS der permethylierten Verbindungen bewährt hat [76-78], etablierte sich für die GA-GE erst in jüngster Zeit die LC-MS als geeignete Methode [79]. Als hilfreich bei der Entwicklung neuer Analysemethoden hat sich die synthetische Bereitstellung der GA-O-glucoside und der GA-GE erwiesen [80].

Neben dem endogenen Vorkommen der GA-Konjugate in höheren Pflanzen ist mit zahlreichen Fütterungsversuchen die Bildung von GA-Konjugaten nach Applikation meist radioaktiv markierter Gibberelline nachgewiesen worden (Übersicht in [81]).

Obwohl in den meisten dieser Metabolismusversuche keine endgültige Identifizierung der GA-Konjugate erfolgt ist, zeigen die Ergebnisse jedoch die ubiquitäre Präsenz der

Tab.1: Endogen vorkommende GA-O-glucoside

GA-O-glucoside	Pflanzengattung	Literatur
GA ₁ -3-O-Glc	<i>Dolichos lablab</i> , unreife Früchte	[58]
	<i>Hordeum vulgare</i> , milchreife Ähren, reife Karyopsen	[53]
	<i>Phaseolus coccineus</i> , unreife Früchte, reife Samen	[59-61]
	<i>Zea mays</i> , Sämlinge	[53]
GA ₁ -13-O-Glc	<i>Phaseolus coccineus</i> , reife Samen	[61]
3-epiGA ₁ -3-O-Glc	<i>Phaseolus coccineus</i> , reife Samen	[61]
GA ₃ -3-O-Glc	<i>Pharbitis nil</i> , unreife Samen	[61, 63]
GA ₅ -13-O-Glc	<i>Phaseolus coccineus</i> , reife Samen	[61]
GA ₈ -2-O-Glc	<i>Althaea rosea</i> , Schößlingsspitze	[64]
	<i>Hordeum vulgare</i> , milchreife Ähren, reife Karyopsen	[53]
	<i>Pharbitis nil</i> , unreife Samen	[65, 63]
	<i>Phaseolus coccineus</i> , unreife Früchte, reife Samen	[66, 61]
	<i>Phaseolus vulgaris</i> , unreife Samen, reife Samen, Sämlinge	[67, 68]
	<i>Zea mays</i> , Sämlinge	[53]
GA ₂₀ -13-O-Glc	<i>Hordeum vulgare</i> , milchreife Ähren, reife Karyopsen	[53]
	<i>Pisum sativum</i> , reife Samen	[69]
	<i>Triticum aestivum</i> , Karyopsen	[70]
	<i>Zea mays</i> , Sämlinge, reife Karyopsen	[53, 71]
GA ₂₆ -2-O-Glc	<i>Pharbitis nil</i> , unreife Samen	[65, 63]
GA ₂₇ -2-O-Glc	<i>Pharbitis nil</i> , unreife Samen	[65, 63]
GA ₂₉ -2-O-Glc	<i>Hordeum vulgare</i> , milchreife Ähren, reife Karyopsen	[53]
	<i>Pharbitis nil</i> , unreife Samen	[72]
	<i>Phaseolus coccineus</i> , reife Samen	[61]
	<i>Pisum sativum</i> , reife Samen	[69]
	<i>Zea mays</i> , Sämlinge	[53]
GA ₂₉ -13-O-Glc	<i>Hordeum vulgare</i> , milchreife Ähren, reife Karyopsen	[53]
	<i>Zea mays</i> , Sämlinge	[53]
	<i>Pisum sativum</i> , reife Samen	[69]
GA ₃₅ -11-O-Glc	<i>Cytisus scoparius</i> , unreife Samen	[73, 74]

Konjugation von Gibberellinen in höheren Pflanzen.

Hieraus ergibt sich die bis heute unbeantwortete Frage nach der physiologischen Relevanz der Gibberellinkonjugation. Ausgehend von der Tatsache, daß GA-Konjugate im Biotest überwiegend nicht oder nur gering aktiv sind [82], müssen diese Metabolite als entaktivierte GA-Formen und der Konjugationsprozeß als Entaktivierung angesehen werden. Jedoch ist dieser Prozeß im Gegensatz zu den Reaktionsschritten der GA-Biosynthese reversibel.

Durch Hydrolyse von GA-Konjugaten könnten die Gibberelline wieder freigesetzt werden und im Fall aktiver Spezies wieder in physiologisch relevante Pools einfließen (Abb.6).

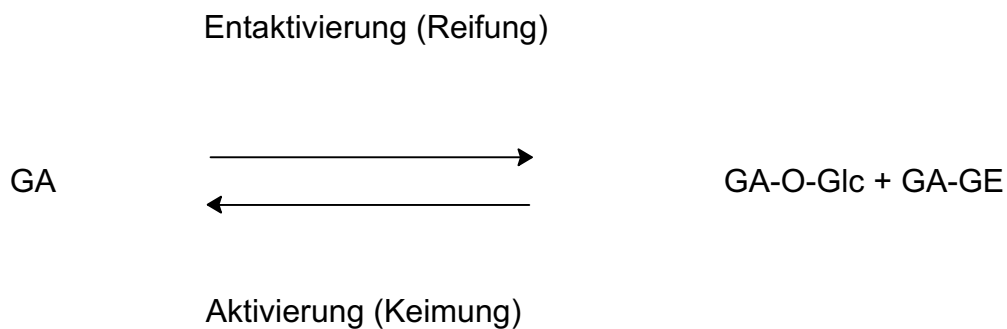


Abb.6: Reversibilität des Konjugationsprozesses der Gibberelline

Basierend auf dieser Reversibilität der GA-Konjugation und der veränderten physikalischen Eigenschaften der Konjugate sind folgende physiologisch relevante Funktionen postuliert worden [55, 81]:

- Rolle als Speicher- und Depotform
- Formen für Transporte
- Beteiligung an der Homöostase der freien GA-Pools.

Keine dieser hypothetischen Funktionen ist bisher durch klare experimentelle Daten bewiesen worden. Als Grund hierfür muß das Fehlen geeigneter analytischer Methoden und entsprechend markierter und unmarkierter Standards angesehen werden.

Erste Hinweise auf die für die postulierte Funktion notwendige Rekonversion von GA-Konjugaten konnten von Rood et. al. [83] geliefert werden, indem nach Fütterung von [T]GA₄ und GA₂₀ an unreife Maiskolben mittels HPLC, aber nicht durch eindeutige MS-Analyse, die Bildung [T]-markierter GA-Konjugate im reifen Mais gefunden wurde, welche bei der anschließenden Keimung des reifen Samens die [T]-markierten Gibberelline wieder freisetzen.

Von Schneider et. al. [84] wurden nach Fütterung von [17-¹³C,T₂;6'-D₂]GA₂₀-GE an Maiskeimlinge als Metabolite [17-¹³C,T₂]-markiertes GA₂₀, GA₂₉, GA₈, GA₂₀-13-O-Glc, GA₂₉-2-O-Glc und GA₈-2-O-Glc in der GC-MS identifiziert, und daraus auf die Hydrolyse des applizierten GA-GE geschlossen.

Für GA-O-glucoside wurde bisher kein auf eine Identifizierung in der MS basierender Nachweis der Rekonversion beschrieben, der sich auf die eindeutige Identifizierung der Metabolite mittels HPLC stützt.

Im Falle der Beteiligung der GA-Konjugate an regulativen Prozessen für die GA-Pools, kommt den bildenden bzw. hydrolysierenden Enzymen dieser Reaktion eine Schlüssel-funktion zu. Dies gilt nicht zuletzt auch hinsichtlich einer gentechnischen Beeinflussung des Konjugationsprozesses für landwirtschaftliche Zwecke.

Bis heute ist allerdings sehr wenig über die Enzymologie der GA-Konjugate bekannt. In der Fruchthülle der reifen Samen von *Phaseolus coccineus* wurde bisher die höchste GA-glucosylierende Aktivität bestimmt [85], wobei die Glucosyltransferase UDP-Glucose als Glucosedonator bevorzugt und mit GA₃ ausschließlich das 3-O-β-D-Glucopyranosid bildet. Jedoch steht diese Substratspezifität im Widerspruch mit der Tatsache, daß bisher noch kein endogenes GA₃-O-Glc in *Phaseolus coccineus* gefunden werden konnte.

Weiterhin konnte aus den unreifen Samen von *Phaseolus coccineus* eine β-Glucosidase mit einer sehr hohen Hydrolyseaktivität gegenüber dem endogenen GA₈-2-O-Glc isoliert werden [86]. Hinsichtlich der Beteiligung der GA-Konjugate am aktiven GA-Pool besitzt die Freisetzung des entaktivierten GA₈ jedoch keine Bedeutung.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Aus der weitgehend ungeklärten physiologischen Rolle und Bedeutung der Gibberellinkonjugation ergeben sich eine Reihe attraktiver biochemischer und naturstoffchemischer Fragestellungen, die auf der Grundlage analytischer Methoden und dem Einsatz von Standardsubstanzen erfolgreich bearbeitet werden könnten.

Von grundlegender Wichtigkeit ist hierbei der Nachweis der Depotbildung (Akkumulation) der GA-O-glucoside während der pflanzlichen Entwicklung und die Rekonversion der GA-O-glucoside in freie Gibberelline.

Wie gezeigt werden konnte, ist auf der Grundlage permethylierter Derivate mittels Kapillar-GC-MS die simultane Analyse freier Gibberelline und GA-O-glucoside möglich. Unter Einsatz entsprechender interner Standards, deren Synthese in der Arbeitsgruppe "Gibberelline" des IPB Halle durchgeführt wurden, sind die Voraussetzungen für exakte qualitative und quantitative Analytik gegeben.

Hinsichtlich der Diskussion über potentielle GA-Quellen, die von einer *de novo* Biosynthese während der frühen Keimung von Getreide unabhängig sind, wurden für die Untersuchungen Gerstenkaryopsen ausgewählt. In diesen wurden wiederholt die während des Reifeprozesses akkumulierten GA-O-glucoside als GA-Lieferanten für die frühe α -Amylaseinduktion diskutiert [50, 51, 53, 87].

Für die konzipierten Untersuchungen ergaben sich daraus folgende Einzelschritte:

1. Identifizierung der endogenen GA-O-glucoside und der Gibberelline in den reifen Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. und der Vergleich mit Literaturbefunden.
2. Quantifizierung relevanter GA-O-Glc- und GA-Pools während der Samenentwicklung von *Hordeum vulgare* L. cv. mittels GC-MS und interner Standards.
3. Versuche zum Nachweis der Rekonversion von GA-O-glucosiden durch metabolische Markierung des GA-O-Glc-Pools in den reifen Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. und anschließende Quantifizierung der Metabolite während der frühen Keimungsphase.
4. Untersuchungen zur Kompartimentierung relevanter freier Gibberelline und GA-O-glucoside in den reifen Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. und ein Vergleich der α -Amylase in den entsprechenden Kompartimenten.

2 Experimenteller Teil

2.1 Das Pflanzenmaterial

Das für die beabsichtigten Untersuchungen benötigte Pflanzenmaterial stammte aus dem Freilandanbau der Jahre 1992-1996 für die Gerstensorte *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya sowie der Jahre 1994-1996 für die Gerstensorte *Hordeum vulgare* L. cv. Salome. Bei diesen beiden Sorten handelt es sich um Sommergersten. Im Gegensatz zur Sorte cv. Himalaya, einer Nacktgerste, besitzt die Sorte cv. Salome Spelzen (Abb. 7), die vor der Aufarbeitung entfernt wurden.

Für die Untersuchungen wurden jeweils die Karyopsen geerntet. Es handelt sich dabei um die Schälfrüchte der Gräser [88], welche bei der Sorte cv. Himalaya mehrzeilig und bei der Sorte cv. Salome zweizeilig angeordnet sind (Abb.7). Die Ernte der für die Untersuchungen notwendigen Karyopsen erfolgte zu den in Kap.2.6 angeführten Terminen.

2.2 Die Extraktion der Gerstenkaryopsen [88, 89]

Mit einem Ultra Turrax (Dispergiersystem IKA-Ultra-Turrax T 25, Jahnke & Künkel, Labortechnik Staufen) wurden 50 g der Gerstenkaryopsen in 150 ml 80%igem MeOH homogenisiert.

Alle eingesetzten Lösungsmittel stammten von der Firma Merck, Darmstadt oder ROTH, Karlsruhe und wurden vor Gebrauch destilliert.

Nach 24 Stunden bei 4 °C wurde abdekantiert und zweimal erneut mit 150 ml 80%igem MeOH extrahiert. Nach dreimaliger Extraktion über Nacht wurde noch zweimal mit je 50 ml MeOH gewaschen. Die vereinigten Extrakte wurden am Vakuumrotationsverdampfer bis auf ca. 60-80 ml wäßrige Phase eingengt (Badtemperatur < 40 °C) und anschließend dreimal mit je 30-40 ml *n*-Hexan extrahiert (*n*-Hexan-Extrakt verworfen). Nach beendeter Extraktion wurde der interne Standard (Kap.2.4.3) in definierter Menge zur wäßrigen Phase zugesetzt (Kap.2.6), danach an Celite 545 (Fluka, Neu-Ulm) gebunden und am Vakuumrotationsverdampfer getrocknet.



Abb.7: Ähren und Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Salome und cv. Himalaya

2.3 Die chromatographische Reinigung der Extrakte

Chromatographie an DEAE-Sephadex A 25 (Acetat-Form) [91]

DEAE-Sephadex A 25 (Fluka, Neu-Ulm) wurde nach Vorschrift [92] in die Acetat-Form überführt. Für die Reinigung von 500 mg des Extraktes nach *n*-Hexan-Behandlung wurden 25 ml aktiviertes Gel in eine Säule gefüllt und mit 50 ml MeOH gespült. Das Verhältnis Säulendurchmesser zu Länge des Gelbettes betrug dabei ca. 1:20. Auf den Kopf dieser Säule wurde der an Celite gebundene Extrakt (Kap.2.2) gegeben und mit folgendem Gradienten eluiert: 50 ml MeOH, je 50 ml 0,25 N HOAc, 0,5 N HOAc, 1 N HOAc, 2 N HOAc und je 25 ml 4 N HOAc, 6 N HOAc in MeOH. Die Eluate wurden in zwei Fraktionen geteilt, eine neutrale (NF: 0-75 ml Elutionsvolumen) und eine saure Fraktion (SF: 75-300 ml Elutionsvolumen).

Beide Fraktionen wurden am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

Kieselgelchromatographie [93, 68]

50 mg der SF der DEAE-Sephadex A 25-Säule wurden in 100-150 μ l 80%igem MeOH gelöst und auf eine trockene Kieselgelkartusche mit 2 g stationärer Phase (Festphasen-Extraktionssäulen, Varian, USA) gegeben. Die Kartusche wurde mit Stickstoff getrocknet und anschließend mit folgendem Gradienten eluiert: je 8 ml CHCl_3 (1% HOAc), 10% MeOH, 20% MeOH, 30% MeOH und 50% MeOH in CHCl_3 mit jeweils 1% HOAc. Die Fraktionen mit 10-30% MeOH wurden zusammengefaßt und am Vakuumrotationsverdampfer eingengt.

Bei größeren Extraktmengen wurde an einer Kieselgelsäule gereinigt. Für 250 mg Pflanzenextrakt wurden 10 g Kieselgel (Kieselgel 60; 0,063-0,2 mm; Merck, Darmstadt) in CHCl_3 aufgeschlämmt und mit 50 ml CHCl_3 gespült. Der Extrakt wurde in 1 ml 80%igem MeOH gelöst, an Celite gebunden und am Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. Danach wurde der an Celite gebundene Extrakt auf die Säule gegeben und mit folgendem Gradienten eluiert: je 20 ml CHCl_3 (1% HOAc), 10% MeOH, 20% MeOH, 30% MeOH und 50% MeOH in CHCl_3 jeweils mit 1% HOAc.

Die Fraktionen mit 10-30% MeOH wurden vereinigt und am Vakuumrotationsverdampfer eingengt.

2.4 GC-MS

2.4.1 Geräteparameter und Bedingungen

Die Messungen wurden an einem Gerätsystem der Firma FISIONS (Folsom, USA) durchgeführt: Quadrupol-Massenspektrometer MD 800, Gaschromatograph GC 8000 und Datenauswertesystem MASS LAB.

GC-Säulen: DB5-MS-Kapillarsäulen der Firma J & W Scientific (Folsom, USA)

für *permethylierte Verbindungen*: 15 m, 0,32 mm ID, 0,25 μ m

Schichtdicke, Phasenverhältnis $\beta = 320$

Trägergas: Helium mit 1,3 ml/min Flußgeschwindigkeit

für *trimethylsilylierte Verbindungen*: 15 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m

Schichtdicke, Phasenverhältnis $\beta = 250$

Trägergas: Helium mit 0,8 ml/min Flußgeschwindigkeit

Injektion: splittless

Injektionstemperatur: 250°C

Temperaturprogramm:

permethylierte Verbindungen:

60°C, 1 min

60-270°C, 30°C/min

270°C, 30 min

270-290°C, 20°C/min

290°C, 10 min

trimethylsilylierte Verbindungen:

60°C, 1 min

60-260°C, 30°C/min

260°C, 7 min

260-290°C, 20°C/min

290°C, 7 min

Interfacetemperatur: 300°C

Quellentemperatur: 200°C

Probenaufbereitung:

Die Proben wurden in 10-40 μ l MeOH gelöst. Zur Bestimmung der Retentionsindices wurde Parafilm in Toluol gelöst und 0,2 μ l dieses *n*-Alkangemisches zusammen mit 1 μ l der Probenlösung injiziert.

Die gaschromatographische Charakterisierung der derivatisierten Gibberelline und GA-O-glucoside erfolgte durch ihre Retentionsindices [78, 89]. Hierzu wurde eine Mischung homologer *n*-Alkane zugespritzt [94]. Aus den bei linearer Temperaturprogrammierung beobachteten relativen Retentionszeiten der zu identifizierenden Verbindung und der des vor und nach der Verbindung eluierenden *n*-Alkans wurden nach Van den Dool und Kratz [95] die Retentionsindices nach folgender Gleichung berechnet:

$$R^I = 100 N + 100 n [(t_{Ra} - t_{RN}) (t_{R(N+1)} - t_{RN})^{-1}]$$

t_{Ra}	relative Retentionszeit der Verbindung
t_{RN}	relative Retentionszeit des <i>n</i> -Alkans vor der Verbindung
$t_{R(N+1)}$	relative Retentionszeit des <i>n</i> -Alkans nach der Verbindung
N	Kohlenstoffanzahl des niedrigeren <i>n</i> -Alkans
n	Differenz zwischen den Kohlenstoffzahlen der beiden <i>n</i> -Alkane, die die Verbindung umgeben.

Die On-line Messung der Massenspektren erfolgte bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV. Im Full scan (FS) wurde für den Massebereich von *m/z* 50-650 ein Gesamt-Massenspektrum aufgenommen (Scanrate: 0,9 sec).

Für das selected ion monitoring (SIM) wurden entsprechende Fragmentionen ausgewählt. Diese Technik wurde insbesondere für die Quantifizierung durch Isotopenverdünnung benutzt. Bei konstanter Scanrate (0,9 sec) kann damit gegenüber dem FS die Empfindlichkeit um den Faktor 100 erhöht werden.

Die Quantifizierung in der MS erfolgte durch Isotopenverdünnung mittels stabilisotopenmarkierter Standards [89, 96-101]. Dazu wurde den Extrakten nach *n*-Hexan-Behandlung als interner Standard in 17-Position zweifach deuterierte Analoga in definierten Mengen zugesetzt (Kap.2.4.3 u. 2.6). Zur Quantifizierung wurden die Ionenchromatogramme äquivalenter Ionen der endogenen und der entsprechend [17-D₂]-markierten Verbindung integriert und die daraus resultierenden Peakflächen ins Verhältnis gesetzt. Der endogene Gehalt einer Verbindung wurde mittels einer Kalibrierungskurve bestimmt, die für synthetische Gemische der endogenen Verbindung und des [17-D₂]-markierten Standards ermittelt worden waren (Kap.2.4.4.).

2.4.2 Derivatisierung

Methylierung

Die Herstellung der etherischen Diazomethanlösung erfolgte nach Vorschrift in Lit. [102]. 10 mg des gereinigten Extraktes wurden in 1-2 ml MeOH und 2-5 Tropfen H₂O gelöst. Zu dieser Lösung wurden dann bei RT 1-2 ml etherische Diazomethanlösung gegeben. Die Gelbfärbung der Lösung blieb dabei für die Dauer der Reaktion bestehen. Nach einer Stunde wurden im Stickstoffstrom auf einem Heizblock (Reacti-Therm und Reacti-Vap Modell 18790; PIERCE, Heidelberg) die Lösungsmittel abgeblasen. Größere Mengen an Diazomethan wurden vorher mit HOAc zersetzt. Anschließend wurde am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt.

Permethylierung [modifiziert nach 103]

10 mg der über Nacht im Exsikkator über KOH getrockneten methylierten Probe wurden in 500 µl absolutem DMF gelöst und mit 200 µl frisch destilliertem CH₃I versetzt. Unter einem schwachen Stickstoffstrom wurden 25 mg NaH zugegeben (die NaH-Suspension, 80% in Paraffinöl; Merck, Darmstadt, wurde vor dem Einsatz mehrfach mit absolutem *n*-Hexan gewaschen).

Die absoluten Lösungsmittel wurden nach Vorschrift [104] getrocknet und über Molsieb gelagert.

Nach 2 Stunden bei RT wurde die Reaktion mit 10 N HOAc in MeOH gestoppt und die Lösung im Stickstoffstrom unter leichtem Erwärmen (max. 50 °C) bis zur Trockene eingeeengt. Bei größeren Mengen an Extrakt wurde am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt.

Der feste Rückstand wurde in 1 ml H₂O aufgenommen und anschließend viermal mit 1 ml EtOAc extrahiert. Die gesammelten EtOAc-Extrakte wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt der Permethylierung wurde an Celite gebunden und zur Reinigung auf eine Kartusche mit 1 g Kieselgel (aufgeschlämmt in Toluol) gegeben, die mit folgendem Gradienten eluiert wurde: 10 ml 100% Toluol, 14 ml 10% EtOAc, 7 ml 20% EtOAc, 7 ml 30% EtOAc und 7 ml 40% EtOAc in Toluol.

Anschließend wurden die Fraktionen mit 10 und 20% EtOAc sowie mit 30 und 40% EtOAc am Vakuumrotationsverdampfer eingengt, mit MeOH in kleine Rollrandgläsern umgefüllt, in einem Bachofer Vakuum Concentrator (CT 110; Bachofer, Reutlingen) eingengt und danach mit einem Septumverschluß verschlossen. Bis zur Injektion in der GC-MS wurden die permethylierten Proben im Kühlschrank gelagert.

Trimethylsilylierung [105]

1-2 mg des methylierten Pflanzenextraktes wurden in 10 μ l CH_2Cl_2 gelöst, mit 20 μ l MSTFA (SERVA, Heidelberg) versetzt und 30 min bei 90 °C im Heizblock erwärmt. Danach wurden die trimethylsilylierten Proben sofort injiziert.

2.4.3. Interne Standards

Die in dieser Arbeit eingesetzten internen Standards wurden von Dr. P. Fuchs in der Arbeitsgruppe Gibberellinbiochemie nach folgendem Synthesekonzept hergestellt: Methylierung der entsprechenden GA-16-norketonmethylester mit Lombardo's Reagenz ($\text{Zn-TiCl}_4\text{-CD}_2\text{Br}_2$ -Komplex) und gegebenenfalls anschließende Glucosylierung der [17- D_2]GA-methylester mit α -Acetobromglucose in Anwesenheit von AgCO_3 als Katalysator [106, 107].

Zur Quantifizierung der endogenen Verbindungen in der GC-MS wurden folgende [17- D_2]-markierte Gibberelline und GA-O-glucoside als interne Standards, charakterisiert durch den Deuterierungsgrad, eingesetzt:

[17- D_2]GA₂₀ (1,98 Atome Deuterium pro Molekül), [17- D_2]GA₈ (1,95 Atome Deuterium pro Molekül) und [17- D_2]GA₁ (1,96 Atome Deuterium pro Molekül). Der Deuterierungsgrad der [17- D_2]-markierten GA-O-glucoside ist identisch mit denen der zur Glucosylierung eingesetzten Agluca.

Zur Herstellung der Stammlösungen (Stl), die jeweils 50 μ g der entsprechenden Verbindungen in 100 ml EtOH enthalten, wurden die folgenden Mengen an [17- D_2]-markierter Verbindung in dem gleichen Volumen an EtOH gelöst und jeweils 50 μ l dieser Lösungen auf 100 ml EtOH verdünnt:

- Stl 1: 0,56 mg [17-D₂]GA₂₀ /0,56 ml EtOH
 0,20 mg [17-D₂]GA₈ /0,2 ml EtOH
 4,40 mg [17-D₂]GA₁/4,4 ml EtOH
 2,50 mg [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc/2,5 ml EtOH
 0,20 mg [17-D₂]GA₁-3-O-Glc/0,2 ml EtOH
 1,10 mg [17-D₂]GA₁-13-O-Glc/1,1 ml EtOH
- Stl 2: 1,00 mg [17-D₂]GA₂₀ /1,0 ml EtOH
 5,60 mg [17-D₂]GA₈ /5,6 ml EtOH
 1,00 mg [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc/1,0 ml EtOH
- Stl 3: 4,80 mg [17-D₂]GA₈-2-O-Glc/4,8 ml EtOH
- Stl 4: 5,40 mg [17-D₂]GA₈ /5,4 ml EtOH

Für die Quantifizierung des gefütterten [17-D₂]GA₂₀ (Kap.3.3.) und der daraus metabolisch gebildeten Verbindungen während der Keimung wurden folgende mehrfach-deuterierte Verbindungen eingesetzt:

[3-D,17-D₂]GA₂₀ (2,87 Atome Deuterium pro Molekül), [1-D,2-D,17-D₂]GA₁ (> 3,8 Atome Deuterium pro Molekül) und [3-D,17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (Deuterierungsgrad entspricht dem Aglucon).

Von diesen drei Verbindungen wurden ebenfalls Stammlösungen mit je 50 µg der Verbindung in 100 ml EtOH hergestellt, indem von den folgenden Lösungen 50 µl auf 100 ml EtOH verdünnt wurden:

- Stl 5: 3,55 mg [3-D,17-D₂]GA₂₀/3,55 ml EtOH
- Stl 6: 3,90 mg [1-D, 2-D,17-D₂]GA₁/3,9 ml EtOH)
- Stl 7: 3,70 mg [3-D,17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc/3,7 ml EtOH

Zur Quantifizierung des metabolisch gebildeten [17-D₂]GA₈ und des [17-D₂]GA₈-2-O-Glc standen keine Standards zur Verfügung.

2.4.4 Bestimmung der Kalibrierungskurven für Gemische aus markierten und unmarkierten Standards

Zur Herstellung der Kalibrierungskurven für die endogenen Verbindungen wurde je 1 mg des unmarkierten GA bzw. GA-O-Glc und des entsprechend [17-D₂]-markierten GA bzw. GA-O-Glc in 1 ml EtOH gelöst. Von diesen beiden Eichlösungen wurden Mischungen mit folgenden Verhältnissen hergestellt:

GA ₂₀ /[17-D ₂]GA ₂₀ :	1:25, 1:20, 1:15, 1:10, 1:5, 1:1, 5:1
GA ₈ /[17-D ₂]GA ₈ :	1:20, 1:10, 1:1, 10:1, 20:1, 40:1, 60:1
GA ₂₀ -13-O-Glc/[17-D ₂]GA ₂₀ -13-O-Glc:	1:25, 1:20, 1:15, 1:10, 1:5, 1:1, 5:1, 10:1

Analog dazu wurden für die Kalibrierungskurven des zu quantifizierenden [17-D₂]GA₂₀ (gefüttert) und des [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (metabolisch gebildet) je 1 mg des [17-D₂]-markierten GA bzw. GA-O-Glc und des entsprechend [3-D,17-D₂]-markierten GA bzw. GA-O-Glc in 1 ml EtOH gelöst und davon folgende Mischungsverhältnisse aus beiden Eichlösungen hergestellt:

[17-D ₂]GA ₂₀ /[3-D,17-D ₂]GA ₂₀ :	1:25, 1:20, 1:15, 1:10, 1:5, 1:1, 5:1, 10:1
[17-D ₂]GA ₂₀ -13-O-Glc/ [3-D,17-D ₂]GA ₂₀ -13-O-Glc:	1:25, 1:20, 1:15, 1:10, 1:5, 1:1, 5:1, 10:1

Diese einzelnen Mischungen wurden nach dem Trocknen im Stickstoffstrom gemäß Kap.2.4.2. methyliert und permethyliert. Nach der Derivatisierung wurden für die Kalibrierungskurven folgende charakteristische Fragmentationenpaare ausgewählt und integriert [78, 108]:

GA ₂₀ /[17-D ₂]GA ₂₀ :	<i>m/z</i> 360/362, 317/319
GA ₈ /[17-D ₂]GA ₈ :	<i>m/z</i> 420/422, 361/363
GA ₂₀ -13-O-Glc/[17-D ₂]GA ₂₀ -13-O-Glc:	<i>m/z</i> 389/391, 329/331, 297/299
[17-D ₂]GA ₂₀ /[3-D,17-D ₂]GA ₂₀ :	<i>m/z</i> 362/363, 319/320
[17-D ₂]GA ₂₀ -13-O-Glc/ [3-D,17-D ₂]GA ₂₀ -13-O-Glc:	<i>m/z</i> 391/392, 331/332, 299/300

Durch das Auftragen der Peakflächenverhältnisse der Ionenpaare von unmarkiertem GA bzw. GA-O-Glc und von markiertem GA bzw. GA-O-Glc gegen das Mengenverhältnis der eingesetzten Mischungen konnten die in Abb.15, (s. Kap.3.2.2.) und in Abb.1

bis 3 (im Anhang) dargestellten Kalibrierungskurven für die Quantifizierung des endogenen GA₂₀, GA₈ und GA₂₀-13-O-Glc gewonnen werden. Für die Quantifizierung des gefütterten [17-D₂]GA₂₀ und des daraus gebildeten [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc wurde in den Kalibrierungskurven das Peakflächenverhältnis der Ionenpaare von [17-D₂]-markiertem GA bzw. GA-O-Glc und von [3-D,17-D₂]-markiertem GA bzw. GA-O-Glc gegen das Mengenverhältnis der Mischungen aufgetragen (s. Abb.5,6 im Anhang).

Die zu den Kalibrierungskurven gehörenden Geradengleichungen wurden mittels linearer Regression im Computerprogramm MicroCal Origin bestimmt. Die Parameter der Regressionsrechnung befinden sich im Anhang.

Durch die fünffache Injektion der Mischungen 1:20 bzw. 1:1 des markierten und des unmarkierten GA₂₀-13-O-Glc konnte für die GC-MS-Analyse eine Standardabweichung von 0,76% bzw. 6,9% bestimmt werden (Berechnungen s. Anhang).

2.5 Wiederfindungsraten

u [T]-markierte Verbindungen

Folgende Aufarbeitungsschritte wurden hinsichtlich von Verlusten mit u [T]-markierten Verbindungen überprüft:

- DEAE Sephadex A 25 - Säule: u [T]GA₈-2-O-Glc
- Kieselgelsäule: u [T]GA₂₀, u [T]GA₂₀-13-O-Glc, u [T]GA₈-2-O-Glc
- Permethylierung: u [T]GA₂₀, u [T]GA₂₀-13-O-Glc, u [T]GA₈-2-O-Glc

Diese markierten Verbindungen, die metabolisch gewonnen wurden, sind uniform markiert (u). Die Reinheit der eingesetzten u [T]-markierten Verbindungen wurde auf DC Fertigplatten (Kieselgel 60; Schichtdicke 0,25 mm; Merck, Darmstadt) mittels des Radio-Scanners LB 242K/LB 2723 überprüft. Für die Dünnschichtchromatographie wurden folgende Laufmittelsysteme eingesetzt:

u [T]GA ₂₀ :	CHCl ₃ : EtOAc : HOAc	80 : 20 : 5
u [T]GA ₂₀ -13-O-Glc:	CHCl ₃ : MeOH : HOAc : H ₂ O	80 : 20 : 4 : 2
u [T]GA ₈ -2-O-Glc:	CHCl ₃ : MeOH : HOAc : H ₂ O	70 : 30 : 4 : 2

Wiederfindungsrate der DEAE Sephadex A 25-Säule

u [T]GA₈-2-O-Glc ($1,93 \times 10^6$ dpm) wurde in 50 µl MeOH gelöst, auf 3 ml Gelbett DEAE-Sephadex A 25 (Acetat-Form) gegeben und nach Vorschrift Kap.2.3 eluiert.

Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde mittels LSC in einem Tricarb 2260 (Packed Instruments) bestimmt. Dazu wurden 8 ml einer Lösung von 38,4 mg PPO (Merck, Darmstadt) und 2,56 mg POPOP (Merck, Darmstadt) in Toluol als Scintillationscocktail genutzt. Als Lösungsvermittler dienten 2 ml MeOH. Nach Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen der DEAE-Sephadex A 25-Säule ergab sich folgende Bilanz:

Tab.2: Radioaktivitätsbilanz des u [T]GA₈-2-O-Glc in den Fraktionen der DEAE-Sephadex A 25-Säule

	Radioaktivität (%)
Ausgangsverbindung	100,0
MeOH (NF)	0,4
0,25-0,5 N HOAc in MeOH (SF)	1,3
1-2 N HOAc in MeOH (SF)	87,8
4-6 N HOAc in MeOH (SF)	8,7

Somit konnten in der vereinigten SF der Säule **97,8%** der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden werden.

Wiederfindungsraten bei der Kieselgelchromatographie

u [T]GA₂₀ ($1,68 \times 10^6$ dpm), u [T]GA₂₀-13-O-Glc ($1,99 \times 10^5$ dpm) und u [T]GA₈-2-O-Glc ($1,55 \times 10^6$ dpm) wurden jeweils in 100 µl 80%igem MeOH gelöst und getrennt voneinander auf je eine 2-g-Kieselgelkartusche gegeben und entsprechend Vorschrift Kap.2.3 eluiert. Nach Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen ergab sich die in Tab.3 dargestellte Bilanz.

Tab.3: Radioaktivitätsbilanz der eingesetzten u [T]-markierten Verbindungen in den Fraktionen der Kieselgelsäule

	Radioaktivität (%)		
	u [T]GA ₂₀	u [T]GA ₂₀ -13-O-Glc	u [T]GA ₈ -2-O-Glc
Ausgangsverbindung	100,0	100,0	100,0
100% CHCl ₃	0,3	0,5	1,1
10% MeOH in CHCl ₃	55,2	13,8	1,0
20% MeOH in CHCl ₃	1,8	57,1	85,1
30% MeOH in CHCl ₃	0,4	10,4	5,1
50% MeOH in CHCl ₃	0,45	2,5	3,4

Dabei ergaben sich für das u [T]GA₂₀, das u [T]GA₂₀-13-O-Glc und das u [T]GA₈-2-O-Glc Wiederfindungsraten von **57,4%**, **91,3%** bzw. **91,2%** in der vereinigten Fraktion mit 10-30% MeOH.

Wiederfindungsraten bei der Permethylierung

u [T]GA₂₀ ($1,6 \times 10^7$ dpm), u [T]GA₂₀-13-O-Glc ($1,99 \times 10^5$ dpm) und u [T]GA₈-2-O-Glc ($5,85 \times 10^5$ dpm) wurden jeweils in 0,5 ml MeOH/5 Tropfen H₂O gelöst, mit 1 ml etherischer Diazomethanlösung methyliert (Kap.2.4.2), anschließend in 250 µl DMF mit 100 µl CH₃I und 20 mg NaH permethyliert und an einer 1-g-Kieselgelkartusche nach Vorschrift Kap.2.4.2 gereinigt. Laut Radioaktivitätsmessung konnten nach der Permethylierung in den EtOAc-Fractionen der Kieselgelsäule für das u [T]GA₂₀ 73,1%, für das u [T]GA₂₀-13-O-Glc 79,5% und für das u [T]GA₈-2-O-Glc 33,8% wiedergefunden werden. Beim u [T]GA₈-2-O-Glc verblieben die größten Mengen an Radioaktivität im Säulenmaterial mit 48% (irreversible Adsorption) sowie in der Toluol-Fraktion mit 2,5%.

2.6 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

2.6.1 Identifizierung von GA-O-glucosiden und Gibberellinen in den reifen Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome

50 g totreife Karyopsen der Gerstensorte cv. Himalaya Ernte 1992 und der Sorte cv. Salome Ernte 1994 wurden in einer Mühle zerkleinert (Analytische Mühle A10; ELEC.; IKA Staufen), mit 80%igem MeOH extrahiert und der wäßrige Rückstand der vereinigten MeOH-Extrakte mit *n*-Hexan von Lipiden, Chlorophyll und anderen unpolaren Verbindungen befreit (Kap.2.2). Danach wurde die wäßrige Phase an Celite gebunden, am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt und im Exsikkator über KOH getrocknet (Extraktmenge cv. Himalaya 1,81 g und cv. Salome 1,62 g). Nach der Chromatographie dieser Extrakte an 100 ml DEAE-Sephadex A 25 (Acetat-Form) nach Vorschrift Kap.2.3 wurden die neutralen Fraktionen (cv. Himalaya NF=1,45 g Extrakt und cv. Salome NF=1,25 g Extrakt) verworfen. Die sauren Fraktionen (cv. Himalaya SF=0,31g Extrakt und cv. Salome SF=0,34 g Extrakt) wurden in 1-2 ml MeOH unter Zusatz von H₂O gelöst, an Celite gebunden, am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt und an einer 30-g-Kieselgelsäule mit einem MeOH/HOAc-Gradienten in CHCl₃ eluiert (s. Kap. 2.3).

Die Fraktionen mit 10-30% MeOH wurden zusammengefaßt, eingeeengt und ergaben jeweils ca. 20 mg Extrakt für beide Gerstensorten. Dieser Extrakt wurden anschließend methyliert, permethyliert und an einer 1-g-Kieselgelsäule gereinigt (Kap.2.4.2). Danach wurde die Probe (< 1 mg) in der GC-MS vermessen (Kap.2.4.1). Die Daten der GC-MS-Analyse (R^l, *m/z* und deren Intensitäten) sind für die identifizierten endogenen GA-O-glucoside (Tab.15) und Gibberelline (Tab.14) im Vergleich zu entsprechenden Standards in Kap.3.1.2. zusammengefaßt.

In Abb.8 sind die zur Vorbereitung auf die GC-MS Analyse notwendigen Einzelschritte der Aufarbeitung in einem Schema nochmals dargestellt:

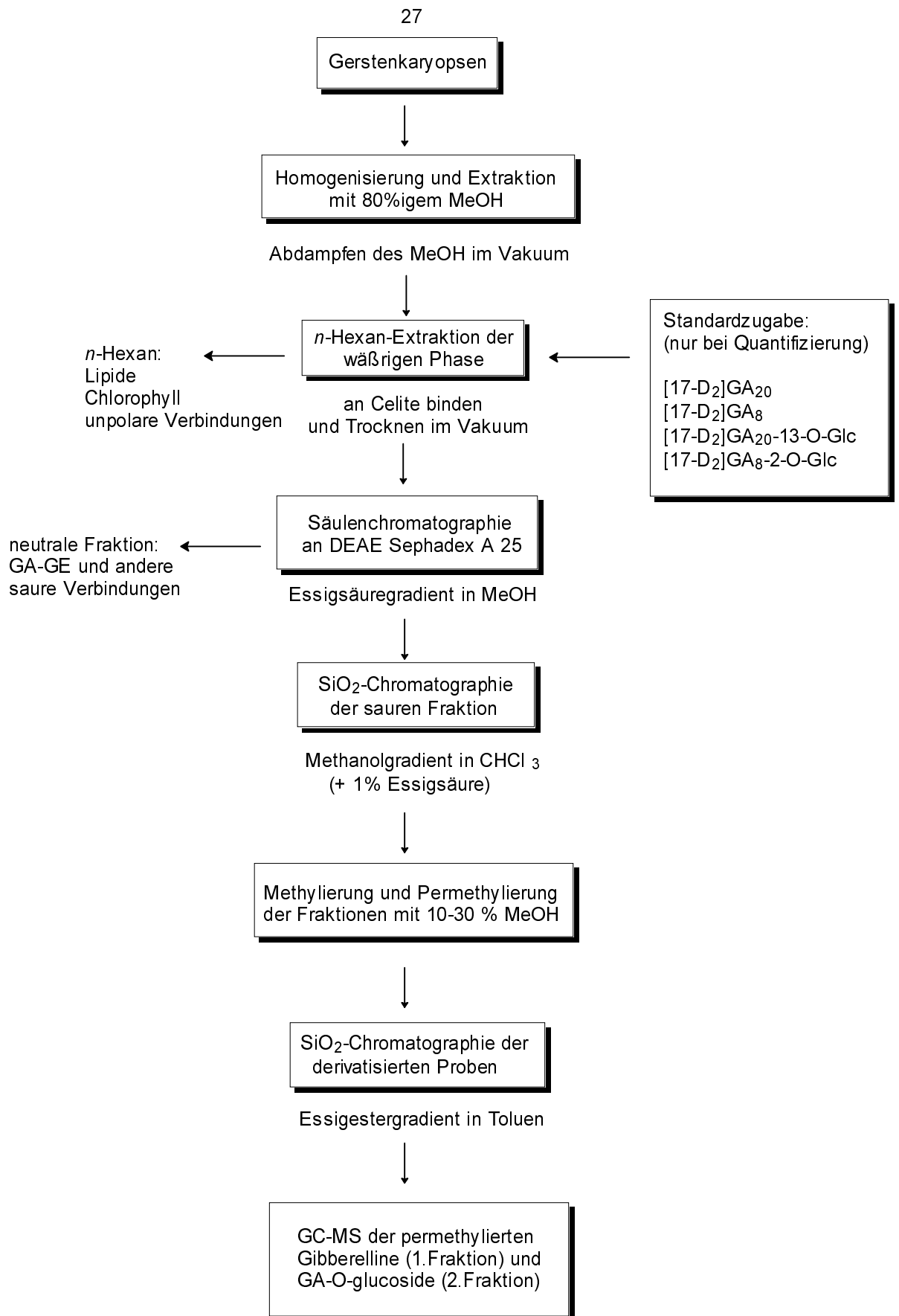


Abb. 8.: Aufarbeitungsschema der Gerstenkaryopsen für die GC-MS-Analyse

2.6.2 Quantifizierung der GA-O-glucoside und der Gibberelline in den Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome während der Reifung

Jeweils 50 g an Karyopsen der Sorte cv. Himalaya (Ernte 1993 und 1994) und der Sorte cv. Salome (Ernte 1995 und 1996) wurden zu sechs verschiedenen Reifestadien geerntet. 20 Tage nach Beginn der Anthese wurde mit der Ernte des Milchreifestadiums begonnen. Dieser folgten vier weitere Ernten im wöchentlichen Abstand. Die letzte Ernte, die der totreifen Karyopsen, erfolgte zehn Wochen nach der ersten Ernte.

In Tab.4 bis 7 wurden die Daten der entsprechenden Ernten beider Sorten und die dazugehörigen Tausendkornmassen, welche nach jeder Ernte durch dreimaliges Wägen von 100 Karyopsen bestimmt wurden, aufgelistet.

Die Karyopsen wurden nach der Ernte mit flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung entsprechend Abb.8 im Tiefkühlschrank bei -20 °C gelagert. Die Karyopsen der Sorte cv. Salome wurden vor dem Einfrieren entspelzt. Nach Homogenisierung und mehrfacher Extraktion der Karyopsen mit 80%igem MeOH, Einengen der vereinigten Extrakte und anschließender *n*-Hexan-Extraktion der wässrigen Phase, wurden zu 10 g-Äquivalenten der wässrigen Phase die in Kap.2.4.3. aufgeführten Stammlösungen (Stl) zugegeben.

In Tab.8 sind die Volumina an Stammlösung und die daraus resultierenden Mengen an zugesetzten internen Standard für die sechs Ernten eines Jahres zusammengefaßt:

Tab.8: Stammlösungen (Art und Volumen) und entsprechende Mengen an zugesetzten internen Standards zu der wässrigen Phase der gereiften Karyopsen von cv. Himalaya (1993, 1994) und cv. Salome (1995, 1996)

	Stl	Volumen (ml)	Menge (ng/g FG)
Himalaya 1993	1	0,4	20
Himalaya 1994	1/2	0,4/0,4	20/20
Salome 1995	2/3/4	0,4/0,6/1	20/30/50
Salome 1996	2/3/4	0,4/0,6/1	20/30/50

Tab.4: Erntedaten, Tausendkornmassen (TKM) und Extraktmengen nach der *n*-Hexan-Extraktion bzw. nach der DEAE-Sephadex A 25-Säule von cv. Himalaya 1993 (10 g-Äquivalente)

Erntedatum	Erntestadium	TKM (g)	Menge nach <i>n</i> -Hexan-Extraktion (g)	Menge nach DEAE-Sephadex A 25-Säule (g)	
				NF	SF
14.06.1993	Milchreife	65,35	0,69	0,38	0,28
21.06.1993	frühe Wachsreife	82,9	0,65	0,45	0,19
28.06.1993	späte Wachsreife	88,1	0,53	0,35	0,14
05.07.1993	kurz vor Vollreife	62,4	0,52	0,38	0,13
12.07.1993	Vollreife	48,9	0,50	0,42	0,11
16.08.1993	Totreife	47,4	0,53	0,47	0,08

Tab.5: Erntedaten, Tausendkornmassen (TKM) und Extraktmengen nach der *n*-Hexan-Extraktion bzw. nach der DEAE-Sephadex A 25-Säule von cv. Himalaya 1994 (10 g-Äquivalente)

Erntedatum	Erntestadium	TKM (g)	Menge nach <i>n</i> -Hexan-Extraktion (g)	Menge nach DEAE-Sephadex A 25-Säule (g)	
				NF	SF
27.06.1994	Milchreife	61,8	0,82	0,48	0,33
04.07.1994	frühe Wachsreife	73,4	0,42	0,29	0,07
11.07.1994	späte Wachsreife	79,5	0,63	0,46	0,15
18.07.1994	kurz vor Vollreife	66,3	0,54	0,46	0,11
25.07.1994	Vollreife	43,5	0,24	0,35	0,05
05.09.1994	Totreife	44,7	0,36	0,38	0,05

Tab.6: Erntedaten, Tausendkornmassen (TKM) und Extraktmengen nach der *n*-Hexan-Extraktion bzw. nach der DEAE-Sephadex A 25-Säule von cv. Salome 1995 (10 g-Äquivalente)

Erntedatum	Erntestadium	TKM (g)	Menge nach <i>n</i> -Hexan-Extraktion (g)	Menge nach DEAE-Sephadex A 25-Säule (g)	
				NF	SF
14.07.1995	Milchreife	44,3	0,84	0,31	0,34
21.07.1995	frühe Wachsreife	66,7	0,44	0,33	0,23
28.07.1995	späte Wachsreife	72,5	0,38	0,27	0,25
04.08.1995	kurz vor Vollreife	53,2	0,37	0,33	0,19
11.08.1995	Vollreife	44,4	0,39	0,34	0,23
22.09.1995	Totreife	41,8	0,79	0,49	0,34

Tab.7: Erntedaten, Tausendkornmassen (TKM) und Extraktmengen nach der *n*-Hexan-Extraktion bzw. nach der DEAE-Sephadex A 25-Säule von cv. Salome 1996 (10 g-Äquivalente)

Erntedatum	Erntestadium	TKM (g)	Menge nach <i>n</i> -Hexan-Extraktion (g)	Menge nach DEAE-Sephadex A 25-Säule (g)	
				NF	SF
19.07.1996	Milchreife	49,6	0,69	0,31	0,61
26.07.1996	frühe Wachsreife	81,6	0,38	0,20	0,25
01.08.1996	späte Wachsreife	88,8	0,41	0,21	0,24
09.08.1996	kurz vor Vollreife	93,8	0,40	0,31	0,26
16.08.1996	Vollreife	93,9	0,27	0,20	0,18
27.09.1996	Totreife	51,2	0,41	0,31	0,13

Danach wurde die wäßrige Phase an Celite gebunden, am Vakuumrotationsverdampfer eingengt und im Exsikkator über KOH getrocknet. Nach der Bestimmung der Extraktmenge (s. Tab.4 bis 7) wurde der an Celite gebundene Extrakt an DEAE-Sephadex A 25 fraktioniert (Kap.2.3). Die nach dieser Säule erhaltenen Mengen in NF und SF sind in Tab.4 bis 7 für die entsprechenden Ernten aufgelistet. Jeweils 50 mg von SF wurden dann an einer 2-g-Kieselgelkartusche gereinigt (Kap.2.3). Nach dieser Säule verblieben in der Fraktion mit 10-30% MeOH ca. 10 mg an Extrakt, welcher danach entsprechend Vorschrift Kap.2.4.2 methyliert, permethyliert und an einer 1-g-Kieselgelsäule gereinigt wurde. Die nach der 1-g-Kieselgelsäule verbleibenden Probenmengen betragen weniger als 1mg. Anschließend wurden die permethylierten Proben in der GC-MS (Kap. 2.4.1) analysiert.

Die mittels GC-MS und den entsprechenden Kalibrierungskurven (Abb.1 bis 3, Anhang) gewonnenen endogenen Gehalte an GA-O-glucosiden und Gibberellinen sind für cv. Himalaya in Tab.16 und für cv. Salome in Tab.17 (s. Kap.3.2.2) zusammengefaßt.

2.6.3 Metabolische Markierung des GA₂₀-13-O-Glc in cv. Himalaya und cv. Salome durch Applikation von [17-D₂]GA₂₀, Nachweis der metabolisch gebildeten [17-D₂]-markierten Verbindungen und Keimung der mit [17-D₂]GA₂₀ gefütterten Karyopsen (Rekonversion)

Für die Fütterung von [17-D₂]GA₂₀ an die Karyopsen wurden die folgenden Lösungen eingesetzt:

Lösung 1: 5 mg [17-D₂]GA₂₀ gelöst in 250 µl EtOH, 875 µl Wasser und 125 µl Tween 20 (26,3 mg/1ml H₂O)

Lösung 2: 5 mg [17-D₂]GA₂₀ gelöst in 500 µl EtOH, 1750 µl Wasser und 250 µl Tween 20 (26,3 mg/1ml H₂O)

14 Tage nach Anthese wurden mit einer Spritze jeweils 25 µl der Lösung 1 zwischen die Karyopsen von 50 milchreifen Ähren der Sorte cv. Himalaya (Freilandanbau 1994) appliziert. Im Freilandanbau 1996 wurden analog 100 milchreife Ähren beider Sorten, cv. Himalaya und cv. Salome, mit je 25 µl der Lösung 2 gefüttert. Einen Tag nach Applikation wurden die Ähren nochmals mit 20 ml Tween 20 (Benetzungsreagenz; 500 mg in 20 ml H₂O) besprüht.

Die Ernte der gefütterten Ähren erfolgte 35 Tage nach Applikation. Die geernteten reifen Karyopsen wurden bis zur Untersuchung der metabolisch gebildeten Verbindungen bzw. bis zum anschließenden Keimungsversuch im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Für den Nachweis der metabolisch gebildeten Verbindungen in den reifen Karyopsen wurden 4 g der gefütterten Karyopsen von cv. Himalaya (1994) mit dem Ultra Turrax in 50 ml 80%igem MeOH homogenisiert. Nach 24 Stunden bei 4 °C wurde abdekantiert und nochmals mit 40 ml 80%igem MeOH extrahiert. Nach wiederholtem Abdekantieren wurde der verbleibende Rückstand mit 10 ml MeOH gewaschen. Nach dem Einengen der gesammelten MeOH-Extrakte verblieben im Vakuum 175 mg Extrakt. Dieser wurde in 1 ml 80%igem MeOH gelöst und auf 10 ml DEAE-Sephadex A25 (Acetat-Form) gegeben und mit 40 ml MeOH (NF), 50 ml 4 N HOAc in MeOH (SF₁) und 20 ml 7 N HOAc in MeOH (SF₂) eluiert. Nach dem Einengen im Vakuum verblieben in den drei Fraktionen folgende Mengen: 123 mg in NF, 10 mg in SF₁, 3 mg in SF₂. Die Fraktion SF₁ wurde in 100 µl 80%igem MeOH gelöst und auf eine 2-g-Kieselgelkartusche gegeben und entsprechend Vorschrift Kap.2.3 eluiert. Die nach dem Einengen im Vakuum verbleibenden 3 mg der Fraktion mit 10-30% MeOH wurden anschließend methyliert, permethyliert und an einer 1-g-Kieselgelsäule gereinigt (s. Kap.2.4.2).

Die beiden Fraktionen dieser Säule (Menge weniger als 1 mg) wurden in der GC-MS (Kap.2.4.1) analysiert. In Abb.21 (s. Kap.3.3.2) sind die metabolisch gebildeten [17-D₂]-markierten Verbindungen, die mittels der GC-MS-Analyse nachgewiesen werden konnten, zusammengefaßt.

Für die Untersuchung zur Rekonversion wurden 6 g der mit [17-D₂]GA₂₀-gefütterten Karyopsen der Sorte cv. Himalaya und cv. Salome des Erntejahres 1996, auf Filterpapier (Durchmesser 15 cm) in Petrischalen gelegt, mit destilliertem Wasser befeuchtet, mit einer mit Aluminiumfolie beschichteten Petrischale abgedeckt und im Klimaschrank bei 18 °C inkubiert. Nach 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Karyopsen geerntet und mit dem Ultra Turrax in 50 ml 80%igem MeOH zerkleinert, über Nacht extrahiert, dann abdekantiert und nochmals in 40 ml 80%igem MeOH über Nacht extrahiert. Nach wiederholtem Abdekantieren wurde mit 10 ml 80%igem MeOH gewaschen und anschließend die gesammelten Extrakte am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt. Die verbleibenden Extraktmengen sind in der Tab.9 zusammengefaßt:

Tab.9: Extraktmenge (mg) der inkubierten Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome nach der MeOH-Extraktion

	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Himalaya 1996	287	297	256	248	276
Salome 1996	347	399	327	321	357

Diese Extrakte wurden anschließend wieder in 1 ml 80%igem MeOH gelöst und zu diesen Lösungen folgende Standardmengen [3-D,17-D₂]GA₂₀ (Stl 5), [1-D,2-D,17-D₂]GA₁ (Stl 6) und [3-D,17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (Stl 7) zugesetzt:

Tab.10: Stammlösungen und Mengen an zugesetzten internen Standards zu den Extrakten der inkubierten Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome

	Stl	Volumen (ml)	Menge (ng/g FG)
Himalaya 1996	5/6/7	0,36/0,12/0,24	60/20/40
Salome 1996	5/6/7	0,56/0,14/0,56	80/20/80

Die Extrakte wurden dann auf die entsprechende Menge DEAE-Sephadex A 25 (Acetat-Form) gegeben (150 mg Extrakt auf 10 ml Gelbett) und mit folgendem Gradienten eluiert: 40 ml MeOH (NF), 50 ml 4 N HOAc (SF₁) und 20 ml 7 N HOAc in MeOH (SF₂). Nach dem Einengen am Vakuumrotationsverdampfer wurden in den drei Fraktionen (NF, SF₁ und SF₂) folgende Mengen bestimmt:

Tab.11: Extraktmenge (mg) der inkubierten Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome in den Fraktionen der DEAE-Sephadex A 25-Säule

	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
cv. Himalaya					
NF	206	176	191	191	225
SF ₁	27	50	16	22	35
SF ₂	7	17	5	10	7
cv. Salome					
NF	289	314	236	260	281
SF ₁	30	48	32	39	50
SF ₂	4	10	5	7	9

Die Fraktionen SF₁ wurden jeweils in 100-150 µl 80%igem MeOH gelöst und jeweils an einer 2-g-Kieselgelkartusche entsprechend Vorschrift Kap.2.3 gereinigt. Nach dieser Säule verblieben 1-5 mg des anschließend zu methylierenden Extraktes (s. Kap.2.4.2) in der Fraktion mit 10-30% MeOH. Nach der Methylierung wurde der Extrakt geteilt. Die eine Hälfte wurde permethyliert und die andere trimethylsilyliert (Kap.2.4.2). Danach erfolgte die GC-MS Analyse der derivatisierten Proben (Kap.2.4.1), deren Mengen wiederum unter 1 mg lagen. Die mittels der GC-MS und der entsprechenden Kalibrierungskurven gewonnenen Gehalte an [17-D₂]-markierten als auch an endogen nachgewiesenen Verbindungen im Verlauf der Keimung sind für cv. Himalaya in Tab.18 und für cv. Salome in Tab.19 (s. Kap.3.3.2) dargestellt.

2.6.4. Kompartimentierung von GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc in den reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome

Zur Untersuchung der Verteilung des GA₂₀-13-O-Glc und des GA₂₀ in verschiedenen Kompartimenten der Karyopsen wurden von jeweils 50 g der reifen Karyopsen der Gerstensorte cv. Himalaya Ernte 1995 und der Sorte cv. Salome Ernte 1995 (entspelzt) der Embryo mit dem Skalpell abgetrennt (Abb.9):

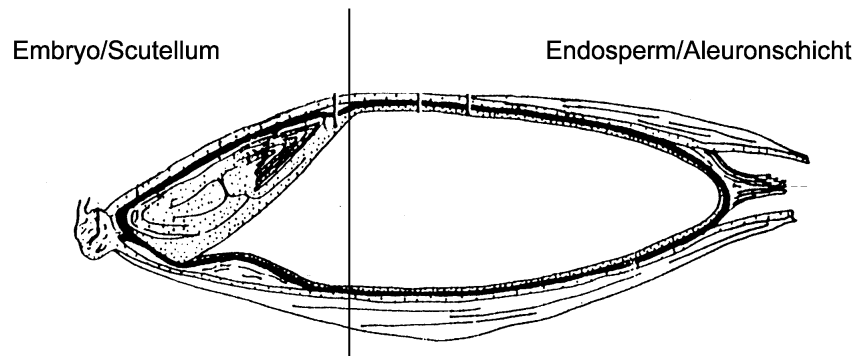


Abb.9: Kompartimente der Gerstenkaryopsen

Die Mengen der gewonnenen embryo- und endospermhaltigen Teile der reifen Karyopsen (3,6 g bzw. 46,3 g für die Sorte cv. Himalaya und 4,5 g bzw. 45,5 g für die Sorte cv. Salome) wurden getrennt voneinander entsprechend Abb.8 aufgearbeitet.

Der Embryo-Teil wurde jeweils in 50 ml 80%igem MeOH und der Endosperm-Teil jeweils in 150 ml 80%igem MeOH im Ultra Turrax homogenisiert und extrahiert. Danach wurde mit derselben Menge an 80%igem MeOH weitere zweimal extrahiert, die vereinigten MeOH-Extrakte eingeeengt und nach Vorschrift Kap.2.2 mit *n*-Hexan extrahiert. Den verbleibenden wäßrigen Phasen wurden dann Standardmengen von 5 ng/g FG an [17-D₂]GA₂₀ und [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (Stl 2) zugesetzt:

Tab.12: Zugesezte Volumina an Stl 2 (µl) zur wäßrigen Phase der Kompartimente der Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome

		Stammlösung	Volumen
Himalaya:	Embryo	2	37,6
	Endosperm	2	477,0
Salome:	Embryo	2	45,0
	Endosperm	2	455,0

Danach wurde die wäßrige Phase an Celite gebunden und am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt (Extraktmengen für embryo- bzw. endospermhaltigen Teil von cv. Himalaya: 0,61 g bzw. 1,5 g und von cv. Salome 0,85 g bzw. 1,75 g).

Die gewonnenen Extrakte des Embryos beider Sorten bzw. des Endosperms beider Sorten wurden dann an 50 ml bzw. an 75 ml DEAE-Sephadex A 25 (Acetat-Form) gereinigt (Kap.2.3) und ergaben die in Tab.13 aufgeführten Mengen in NF und SF:

Tab.13: Extraktmenge (g) der Kompartimente beider Sorten in den Fraktionen der DEAE-Sephadex A 25-Säule

	Endosperm		Embryo	
	NF	SF	NF	SF
Himalaya	0,4	0,2	1,1	0,4
Salome	0,6	0,3	1,2	0,6

Die SF des Embryo-Teils beider Sorten wurde anschließend an einer 10-g-Kieselgelsäule und die des Endosperm-Teils beider Sorten an einer 20-g-Kieselgelsäule gereinigt (Kap.2.3), wobei in den Fraktionen mit 10-30% MeOH jeweils 1-3 mg an Extrakt für den Embryo und 5-10 mg an Extrakt für das Endosperm verblieben. Nach der Methylierung und Permethylierung wurden diese Fraktionen an einer 1-g-Kieselsäule gereinigt (s. Kap.2.4.2) und anschließend die verbleibenden Proben (Mengen weniger als 1 mg) in der GC-MS (Kap.2.4.1) vermessen.

In Abb.24 (s. Kap.3.4.2) sind die aus der GC-MS Analyse und den Kalibrierungskurven resultierenden endogene Gehalte an GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc für die Kompartimente beider Sorten zusammengefaßt.

2.7 Bestimmung der α -Amylase in inkubierten Kompartimenten

Herstellung der 1%igen Substratlösung [109]:

100 mg an Stärke-Azur (Sigma, München) und 11 mg CaCl₂ x 6H₂O wurden in 10 ml NaOAc-Puffer, 10 mM, pH 4,8 (hergestellt nach Vorschrift [110]) unter Rühren eine Stunde erhitzt und anschließend abgekühlt. Stärke-Azur ist eine Kartoffelstärke, an welcher der blaue Farbstoff Remazolbrilliantblue R kovalent gebunden ist.

Herstellung der Enzymlösung [modifiziert nach 50]:

25 reife Karyopsen wurden 15 min mit einer 1%igen NaOCl-Lösung oberflächensterilisiert, danach mehrfach mit bidestilliertem Wasser gewaschen, entsprechend Kap. 2.6.4 in die beiden Kompartimente zerlegt und anschließend entsprechend Kap.2.6.3 inkubiert. Nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden die inkubierten Kompartimente mit dem Ultra Turrax in jeweils 6 ml Pufferlösung homogenisiert und für 30 min bei RT gerührt.

Anschließend wurde für 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge K 24; Eppendorf, Engelsdorf). Der gesamte Überstand wurde für 30 min auf dem Wasserbad auf 60 °C erwärmt. Nach dem Erhitzen wurden 2 ml dieser Lösung erneut bei 5000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge 5402; Eppendorf, Engelsdorf). 0,1 ml des Überstandes wurden für den folgenden Stärke-Azur Test abgenommen.

Stärke-Azur Test [109]:

In diesem Test werden 0,5 ml der frisch hergestellten Substratlösung mit 0,1 ml der Enzymlösung für 30 min bei RT geschüttelt (Thermomixer 5436; Eppendorf, Engelsdorf). Dabei wird die Stärke durch α -Amylase abgebaut. Nach 30 min wurde die Umsetzung mit 0,5 ml 20%iger Trichloressigsäure (Fluka, Neu-Ulm) gestoppt, wobei die unverdaute Stärke als blauer Niederschlag ausfällt und zur Abtrennung 5 min bei 14000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge 5402; Eppendorf, Engelsdorf) wird. Die abgebauten Oligosaccharide verbleiben in einer durch den Farbstoff Remazolbrilliantblue R blaugefärbten Lösung. Von dieser wurde die Extinktion an einem UV-Spektrophotometer (UV 1202; SHIMADZU, Kyoto, Japan) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Von den ermittelten Werten wurde der Blindwert, bei dem anstelle der Enzymlösung 0,1 ml bidestilliertes H₂O eingesetzt wurde, abgezogen. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung ermittelt.

Kalibrierungskurve zur Enzymquantifizierung:

Dazu wurden folgende Enzymlösungen an α -Amylase von *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.2.1.1.; Serva, Heidelberg) hergestellt: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 und 4 μ g α -Amylase gelöst in jeweils 0,1 ml Pufferlösung. Zu diesen Lösungen wurden jeweils 0,5 ml an

Substratlösung gegeben und 30 min geschüttelt. Nach der Zugabe von 20%iger Trichloressigsäure und dem Zentrifugieren (s. Test) wurde nach Abzug des Blindwertes die Extinktion der entsprechenden Enzymlösung in einer Doppelbestimmung vermessen. Durch das Auftragen der Extinktionen (Mittelwert aus Doppelbestimmung) gegen die Menge an eingesetzter α -Amylase konnte die im Anhang dargestellte Kalibrierungskurve (Abb.10) gewonnen werden, mit deren Hilfe die Menge an α -Amylase (auch Mittelwert aus Doppelbestimmung) in den Kompartimenten der Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome während der Keimung bestimmt werden konnte (Tab.21, Kap.3.5). Dabei wurden die Enzymkonzentrationen des Extraktes so gewählt, daß der Wert der zu messenden Extinktionsdifferenz zwischen 0,1 und 1,4 betrug. Dies entsprach dem linearen Bereich der Kalibrierungskurve (Geradengleichung und Parameter der linearen Regression s. Anhang). Bei einer Menge von mehr als 6 μg α -Amylase erhöhte sich die Extinktionsdifferenz nicht mehr, da durch diese Menge die gesamte Stärke bereits abgebaut wurde. Folglich mußte die Konzentration der Enzymlösung der inkubierten Kompartimente der Karyopsen so gewählt werden, daß die Menge an α -Amylase durch den linearen Bereich der Kalibrierungskurve bestimmt werden konnte.

Zeit-Substrat-Umsatzkurve

Zur Bestimmung der für die Umsetzung benötigten Zeit wurde eine Zeit-Substrat-Umsatzkurve aufgestellt. Dafür wurden jeweils 2 μg an α -Amylase (Menge aus linearen Bereich der Kalibrierungskurve) in 0,1 ml Pufferlösung gelöst und mit 0,5 ml Substratlösung für 10, 20, 30, 60, 90, 120 und 180 min geschüttelt. Nach der Umsetzung wurde mit 20%iger Trichloressigsäure gestoppt und anschließend zentrifugiert. Von dem verbleibenden Überstand wurde nach Abzug des Blindwertes die Extinktion der entsprechenden Enzymlösung in einer Doppelbestimmung vermessen. Durch das Auftragen der Extinktionen (Mittelwert aus Doppelbestimmung) gegen die Zeit der entsprechenden Umsetzung konnte die im Anhang abgebildete Zeit-Substrat-Umsatzkurve erhalten werden (Abb.11).

Aus dem linearen Bereich dieser Kurve wurde für die anschließenden Umsetzungen eine Zeit von 30 min ausgewählt (Geradengleichung und Parameter der linearen Regression s. Anhang).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Identifizierung der GA-O-glucoside und der Gibberelline in den reifen Gerstenkaryopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome

3.1.1 Voraussetzungen

Im Hinblick auf eine potentielle Depotfunktion von GA-O-glucosiden und ihrer Beteiligung am Gesamtmetabolismus der Gibberelline (Kap.1.2), insbesondere während der frühen Keimungsphase sollte zunächst das Spektrum von endogenen GA-O-glucosiden und der entsprechend freien Gibberelline in den reifen Gerstenkaryopsen untersucht werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Gerstensorten, *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome, ausgewählt.

Bei der Sorte cv. Himalaya handelt es sich um die allgemein für den α -Amylase-Biotest eingesetzte Sorte, die sich durch eine niedrige α -Amylase-Induktion im embryofreien Endosperm auszeichnet. Für Vergleichszwecke wurde die Sorte cv. Salome, eine im Feldanbau eingesetzte Sommergerste mit gespelzten Karyopsen einbezogen (s. Abb. 7). Die Biosynthesesequenz der endogenen freien Gibberelline in der Gerste wurde von Großelindemann eingehend untersucht, und dabei der in Abb.10 dargestellte "early 13-hydroxylation pathway" bewiesen [111].

Der direkte Nachweis endogener GA-O-glucoside in der GC-MS als trimethylsilylierte Derivate ließ sich im Gegensatz zu den freien Gibberellinen nicht realisieren. Die direkte Analyse der GA-O-glucoside in der GC-MS gelingt jedoch mit permethylierten Derivaten. Diese Permethylderivate der GA-O-glucoside zeichnen sich sowohl durch eine gute Verdampfbarkeit, verbunden mit thermischer und chemischer Stabilität, sowie durch handhabbarere Molekulargewichte ($< m/z$ 650) aus. Außerdem lassen sich in der GC-MS die permethylierten GA-O-glucoside und die Gibberelline gleichermaßen gut vermessen und ermöglichen damit die simultane Analyse freier und konjugierter Gibberelline in einer Probe.

Die permethylierten GA-O-glucoside wurden von Schmidt und Schneider ausführlich in der GC-MS an synthetisierten Verbindungen untersucht [108]. Zwar ist im Gegensatz zu den permethylierten Gibberellinen der Molekularionenpeak der permethylierten GA-O-glucoside nur schwach ausgeprägt, jedoch ist anhand des charakteristischen Frag-

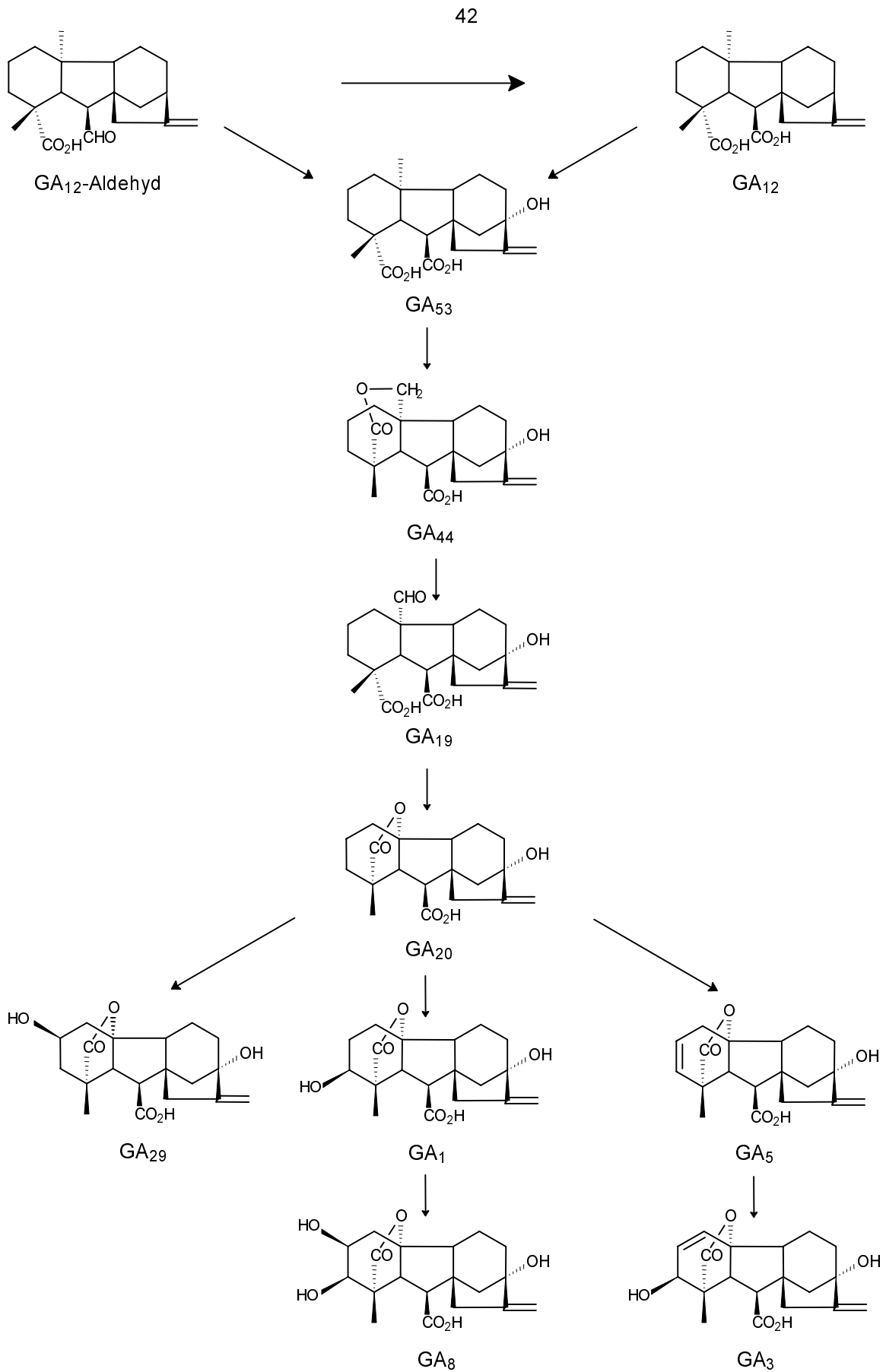


Abb.10.: „Early 13-hydroxylation pathway“ in keimenden Gerstenembryos der Sorte cv. Himalaya

mentierungsmusters der permetylierten GA-O-glucoside deren Identifizierung leicht möglich. Ein allgemeines Schema für die Fragmentierung der permethylierten GA-O-glucoside ist in Abb.11 dargestellt.

Unter Einsatz permethylierter Derivate konnten von Schneider und Schliemann bereits in den reifen Karyopsen der Gerstensorte cv. Trumpf folgende GA-O-glucoside nachgewiesen werden: das GA₂₀-13-O-Glc, das GA₂₉-2-O-Glc, das GA₂₉-13-O-Glc und das GA₈-2-O-Glc (Tab.1).

In Fortführung dieser Arbeiten sollten relevante Pools an GA-O-glucosiden und freien Gibberellinen in den reifen Karyopsen der Gerstensorte cv. Himalaya und cv. Salome als permethylierte Verbindungen in der GC-MS nachgewiesen werden, wobei auf das Vorkommen von GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc sowie ihrer Metabolite besonderes Augenmerk gelegt werden sollte.

3.1.2 Ergebnisse

Für die Isolierung und anschließende Identifizierung der GA-O-glucoside und der Gibberelline aus den reifen Gerstenkaryopsen von cv. Himalaya und cv. Salome wurde das in Abb.8 dargestellte optimierte Aufarbeitungsschema entwickelt, dessen Anwendbarkeit durch akzeptable Wiederfindungsraten mittels u [T]-markierter Verbindungen bestätigt werden konnte (s. Kap.2.5)

Unter Vermeidung aufwendiger Verteilungsschritte sollte der breite Polaritätsbereich von GA-O-glucosiden und von entsprechend freien Gibberellinen gemeinsam aus den Gerstenkaryopsen für die GC-MS angereichert werden (Kap.2.2). Hierfür erwies sich die Kombination von Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A 25 und Adsorptionschromatographie an Kieselgel (Kap.2.3) als günstig, wofür Wiederfindungsraten von 97,8% für die DEAE-Sephadex A 25-Säule des u [T]GA₈-2-O-Glc, und für die Kieselgelsäule von 57,4% für das u [T]GA₂₀, von 91,3% für das u [T]GA₂₀-13-O-Glc und von 91,2% für das u [T]GA₈-2-O-Glc ermittelt wurden (s. Kap.2.5).

Mit der anschließenden Methylierung bzw. Permethylierung (Kap.2.4.2) wurden die Verbindungen in einen thermisch und chemisch stabileren Zustand überführt und waren somit der GC-MS zugänglich. Für die Permethylierung eingesetzter tritiummarkierter Standards betragen die Wiederfindungsraten für das u [T]GA₂₀ 73%, für das u [T]GA₂₀-13-O-Glc 79% und für das u [T]GA₈-2-O-Glc 33% (s. Kap.2.5).

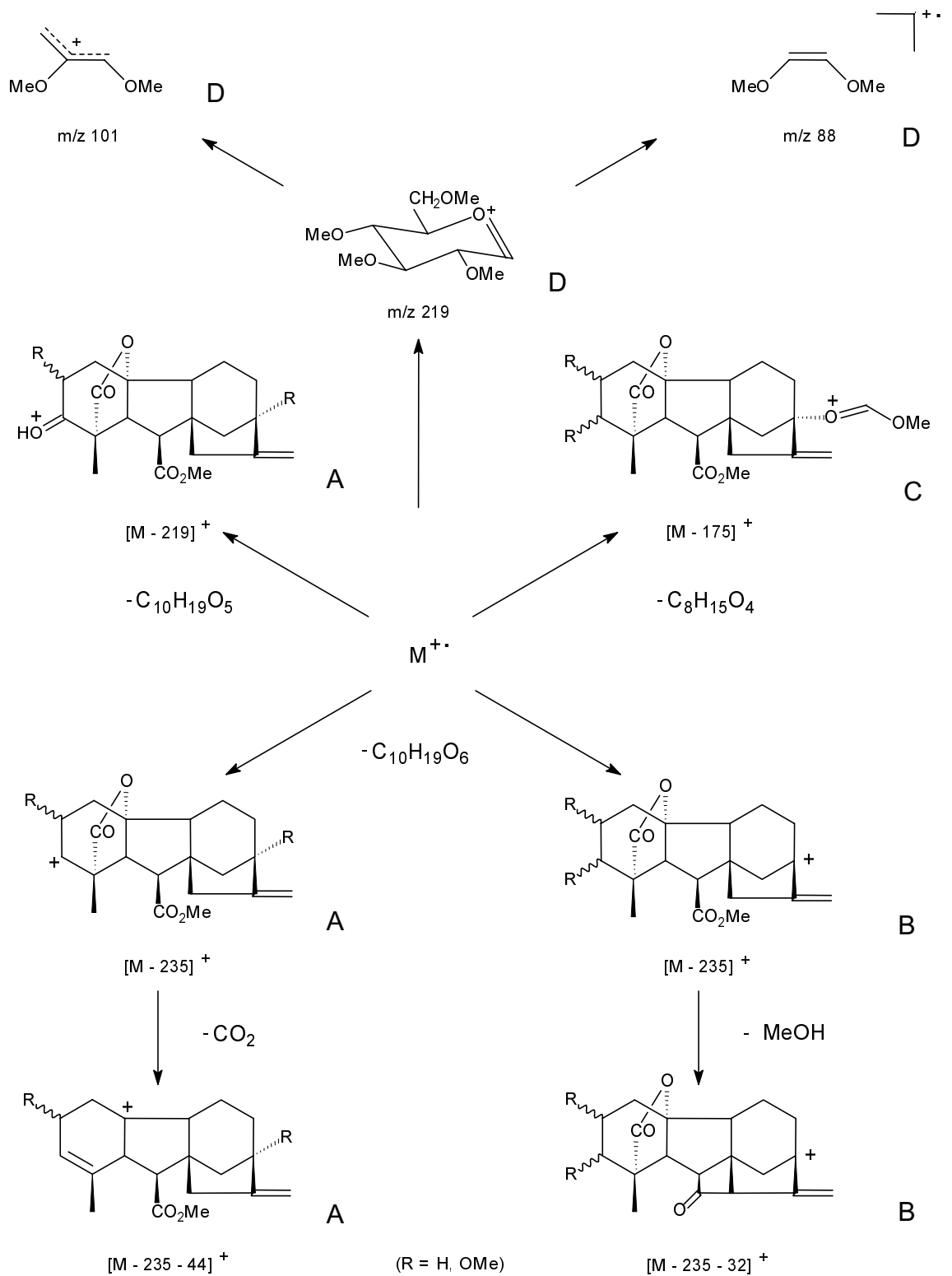


Abb.11: Allgemeines Fragmentierungsschema der permethylierten GA-O-glucoside (A: Fragmentationen von A-Ring-glucosylierten Gibberellinen, B: Fragmentationen von C-Ring-glucosylierten Gibberellinen, C: Fragmentation bei equatorial angeordneter Glucose, D: Fragmentationen der Glucose) [112]

Für den qualitativen Nachweis endogener freier Gibberelline und GA-O-glucoside in den reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome wurden jeweils 50 g mit 80%igem MeOH extrahiert und nach Abdampfen von MeOH der verbleibende wäßrige Rückstand mittels *n*-Hexan von Chlorophyll, Lipiden und anderen unpolaren Pflanzenbestandteilen befreit (Kap.2.2). Zur weiteren Anreicherung der GA-O-glucoside und Gibberelline wurde der Extrakt einer Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A25 (Acetat-Form) und durch Kieselgelchromatographie unterworfen (Kap.2.3). Bei der DEAE-Sephadex-Chromatographie werden in der neutralen Fraktion (NF) neben den GA-GE ca. 90% der Verunreinigungen abgetrennt. Anschließend werden mit zunehmender HOAc-Konzentration zunächst die Gibberelline und dann die GA-O-glucoside eluiert. Da die Gibberelline und die GA-O-glucoside überlappende Polaritäten aufweisen, werden sie hierbei nicht getrennt und wurden in einer sauren Fraktion (SF) gemeinsam gesammelt. Die weitere Reinigung der SF erfolgte an Kieselgel, wobei die Gibberelline und die GA-O-glucoside wiederum in einer gemeinsamen Fraktion (10-30% MeOH) gesammelt wurden. Diese Sammelfraktion wurde nach dem Trocknen im Vakuum derivatisiert (Kap.2.4.2). Hierbei wurde zunächst durch die Umsetzung mit etherischer Diazomethanlösung die Carboxylgruppe am Kohlenstoffatom C-7 methyliert und danach erfolgte die Permethylierung der restlichen Hydroxygruppen am Gibberellinskelett und Zuckermolekül. Nach der Permethylierung wurde nochmals an einer Kieselgelsäule gereinigt, wobei in zwei Fraktionen unterteilt werden konnte: die permethylierten Gibberelline und die permethylierten GA-O-glucoside.

Somit konnten die permethylierten GA-O-glucoside und die Gibberelline, die zuvor gemeinsam von der DEAE-Sephadex A 25-Säule und der Kieselgelsäule eluiert wurden, getrennt voneinander in der GC-MS analysiert werden.

Zur Identifizierung der permethylierten GA-O-glucoside und der Gibberelline in der GC-MS wurde von den entsprechenden Verbindungen ein full scan (FS) Massenspektrum aufgenommen und der R^1 -Wert in der GC bestimmt (Kap.2.4.1). Mit Hilfe des FS-Massenspektrums und des R^1 -Wertes konnten in den reifen Karyopsen, sowohl von cv. Himalaya als auch von cv. Salome, das GA₂₀-13-O-Glc, das GA₈-2-O-Glc und das entsprechend freie GA₂₀ und GA₈ jeweils als permethylierte Verbindungen eindeutig identifiziert werden (Abb.12).

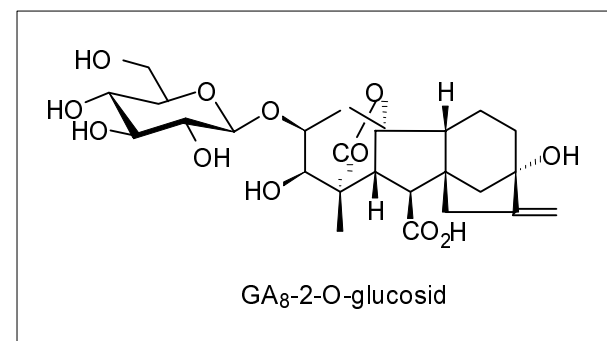
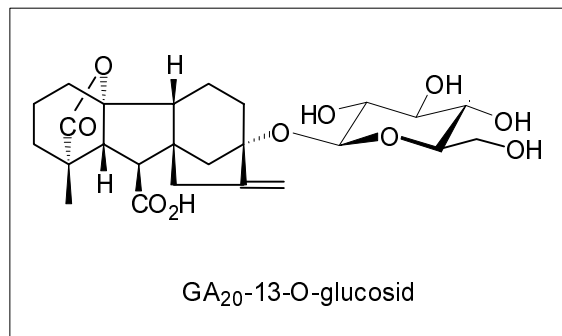
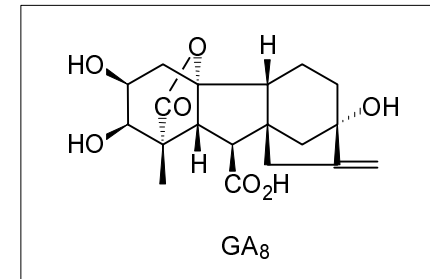
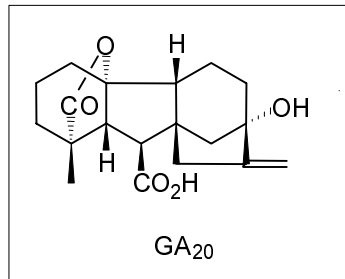


Abb.12: In reifen Gerstenkaryopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome mittels der GC-MS identifizierte GA-O-glucoside und Gibberelline

In Tab.15 sind die charakteristischen Fragmentionen (m/z), deren Intensitäten (%) und die R^I -Werte für das permethylierte GA_{20} -13-O-Glc und GA_8 -2-O-Glc für beide Gerstensorten dargestellt. Der Vergleich mit den entsprechenden Daten der synthetisierten Standards zeigt, daß sowohl die Fragmente, als auch deren Intensitäten und die R^I -Werte übereinstimmen.

Zur Identifizierung des permethylierten GA_{20} und GA_8 wurde neben ihren Molekularionenpeaks bei m/z 360 und m/z 420 das gemeinsame Fragmention bei m/z 317 heran-gezogen. Auch hier stimmen Molekularionen- und Fragmentionenpeak, deren Intensitäten und die R^I -Werte mit denen der authentischen Standards überein (s. Tab.14).

Tab.14: Retentionsindices (R^I), charakteristische Ionen (m/z) und deren relative Intensitäten (%) des FS-Massenspektrums der permethylierten Gibberelline aus reifen Karyopsen der Sorte cv. Himalaya und cv. Salome im Vergleich zu permethylierten Standards

Verbindung:	R^I	Intensitäten (%) der charakteristischen Ionen:	
		m/z 360	m/z 317
GA_{20}			
als Standard	2500	100	88
in cv. Himalaya	2500	100	81
in cv. Salome	2496	100	87
GA_8		m/z 420	m/z 317
als Standard	2688	100	53
in cv. Himalaya	2692	100	60
in cv. Salome	2692	100	40

Tab.15: Retentionsindices (R^I), charakteristische Ionen (m/z) und deren relative Intensitäten (%) des FS-Massenspektrums der permethylierten GA-O-glucoside aus den reifen Karyopsen der Sorte cv. Himalaya und cv. Salome im Vergleich zu permethylierten Standards

Verbindung:	R^I	Intensitäten (%) der charakteristische Ionen:						
		m/z 88	m/z 101	m/z 187	m/z 209	m/z 297	m/z 329	m/z 389
<hr/>								
GA ₂₀ -13-O-Glc		m/z 88	m/z 101	m/z 187	m/z 209	m/z 297	m/z 329	m/z 389
als Standard	3426	100	48	9	8	10	41	9
in cv. Himalaya	3423	100	43	8	6	8	34	7
in cv. Salome	3426	100	39	7	5	6	35	7
<hr/>								
GA ₈ -2-O-Glc		m/z 88	m/z 101	m/z 187	m/z 313	m/z 345	m/z 389	m/z 449
als Standard	3656	100	79	10	8	9	11	14
in cv. Himalaya	3651	100	72	10	7	8	12	12
in cv. Salome	3650	100	70	8	7	8	9	11
<hr/>								

3.1.3 Diskussion

Aus den in Kap.3.1.2 beschriebenen Ergebnissen geht hervor, daß mit der entwickelten Aufarbeitungs- und Analysenmethode auch in reifenden Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome, wie zuvor in cv. Trumpf gefunden, GA₂₀, GA₈, GA₂₀-13-O-Glc und GA₈-2-O-Glc in meßbaren Poolgrößen nachweisbar sind.

Obwohl es Hinweise auf das Vorkommen von GA₁-3-O-Glc in reifen Karyopsen von cv. Himalaya gibt, konnte weder GA₁-3-O-Glc noch GA₁-13-O-Glc in reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome nachgewiesen werden. Es muß daher angenommen werden, daß diese GA-O-glucoside in der weiteren Entwicklung (Keimung) der Karyopsen keine Rolle spielen. Auch das in cv. Trumpf gefundene GA₂₉-13-O-Glc konnte in den untersuchten Sorten nicht gefaßt werden. Hierzu sei angemerkt, daß dieses Glucosid eines entaktivierten Gibberellins für die Physiologie der Karyopsen ohnehin keine weitere Bedeutung besitzt. Auch GA₁, das biosynthetisch zwischen GA₂₀ und GA₈ steht, konnte nicht gefunden werden. Offensichtlich ist der Pool dieses biologisch aktivsten GA in reifen Karyopsen unter der Nachweisgrenze der eingesetzten Methodik. Das schließt jedoch nicht aus, daß es entwicklungsbedingt zu Phasen aktiven Wachstums als das aktivste Streckungswachstumshormon in erhöhten Mengen auftritt. Jedoch hat man bisher keine Kenntnisse über die physiologisch relevanten Mengen an in der Pflanze benötigten GA₁ [52].

Von den in reifen Karyopsen identifizierten GA-O-glucosiden kann für das GA₂₀-13-O-Glc am ehesten eine Depotfunktion für die Freisetzung aktiver GA-Spezies nach Hydrolyse angenommen werden. Gemäß dem "early 13-hydroxylation pathway" können aus dem GA₂₀ sowohl GA₁ als auch das im α -Amylase-Biotest als aktivstes GA bekannte GA₃ entstehen (s. Abb.10).

Für die nachfolgend beabsichtigten Quantifizierungen der GA/GA-O-Glc-Pools während der Samenentwicklung sollten deshalb die Poolgrößen GA₂₀/GA₂₀-13-O-Glc verfolgt werden.

GA₈ und GA₈-2-O-Glc stellen logische Endprodukte des Metabolismus vom GA₂₀ über das GA₁ dar. Die Entwicklung der Pools von GA₈/ GA₈-2-O-Glc sollte damit Hinweise auf den Metabolismus des GA₂₀-Pools über das GA₁ liefern. Sie wurden deshalb in die Untersuchungen einbezogen. In Abb.13 ist die metabolische Verknüpfung der im folgenden Kap.3.2 zu quantifizierenden Gibberelline und GA-O-glucoside in reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome dargestellt.

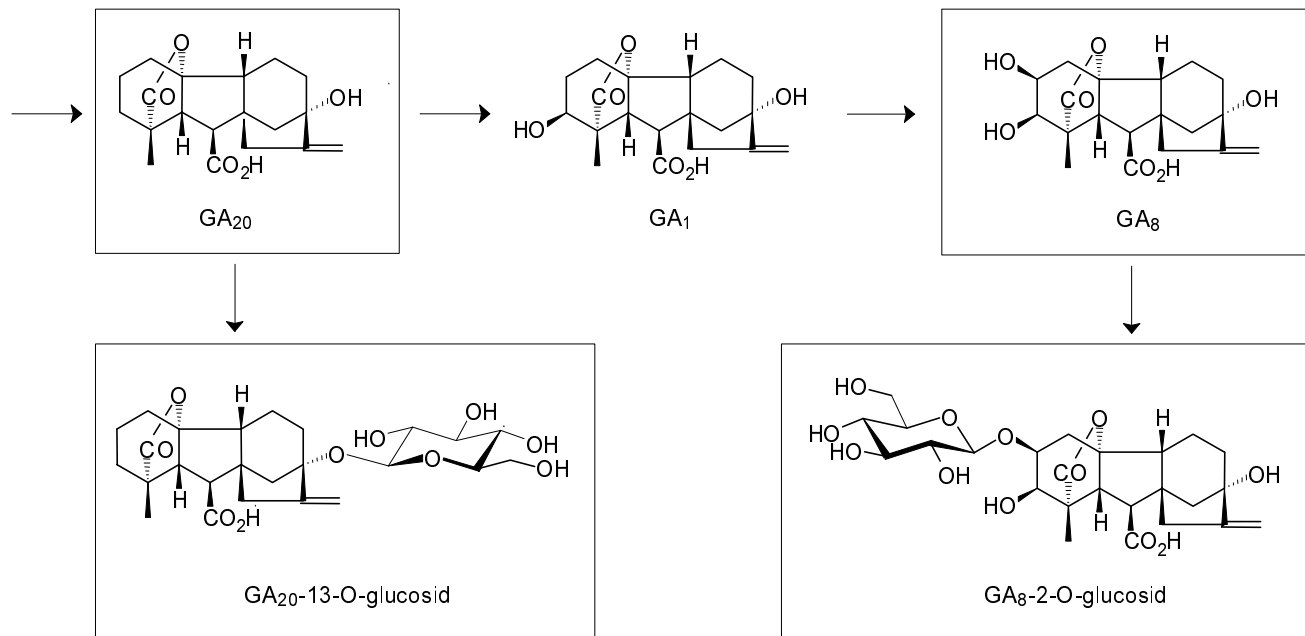


Abb.13: Metabolische Verknüpfung der identifizierten 13-hydroxylierten Gibberelline und ihrer GA-O-glucoside über das GA₁

3.2 Quantifizierung der Pools von GA₂₀, GA₈, GA₂₀-13-O-Glc und GA₈-2-O-Glc während der Samenreifung von cv. Himalaya und cv. Salome mittels Isotopenverdünnung in der GC-MS

3.2.1 Voraussetzungen

Obwohl durch eine Vielzahl von Metabolismusversuchen belegt ist, daß die Konjugatbildung von Gibberellinen in unterschiedlichem Pflanzenmaterial stattfindet, wird im allgemeinen angenommen, daß sich GA-Konjugate besonders in reifenden Samen anreichern [113]. Diese These wird insbesondere von der Tatsache abgeleitet, daß die bisher strukturell aufgeklärten GA-Konjugate überwiegend aus Samenmaterial isoliert worden sind (s. Tab.1). So würde die angenommene Akkumulation von GA-Konjugaten im Samen gut in das Bild der Entaktivierung von Gibberellinen zur Erreichung der Samenruhe bzw. zur Bildung eines Reservedepots für die Freisetzung von Gibberellinen während der Samenkeimung passen. Jedoch sind quantitative Analysen dieser Art infolge unzureichender Methodik bisher nicht durchgeführt worden.

Die im Folgenden beabsichtigte Quantifizierung der Poolveränderungen von GA₂₀-13-O-Glc und GA₈-2-O-Glc sowie ihrer Agluca GA₂₀ und GA₈ in reifenden Karyopsen der Gerste cv. Himalaya und cv. Salome erfordert eine besonders auf die Bedingungen der Spurenanalyse ausgerichtete Methodik. Hierfür wurde die bereits im Kap.3.1.2 beschriebene Probengewinnung mit anschließender GC-MS-Analyse eingesetzt. Zur Eliminierung von direkten Verlusten bzw. der Varianz durch experimentelle Einflüsse war weiterhin der Einsatz der internen Standard-Technik (Isotopenverdünnung in der GC-MS) erforderlich. Die dafür verwendeten Verbindungen müssen drei Voraussetzungen erfüllen:

1. Die Markierung muß während der gesamten durchgeführten Prozedur stabil sein.
2. Die Markierung darf die chemischen und physikalischen Eigenschaften nicht beeinflussen (Isotopeneffekte).
3. Die markierte und die endogene Verbindung müssen nebeneinander meßbar sein.

Nach Zusatz einer solchen internen Standardsubstanz zum Extrakt in definierten Mengen sollte das Verhältnis zwischen Standard und der zu bestimmenden endogenen Verbindung bis zur abschließenden Analyse konstant sein und die Ermittlung der Anfangskonzentration des Analyten im Extrakt ermöglichen.

Für Gibberelline hat sich der Einsatz von [17-D₂]-markierten Standards bewährt [89, 96] und auch für GA-O-glucoside wurde diese Art der Markierung verwendet, da:

1. [17-D₂]-Markierungen keinen Austauschreaktionen unterliegen
2. durch die Markierung kein abweichendes chemisches und physikalisches Verhalten beobachtet wird und
3. die durch die Markierung bedingte Erhöhung der Molmasse gegenüber der endogenen Verbindung um 2 *m/z* einen sicheren Nachweis der Fragmentationen im Isotopencluster erlaubt.

Da jedoch der Deuterierungsgrad von 100% verschieden ist und der M+2-Beitrag der endogenen Verbindung nicht vernachlässigt werden kann, müssen für die Auswertung der Ionencluster entweder entsprechende Rechner- oder Berechnungsprogramme [113] benutzt oder experimentell eine Kalibrierungskurve mit synthetischen Gemischen ermittelt werden [114]. Letzteres Verfahren wurde für die folgenden Untersuchungen gewählt. Solche Kalibrierungskurven eliminieren nicht nur die oben genannten Fehler, sondern zeigen mit ihren linearen Kurvenabschnitt den Einsatzbereich für die Messungen an.

Für die Analyse der permethylierten GA-O-glucoside wurden in Ermangelung eines meßbaren Molekularionenpeaks zwei Fragmente ausgewählt, von denen übereinstimmende Kurven erhalten wurden (Abb.14). Das bestätigt zunächst, daß bei der Fragmentierung kein Deuteriumverlust eintritt und ermöglicht für die quantitative Analyse eine *de facto* Doppelbestimmung.

Nach ihrer Identifizierung sollten in den reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome folgende endogene Verbindungen während des Reifungsprozesses quantitativ verfolgt werden: GA₂₀-13-O-Glc, GA₈-2-O-Glc, GA₂₀ und GA₈. Für den Ausschluß einer zu hohen Fehlergrenze bei der Quantifizierung der sehr geringen Mengen an endogener Verbindung mittels Isotopenderdünnung in der GC-MS, bedingt durch eine zu hohe Varianz innerhalb der angewandten Analytik, wurden synthetische Standardgemische wiederholt injiziert.

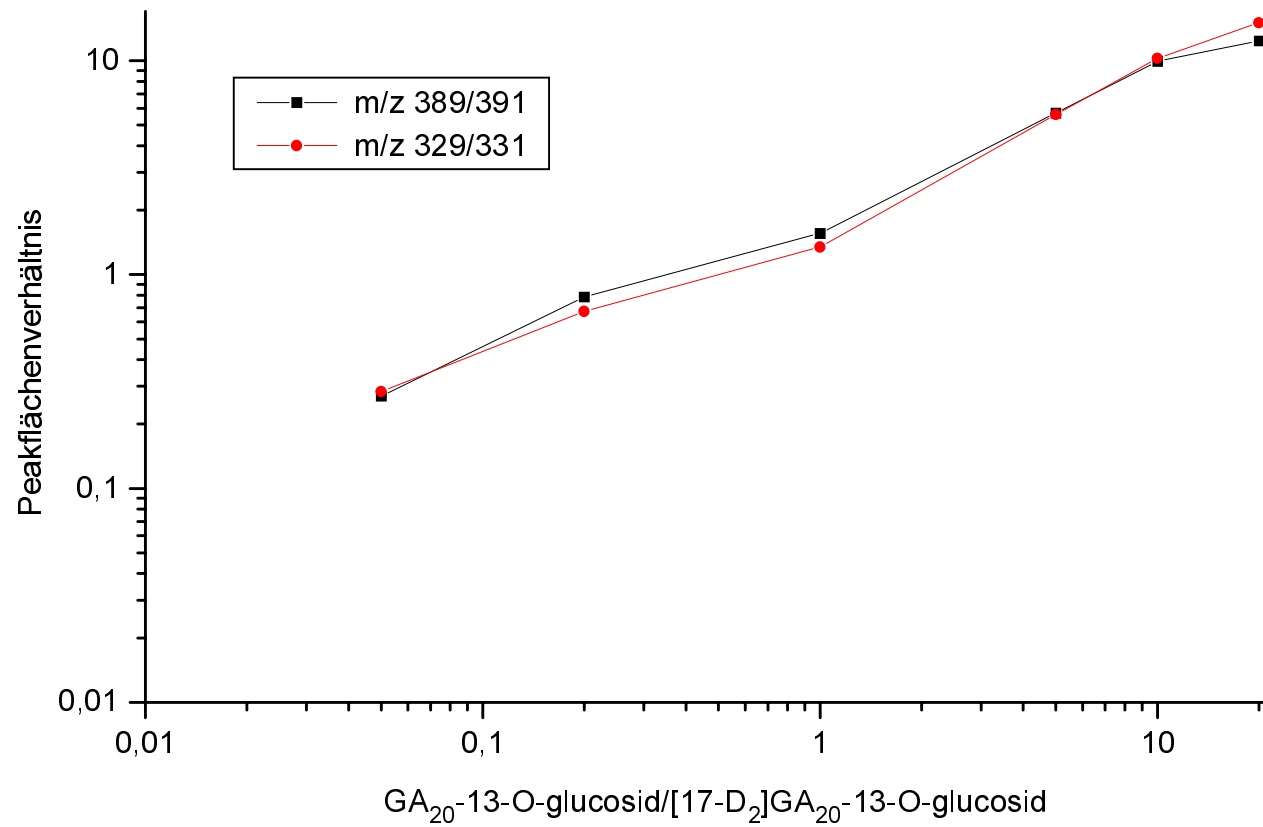


Abb.14: Kalibrierungskurven von Gemischen aus unmarkiertem und [17-D₂]-markiertem GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert) zur Quantifizierung des endogenen GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert) durch zwei unterschiedliche Fragmentationen paare

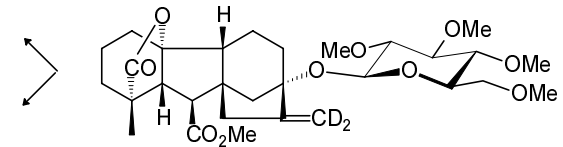
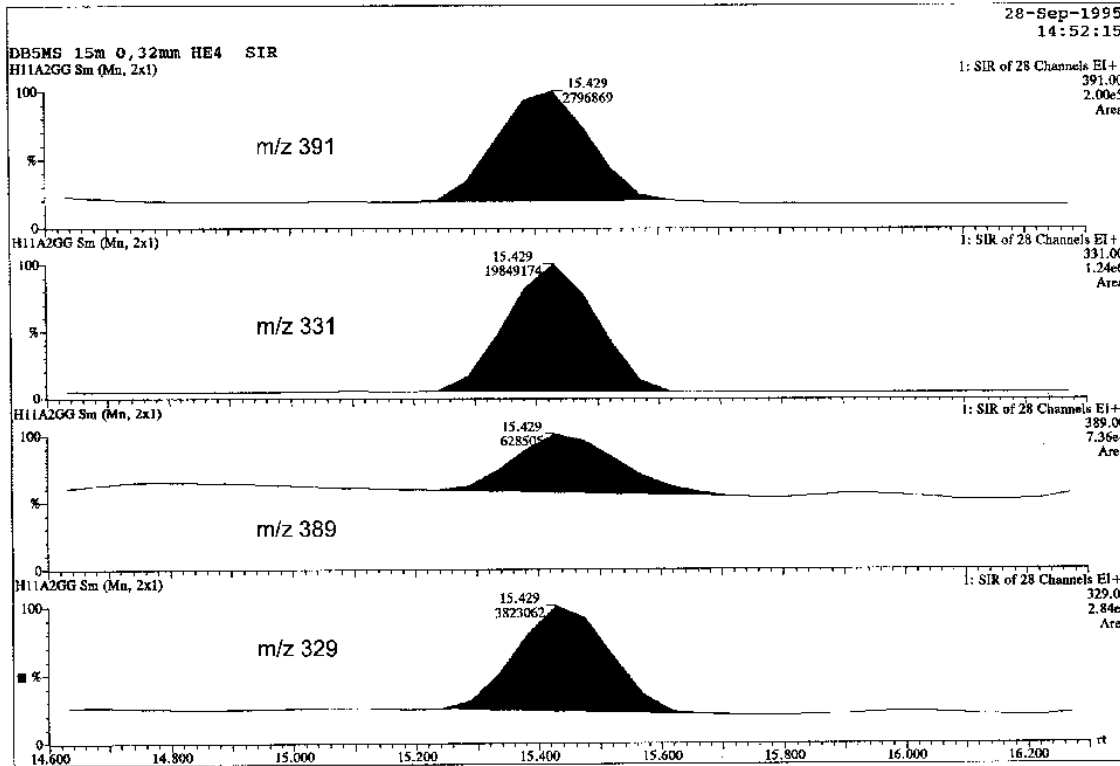
Standardabweichungen von 0,76 bzw. 6,9 % für diese synthetischen Gemische weisen auf die gute Reproduzierbarkeit der aufgenommenen MS-Daten hin. Bei der Analyse von Extrakten erhöhte sich die Standardabweichung auf bis zu 21,3% (s. Anhang).

3.2.2 Ergebnisse

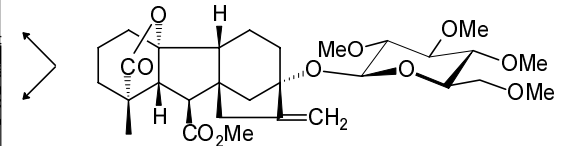
Aus dem Freilandanbau der Gerstensorte cv. Himalaya (Ernte 1993 und 1994) und cv. Salome (Ernte 1995 und 1996) wurden die Karyopsen zu den in Tab.4 bis 7, Kap.2.6.2 aufgeführten Terminen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend entsprechend Abb.8 aufgearbeitet. Zur Vorbereitung auf die Quantifizierung des endogenen GA₂₀-13-O-Glc, GA₈-2-O-Glc, GA₂₀ und GA₈ in der GC-MS durch Isotopenverdünnung (Kap.2.4.1) wurden den wässrigen Phasen nach der *n*-Hexan-Extraktion die [17-D₂]-markierten Verbindungen zugesetzt. Die zugesetzten Standardlösungen und die entsprechenden Mengen sind in Tab.8, Kap.2.6.2 aufgeführt.

Nach der Identifizierung der endogenen Verbindungen, zusammen mit den internen Standards in der GC-MS (FS-Massenspektrums einschließlich des R¹-Wertes), wurden anschließend im SIM-Mode nur ausgewählte Fragmentenpaare der endogenen Verbindung und des internen Standards aufgenommen. Die für die Quantifizierung des endogenen und des [17-D₂]-markierten GA₂₀-13-O-Glc, GA₈-2-O-Glc, GA₂₀ und GA₈ ausgewählten Ionen im SIM-Mode sind in Kap.2.4.4. zusammengefasst. Die Ionenchromatogramme wurden anschließend integriert. Abb.15 zeigt ein Beispiel für ein integriertes Ionencluster vom endogenen GA₂₀-13-O-Glc und dem als internen Standard eingesetzten [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (jeweils permethyliert). Ein weiteres Beispiel für ein integriertes Ionencluster vom endogenen GA₈-2-O-Glc und dem als internen Standard eingesetzten [17-D₂]GA₈-2-O-Glc (jeweils permethyliert) befindet sich im Anhang (Abb.4). Das Verhältnis der durch Integration gewonnenen Peakflächen äquivalenter Ionen der endogenen Verbindung und des internen Standards, z.B. 329/331 *m/z* oder 389/390 *m/z* für das endogene GA₂₀-13-O-Glc und das [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (s. Abb.15) ergab über die entsprechende Kalibrierungskurve (s. Abb.14) den Gehalt an endogener Verbindung. In gleicher Weise wurden GA₂₀, GA₈ und GA₈-2-O-Glc quantifiziert.

Die mittels GC-SIM und den entsprechenden Kalibrierungskurven (Abb.1 bis 3 im Anhang) gewonnenen endogenen Gehalte an GA₂₀-13-O-Glc, GA₈-2-O-Glc, GA₂₀ und GA₈ während des Reifeprozesses sind für die Gerstensorte cv. Himalaya (Ernte 1993/ 1994) in Tab.16 und und für cv. Salome (Ernte 1995/ 1996) in Tab.17 zusammengefasst.



interner Standard



endogene Verbindung

Abb.15: Integrierter Ionencluster im GC-MS-Ionenchromatogramm zur Quantifizierung des endogenen GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert) in reifenden Gerstenkaryopsen von cv. Himalaya (1994, frühe Wachsreife), interner Standard: [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert)

Tab.16: Endogene Mengen an GA₂₀, GA₂₀-13-O-Glc, GA₈ und GA₈-2-O-Glc (ng/g FG) der Sorte cv. Himalaya (1993/1994) im Verlauf der Reife: A-Milchreife, B-frühe Wachsreife, C-späte Wachsreife, D-kurz vor der Vollreife, E-Vollreife und F-Totreife

	A		B		C		D		E		F	
	1993	1994	1993	1994	1993	1994	1993	1994	1993	1994	1993	1994
GA ₂₀	13,6	26,0	11,8	2,2	11,3	2,8	10,4	4,0	-	0,2	0,1	0,1
GA ₂₀ -13-O-Glc	0,3	3,2	0,2	1,8	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,8	0,3	0,4
GA ₈	75,6	23,4	126,0	35,4	126,0	164,0	17,8	77,6	23,8	3,2	8,5	7,0
GA ₈ -2-O-Glc	-	15,2	-	94,6	-	74,4	-	197,6	-	102,0	-	116,0

Tab.17: Endogene Mengen an GA₂₀, GA₂₀-13-O-Glc, GA₈ und GA₈-2-O-Glc (ng/g FG) der Sorte cv. Salome (1995/1996) im Verlauf der Reife: A-Milchreife, B-frühe Wachsreife, C-späte Wachsreife, D-kurz vor der Vollreife, E-Vollreife und F-Totreife

	A		B		C		D		E		F	
	1995	1996	1995	1996	1995	1996	1995	1996	1995	1996	1995	1996
GA ₂₀	2,7	4,0	7,0	3,8	8,2	14,2	0,7	2,1	2,2	0,6	1,1	1,1
GA ₂₀ -13-O-Glc	-	2,2	0,5	2,4	5,0	3,6	-	1,7	1,0	1,1	1,4	1,2
GA ₈	78,0	45,0	50,5	41,0	166,5	144,0	36,0	57,5	12,5	32,0	24,0	10,0
GA ₈ -2-O-Glc	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	55,0	27,5	40,0	63,6

Die für den jeweiligen Erntetermin angegebenen Daten stellen Einzelwerte dar, da sich wegen des hohen Arbeitsaufwandes die Bearbeitung von Parallelproben ausschloß. Die deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Absolutmengen (und zeitlicher Verschiebungen), die zwischen den Serien der einzelnen Erntejahre bestehen, sind eine für den Freilandanbau nicht unerwartete Erscheinung. Jedoch sind die zeitlichen Poolgrößenveränderungen ähnlich. Für die nachfolgende Interpretation werden die Ergebnisse von cv. Himalaya (Ernte 1994) und cv. Salome (Ernte 1996) zugrundegelegt. Sie sind in Abb.16 (cv. Himalaya) und Abb.17 (cv. Salome) nochmals graphisch dargestellt.

Wie aus Abb.16 ersichtlich, konnte bereits im Milchreifestadium der Karyopsen von cv. Himalaya das Maximum für das GA_{20} beobachtet werden. Im Verlauf der Reifung, einschließlich der totreifen Karyopsen, zeigt der Pool die physiologisch erwartete Abnahme (Samenruhe).

Das Maximum an GA_8 erscheint zwei Wochen später (späte Wachsreife). Auch hier nimmt der Gehalt anschließend mit fortdauerndem Reifeprozess ab. Jedoch sind die Mengen an GA_8 im Vergleich zum GA_{20} zehnfach höher (Tab.16, Abb.16).

Für das GA_{20} -13-O-Glc wurden zu Beginn der Reife die höchsten Gehalte bestimmt. Anschließend ist diese Poolgröße vergleichsweise konstant.

Im Gegensatz dazu sind die Mengen an GA_8 -2-O-Glc während der gesamten Reife hoch, wobei ein Maximum kurz vor der Vollreife durchlaufen wird (Abb.16). Vergleicht man das Verhältnis GA_{20} zu GA_{20} -13-O-Glc, so erkennt man die Umkehr des Verhältnisses zugunsten des GA_{20} -13-O-Glc am Ende des Reifeprozesses. So wurden z.B. während der Milchreife der Ernte 1994 26 ng/g FG an GA_{20} und 3,2 ng/g FG an GA_{20} -13-O-Glc und dagegen in den totreifen Karyopsen 0,1 ng/g FG an GA_{20} und 0,4 ng/g FG an GA_{20} -13-O-Glc bestimmt (s. Tab.16 u. Abb.18). Dasselbe trifft auf das Verhältnis GA_8 zu GA_8 -2-O-Glc zu (Tab.16).

Die in den Karyopsen von cv. Salome gefundenen Mengen an GA_{20} und GA_{20} -13-O-Glc (s.Tab.17) waren im allgemeinen gegenüber denen in den Karyopsen von cv. Himalaya bestimmten Werten erhöht.

Bemerkenswerterweise tritt das Maximum an GA_{20} bei cv. Salome zwei Wochen später (späte Wachsreife) als bei cv. Himalaya (vgl. Abb.16 u. 17) auf.

Auch bei cv. Salome sind nur mäßige Veränderungen im Pool des GA_{20} -13-O-Glc zu beobachten (Tab.17). Das Maximum an GA_{20} -13-O-Glc tritt übereinstimmend mit dem Maximum an GA_{20} in cv. Salome zur späten Wachsreife ein (Abb.17).

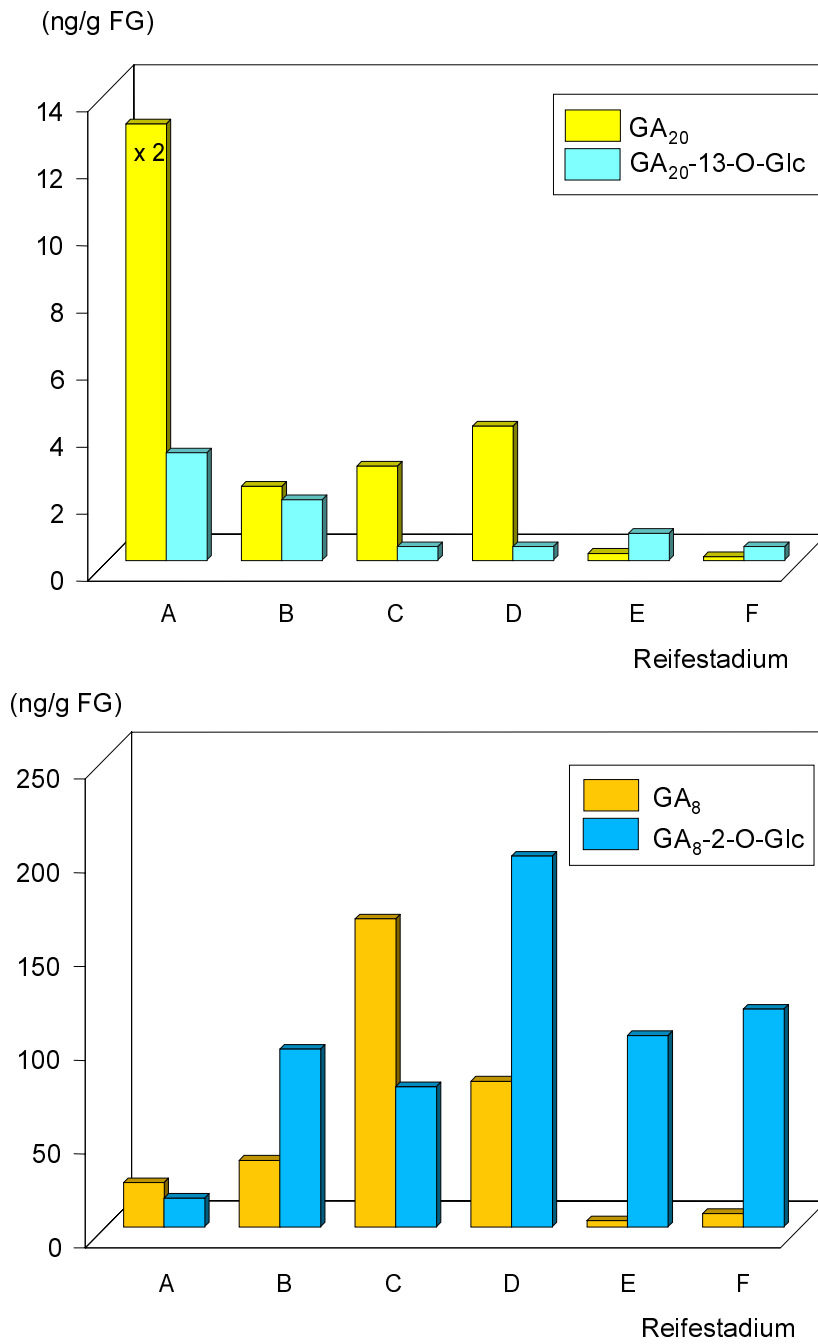


Abb.16: Mengen an GA₂₀, GA₈, GA₂₀-13-O-Glc und GA₈-2-O-Glc während der Reife der Karyopsen der Sorte cv. Himalaya (1994)

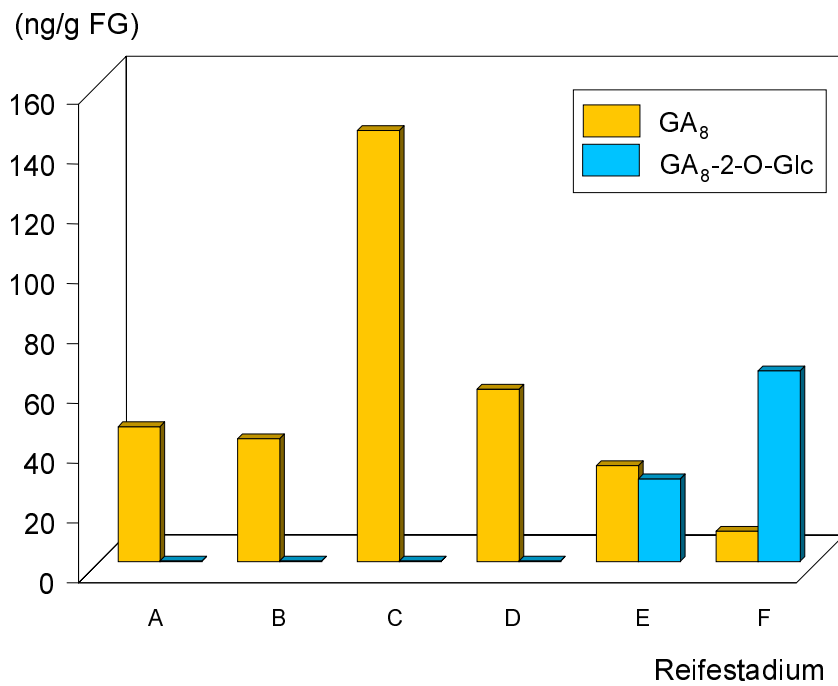
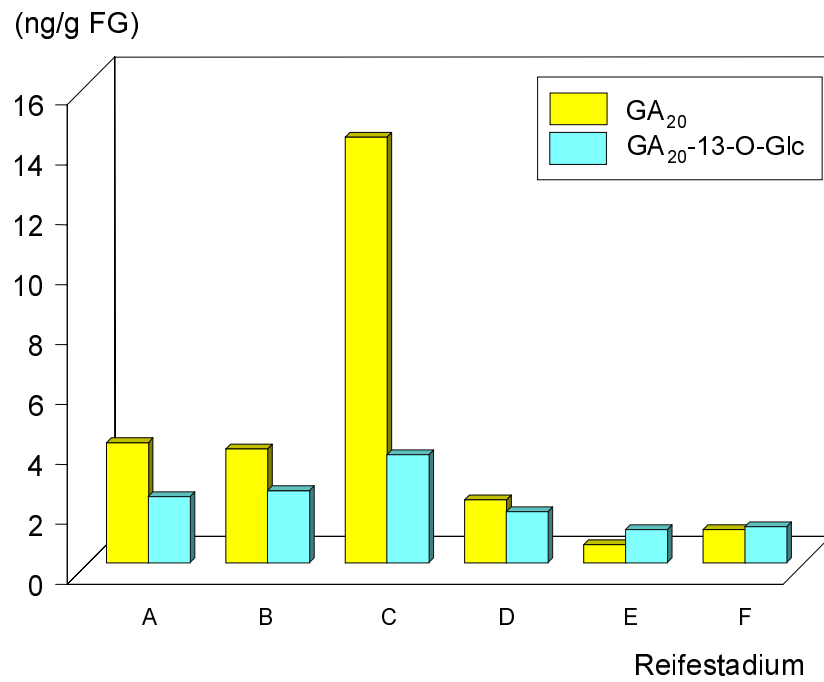


Abb.17: Mengen an GA₂₀, GA₈, GA₂₀-13-O-Glc und GA₈-2-O-Glc während der Reife der Karyopsen der Sorte cv. Salome (1996)

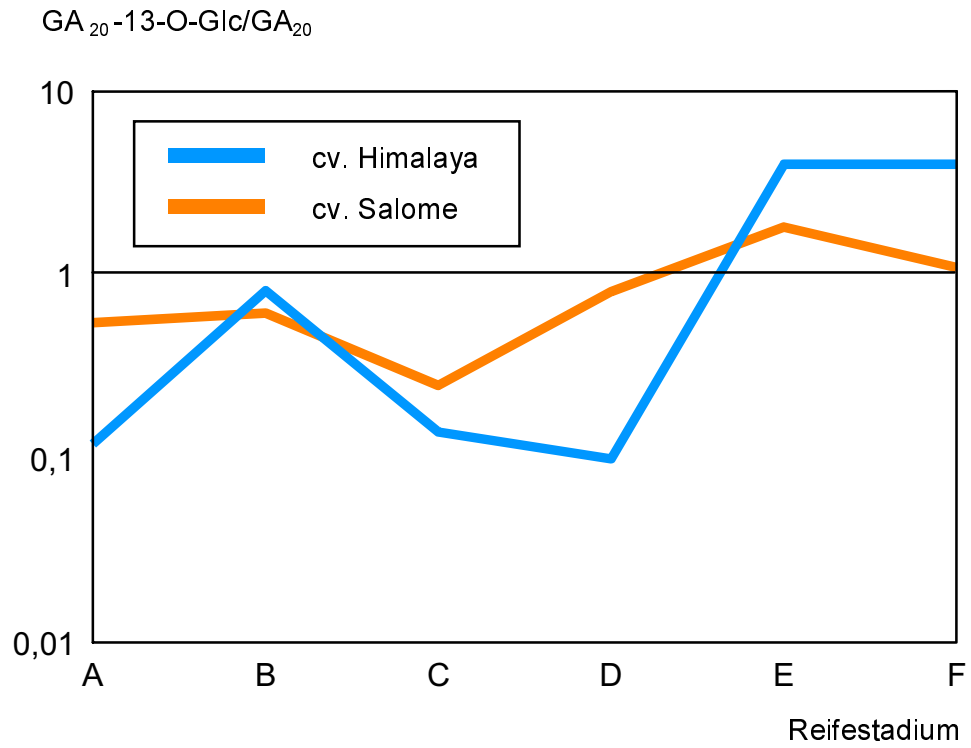


Abb.18: Verhältnis $GA_{20-13-O-Glc}/GA_{20}$ während der Reifung der Karyopsen von cv. Himalaya (1994) und cv. Salome (1996)

In cv. Salome sind die Mengen an GA_8 wieder um eine Größenordnung höher als die an GA_{20} (Abb.17). Dabei korreliert der zeitliche Verlauf der Poolgröße vom GA_8 in cv. Salome mit dem in cv. Himalaya (Abb.16 u. 17).

Auffällig jedoch war, daß in cv. Salome in den ersten 4 Ernten kein GA_8 -2-O-Glc gefunden werden konnte (Tab.17). Es erscheint nur in den beiden letzten Ernten (Vollreife und Totreife).

Ebenso wie in cv. Himalaya beobachtet man im Verlauf der Reife die Umkehr des Verhältnisses GA zu GA -O-Glc zugunsten des Glucosides. So wurden z.B. während der späten Wachsreife der Ernte 1996 14,2 ng/g FG an GA_{20} und 3,0 ng/g FG an GA_{20} -13-O-Glc und anschließend in den totreifen Karyopsen 1,1 ng/g FG an GA_{20} und 1,2 ng/g FG an GA_{20} -13-O-Glc gemessen (Tab.17 u. Abb.18). Ähnliches gilt auch wiederum für das Verhältnis GA_8 zu GA_8 -2-O-Glc (Tab.17).

3.2.3 Diskussion

Obwohl die in den verschiedenen Jahren gemessenen Absolutmengen der analysierten Pools umweltbedingt unterschiedlich sind, lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen der gemessenen Poolgrößen von GA_{20} -13-O-Glc, GA_8 -2-O-Glc, GA_{20} und GA_8 einige Schlußfolgerungen ziehen und diskutieren.

Insgesamt fallen die für cv. Salome höheren Mengen an GA_{20} und GA_{20} -13-O-Glc in reifen Karyopsen auf. Bestätigt wird dieser Unterschied auch durch die Metabolismusversuche mit $[17-D_2]GA_{20}$ (vgl. Kap.3.3.2), bei denen in cv. Salome höhere Einbau-raten beobachtet wurden.

Nicht im Einklang damit stehen die für die Kompartimentierung von GA_{20} und GA_{20} -13-O-Glc (s. Kap.3.4.2) ermittelten Werte. Jedoch stammt hier das Samenmaterial aus unterschiedlichen Ernten.

Der Verlauf der Poolgröße von GA_{20} -13-O-Glc zeigte für beide Sorten vergleichsweise hohe Mengen während der Milchreife, die zum Ende der Karyopsenentwicklung abnehmen. Daraus kann abgeleitet werden, daß das GA_{20} -13-O-Glc nicht ständig als "entaktiviertes GA_{20} " akkumuliert wird, sondern einem weiteren Metabolismus unterliegt. Hierbei kann nicht unterschieden werden, ob dieser Metabolismus über eine vorherige Hydrolyse der freien Gibberelline oder über ein intaktes Glucosid erfolgt.

Bemerkenswert sind auch die für das GA_8 und GA_8 -2-O-Glc gemessenen hohen Absolutwerte, die allerdings nicht über Kalibrierungskurven korrigiert wurden, sondern aus dem indirekten Vergleich mit den zugegebenen Standardmengen bestimmt wurden.

Die endogen gefundenen Mengen von GA_8 und GA_8 -2-O-Glc liegen um bis zu zwei Größenordnungen höher als die von GA_{20} und GA_{20} -13-O-Glc. Da GA_8 und GA_8 -2-O-Glc als metabolische Produkte von GA_{20} über das GA_1 (s. Abb.13) angesehen werden müssen, kann daraus eine hohe Metabolisierungsrate während der Samenentwicklung abgeleitet werden, obwohl der Pool des aktiven GA_1 als Intermediat nicht meßbar war.

Bei einem Vergleich der Sorten cv. Himalaya und cv. Salome hinsichtlich ihres GA_8 -2-O-Glc-Pools fällt auf, daß bei cv. Salome dieses Glucosid erst in den späteren Reifestadien auftritt, obwohl bezüglich der GA_8 -Gehalte kaum Unterschiede existieren.

Interpretiert werden könnte das mit der unterschiedlichen Beteiligung des Katabolismus des GA_8 durch Oxidation zum 2-Ketoderivat (s. Abb.19).

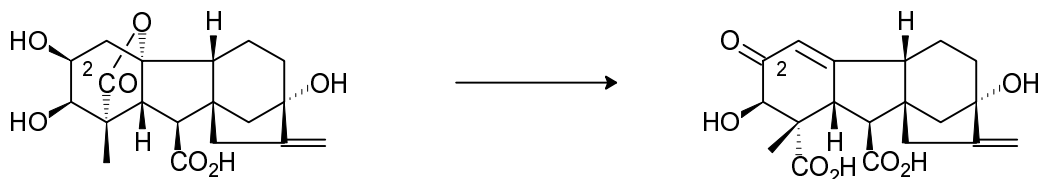


Abb.19: Katabolismus des GA_8

Bezüglich der bereits mehrfach erwähnten hypothetischen Depotfunktion von GA-O-glucosiden und deren möglicher reversibler Reaktivierung während der Samenkeimung sollte auf die Umkehr des Verhältnisses von freien GA_{20} und GA_{20} -13-O-Glc hingewiesen werden (Abb.18). Wenn die in der Karyopse als Restmengen verbliebenen freien Gibberelline für einen Start der Enzyminduktion vor der *de novo* Biosynthese diskutiert werden [51], sollten die gefundenen Mengen an GA_{20} -13-O-Glc nicht vernachlässigt werden. Das gilt um so mehr, wenn geeignete Kompartimentierung dieser Metabolite in der Karyopse und die Rekonversion des GA_{20} -13-O-Glc *in vivo* nachgewiesen werden könnte.

3.3 Metabolische Markierung von GA₂₀-13-O-Glc und Versuche zu seiner Rekonversion während der Keimung der Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome

3.3.1 Voraussetzungen

Nach der Identifizierung und Quantifizierung des GA₂₀-13-O-Glc in reifenden und reifen Gerstenkaryopsen von cv. Himalaya und cv. Salome ist die angenommene Rekonversion dieses Konjugates während der Keimungsphase von besonderem Interesse. Zwar kann von der sich während der Samenentwicklung verändernden Poolgröße des GA₂₀-13-O-Glc auf eine Hydrolyse im Sinne eines verschiebaren Gleichgewichtes geschlossen, aber ein direkter Metabolismus des GA₂₀-13-O-Glc kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Für einen Beweis dieser bislang hypothetischen Rekonversion sind prinzipiell zwei methodische Ansätze denkbar:

1. Applikation des entsprechend markierten Konjugates und anschließender massenspektrometrischer Nachweis der freigesetzten Gibberelline. Einwände gegen diese Methode bestehen in einer eventuellen Überdosierung und der Unsicherheit, ob das exogen applizierte Konjugat relevante Kompartimente erreicht. Letzterer Einwand ist besonders bei reifen Karyopsen gravierend.
2. Metabolische Markierung des Konjugatpools durch Applikation des markierten Aglucons. Hierbei sollte das gebildete Konjugat in den relevanten Pool gelangen und die erwartete Rekonversion des endogenen Glucosides anzeigen. Diese Methode eignet sich besonders für das untersuchte System reifender/keimender Karyopsen. Der Nachteil der Methode besteht darin, daß nicht nur der Konjugatpool markiert wird, sondern markiertes Aglucon und andere Metabolite zu erwarten sind. Dadurch ist der massenspektrometrische Nachweis der Rekonversion nur über exakte Quantifizierung aller beteiligten Metabolite möglich.

Das Prinzip der metabolischen Markierung wurde bereits mit radioaktiv markiertem GA₂₀ und GA₄ bei *Zea mays* angewandt [83]. Die gebildeten Konjugate wurden hierbei jedoch nicht isoliert und identifiziert, so daß diese Ergebnisse nur als vorläufig angesehen werden können.

Die Voraussetzungen für eine sichere Quantifizierung der bei der Rekonversion in erster Linie zu berücksichtigenden Pools von GA₂₀, GA₁, dem unmittelbaren Metabolit des GA₂₀, und von GA₂₀-13-O-Glc, besteht in dem Einsatz von entsprechend markierten internen Standards, die vom gefütterten [17-D₂]GA₂₀ verschieden sein müssen. Hierfür wurden das [3-D,17-D₂]GA₂₀, [1-D,2-D,17-D₂]GA₁ und [3-D,17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc verwendet, auf deren Grundlage eine Quantifizierung der [17-D₂]-markierten Metabolite, und der endogenen Gibberelline und GA-O-glucoside mittels Massenspektrometrie möglich wird.

Von besonderer Bedeutung sollte hierbei die Zunahme an freien Gibberellinen während der ersten 24 Stunden bei gleichzeitiger Abnahme des GA₂₀-13-O-Glc sein. Da in dieser Keimungsphase noch kein Beitrag von Gibberellinen aus der *de novo* Biosynthese zu erwarten ist [50, 51], sollte der Nachweis der Freisetzung von GA₂₀ aus dem Glucosid von physiologischer Bedeutung für die Enzyminduktion sein.

3.3.2 Ergebnisse

Für den beabsichtigten Rekonversionsversuch von GA₂₀-13-O-Glc wurden die Karyopsen der milchreifen Ähren von cv. Himalaya und cv. Salome mit [17-D₂]GA₂₀ gefüttert. Nach der Ernte der reifen Karyopsen (Kap.2.6.3.) wurde ein Teil der Karyopsen entsprechend Schema in Abb.8 extrahiert, der Extrakt gereinigt, methyliert bzw. permethyliert und die daraus metabolisch gebildeten Verbindungen in der GC-MS analysiert. Auf der Grundlage von FS-Massenspektren und R¹-Werten konnten folgende [17-D₂]-markierte Verbindungen nachgewiesen werden: [17-D₂]GA₂₀, [17-D₂]GA₁, [17-D₂]GA₈, [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc und [17-D₂]GA₈-2-O-Glc (Abb.20).

Neben diesen [17-D₂]-markierten Verbindungen konnten die entsprechend unmarkierten endogenen Verbindungen identifiziert werden.

Die mit [17-D₂]GA₂₀ gefütterten Gerstenkaryopsen von cv. Himalaya und cv. Salome wurden unter Keimbedingungen inkubiert. Jeweils nach 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Proben geerntet, und nach Schema Abb.8 aufgearbeitet. Die Extrakte wurden gereinigt und die Proben anschließend für die GC-MS derivatisiert.

Speziell für die sichere Quantifizierung von GA₁ wurden neben den Permethylderivaten auch die trimethylsilylierten Proben der [17-D₂]-markierten Gibberelline und die der entsprechend endogenen Gibberelline in der GC-MS analysiert. Dafür wurden die Proben nach der Methylierung halbiert. Anhand des zugesetzten [3-D,17-D₂]GA₂₀, [3-D,17-D₂]

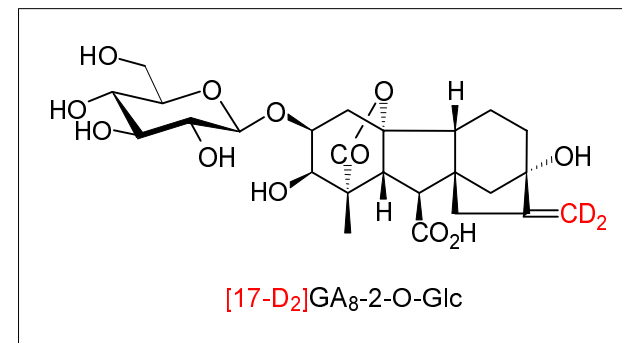
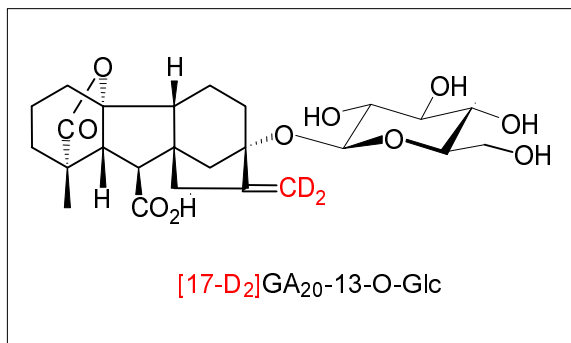
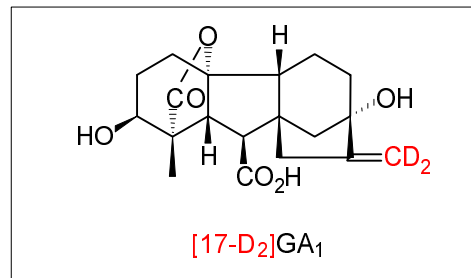
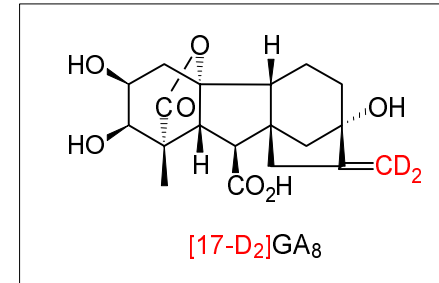
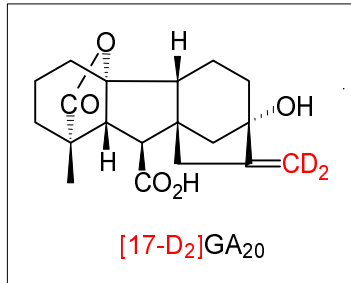


Abb.20: Aus [17-D₂]GA₂₀ metabolisch gebildete [17-D₂]-markierte Gibberelline und GA-O-glucoside

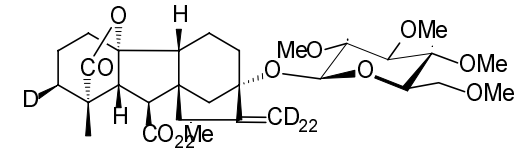
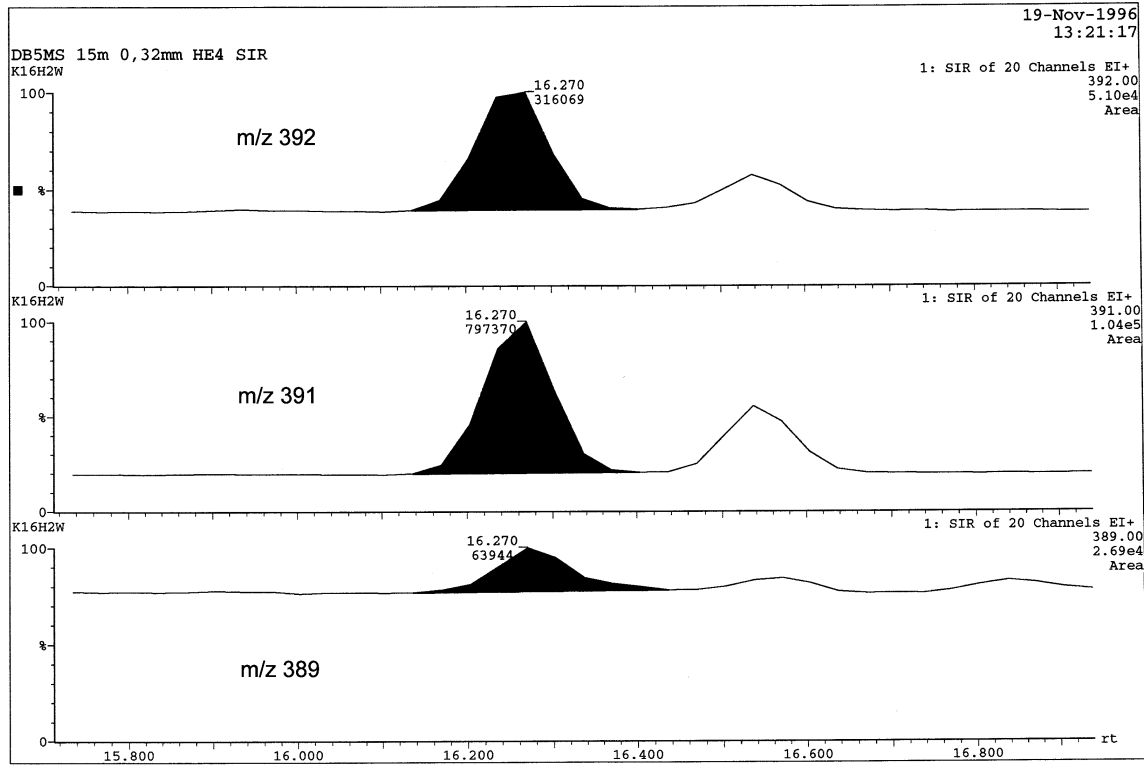
GA₂₀-13-O-Glc und [1-D,2-D,17-D₂]GA₁ als interne Standards zu der wässrigen Phase nach der *n*-Hexan-Extraktion konnten die Mengen an [17-D₂]GA₂₀, [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc, [17-D₂]GA₁ und die an den entsprechend endogenen Verbindungen während des Keimungsprozesses für cv. Himalaya (Tab.18) und cv. Salome (Tab.19) bestimmt werden.

Abb.21 zeigt ein integriertes Ionencluster für die Quantifizierung des endogenen GA₂₀-13-O-Glc und des metabolisch gebildeten [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc mittels des [3-D,17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc als internen Standard (Verbindungen jeweils permethyliert). Dabei konnten die Mengen an [17-D₂]GA₂₀ und [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc durch Kalibrierungskurven (Abb. 5 u. 6 im Anhang) korrigiert werden.

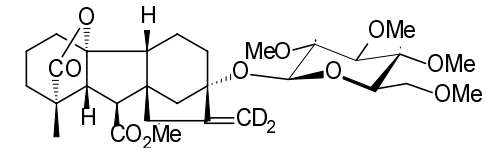
Beim [17-D₂]GA₂₀ und beim GA₂₀ zeigten die mengenmäßigen Veränderungen, die mittels der permethylierten und der trimethylsilylierten Verbindungen bestimmt wurden, eine gute Übereinstimmung. Jedoch wurden für die Auswertung ausschließlich die permethylierten Verbindungen genutzt, da besonders für das [17-D₂]GA₂₀ die Mengen durch eine Kalibrierungskurve (Abb.5 im Anhang) korrigiert werden konnten. Für die Auswertung der Mengen an [17-D₂]GA₁ und an endogenen GA₁ in der GC-SIM wurden die trimethylsilylierten Proben herangezogen, die jedoch nicht durch Kalibrierungskurven korrigiert wurden.

Die integrierten Ionencluster für die permethylierten und trimethylsilylierten Gibberelline sind im Anhang (Abb.7 bis 9) dargestellt.

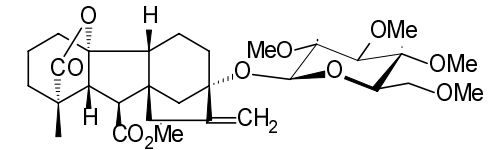
In Tab.20 sind die gaschromatographischen (R¹-Wert) und die massenspektroskopischen Daten (Fragmentationen (*m/z*) und deren Intensitäten (%)) für die während der Keimung endogen nachgewiesenen trimethylsilylierten Gibberelline im Vergleich zu authentischen Standards zusammengefaßt.



interner Standard



metabolisch gebildet



endogene Verbindung

Abb.21: Integrierter Ionencluster im GC-MS-Ionenchromatogramm für die Quantifizierung des endogenen GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert) und des metabolisch gebildeten [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert) nach sechs Stunden Inkubation von cv. Himalaya, interner Standard: [3-D,17-D₂] GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert)

Tab.20: Retentionsindices (R^I), charakteristische Ionen (m/z) und deren relative Intensitäten (%) des FS-Massenspektrums der trimethylsilylierten Gibberelline aus gekeimten Karyopsen der Sorte cv. Himalaya und cv. Salome im Vergleich zu trimethylsilylierten Standards

Verbindung:	RI	Intensitäten (%) der charakteristischen Ionen:	
		m/z 418	m/z 375
<hr/>			
GA ₂₀			
als Standard	2522	100	89
in cv. Himalaya	2520	100	81
in cv. Salome	2518	100	75
<hr/>			
GA ₁		m/z 506	m/z 448
als Standard	2671	100	25
in cv. Himalaya	2660	100	17
in cv. Salome	2661	100	21
<hr/>			

Für die somit gewonnenen Mengen an [17-D₂]-markiertem GA₂₀, GA₁ und GA₂₀-13-O-Glc und die Mengen der entsprechend endogenen Verbindungen ergaben sich während der Keimung beider Gerstensorten (Tab.18 u.19) folgende Aussagen:

Bereits sechs Stunden nach Beginn der Keimung beobachtet man für das [17-D₂]GA₂₀ und das endogene GA₂₀ ein deutliches Maximum in cv. Himalaya und cv. Salome (Abb. 22 u. 23). Danach nehmen beide Pools ab. Die Mengen sind dabei in cv. Salome höher als in cv. Himalaya.

Das [17-D₂]GA₁ und das endogene GA₁ zeigen ein Maximum 12 Stunden nach Beginn der Keimung, wobei in cv. Salome wiederum höhere Mengen nachgewiesen wurden (Abb. 22 u. 23).

In beiden Gerstensorten beobachtet man deutliche Unterschiede bei den mengenmäßigen Änderungen im Pool des [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc und des endogenen GA₂₀-13-O-Glc.

Tab.18: Mengen an [17-D₂]-markiertem und endogenem GA₂₀, GA₁ und GA₂₀-13-O-Glc (ng/Karyopse) in inkubierten Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya

Inkubationszeit (h)	[17-D ₂]GA ₂₀	GA ₂₀	[17-D ₂]GA ₁	GA ₁	[17-D ₂] GA ₂₀ -13-O-Glc	GA ₂₀ -13-O-Glc
0	5,29	1,61	1,08	0,6	2,81	0,11
6	9,73	3,58	0,65	1,15	1,75	0,11
12	4,7	2,28	1,19	4,01	-	0,07
24	2,83	0,98	0,43	2,6	1,12	-
48	2,6	2,22	0,38	2,3	1,02	0,037

Tab.19: Mengen an [17-D₂]-markiertem und endogenem GA₂₀, GA₁ und GA₂₀-13-O-Glc (ng/Karyopse) in inkubierten Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Salome

Inkubationszeit (h)	[17-D ₂]GA ₂₀	GA ₂₀	[17-D ₂]GA ₁	GA ₁	[17-D ₂]GA ₂₀ -13-O-Glc	GA ₂₀ -13-O-Glc
0	8,8	3,96	0,85	0,4	14,9	0,12
6	20,05	12,44	4,5	0,75	15,5	0,14
12	14,5	0,24	3,5	2,73	17,5	0,17
24	14,25	6,87	0,9	0,38	16,0	0,15
48	12,0	4,88	1,3	0,44	15,5	0,14

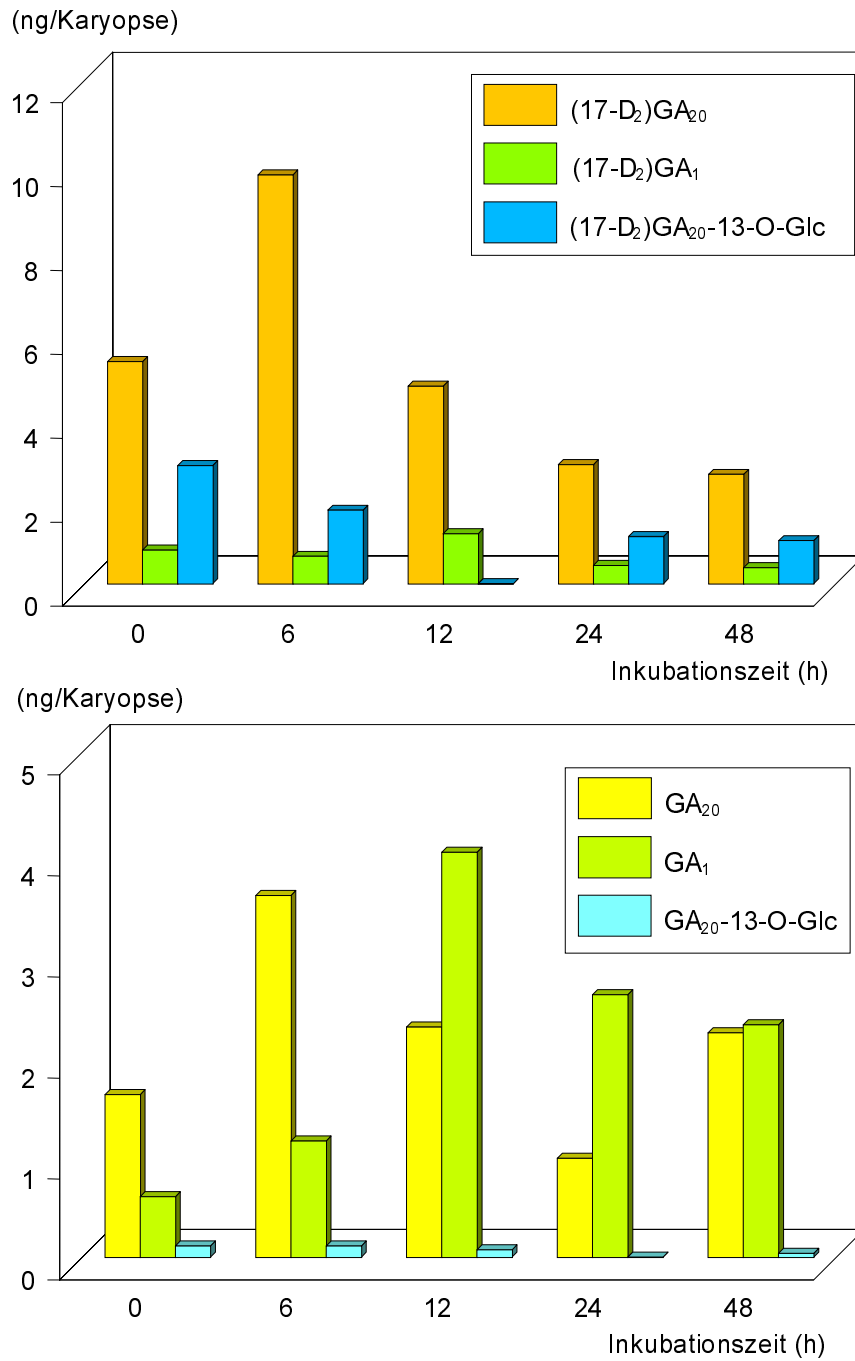


Abb.22: Mengen an (17-D₂)-markiertem und an endogenem GA₂₀, GA₁ und GA₂₀-13-O-Glc in den mit (17-D₂) gefütterten Karyopsen von cv. Himalaya während der Keimung

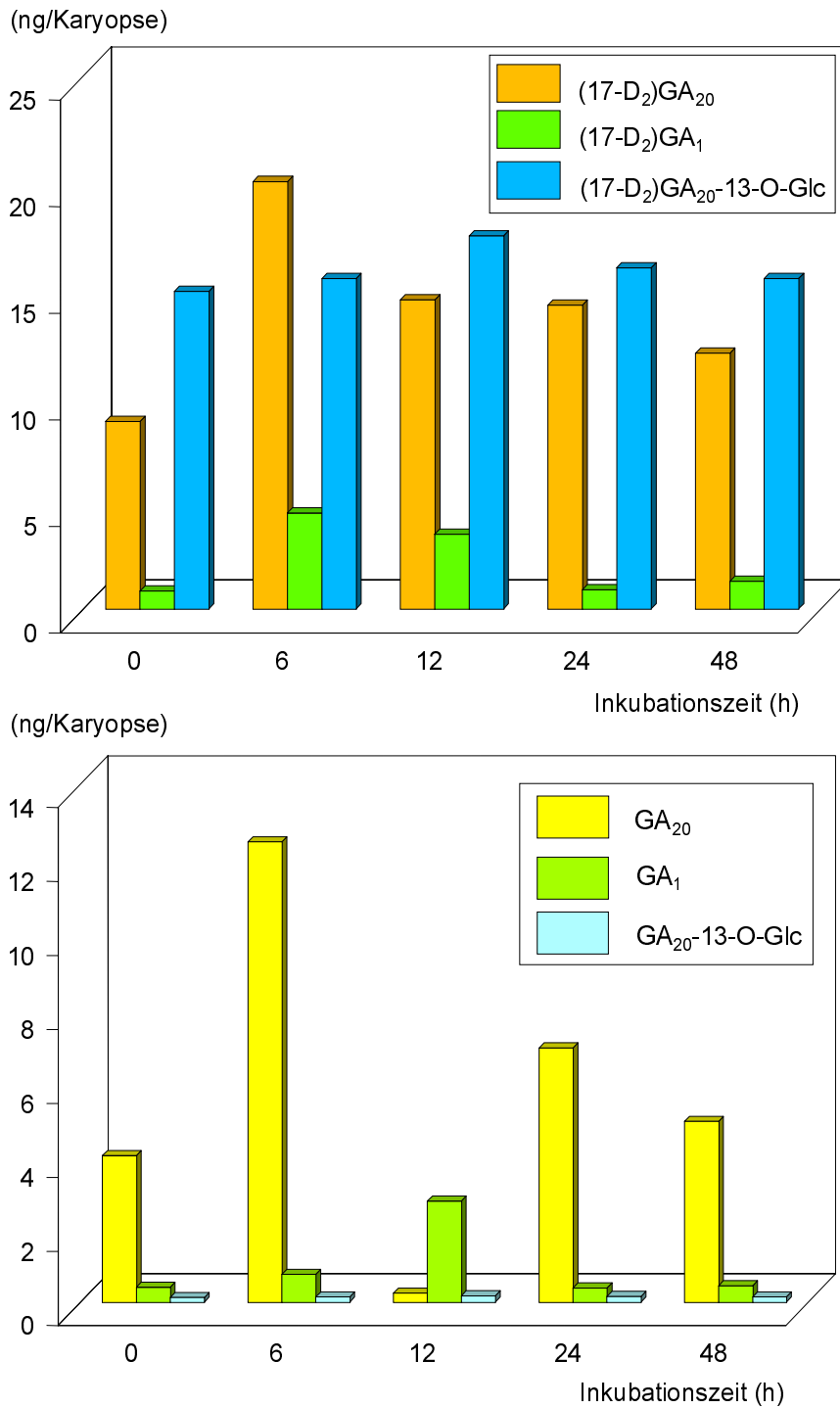


Abb.23: Mengen an (17-D₂)-markiertem und an endogenem GA₂₀, GA₁ und GA₂₀-13-O-Glc in den mit (17-D₂) gefütterten Karyopsen von cv. Salome während der Keimung

Diese nehmen in cv. Himalaya mit Beginn der Keimung ab (Abb.22). Dagegen beobachtet man in cv. Salome zunächst eine Zunahme und erst nach 24 Stunden die Abnahme dieser Pools, wobei die Änderungen im Glucosid-Pool nicht so eindeutig sind wie im Pool der freien Gibberelline (Abb.23).

Jedoch sollten die Veränderungen dieses Pools nochmals überprüft werden. Die nachgewiesenen hohen Mengen befanden sich wegen der zu geringen Standardmenge außerhalb des angestrebten Analysenbereiches und somit wurde nicht im linearen Bereich der Kalibrierung gearbeitet.

3.3.3 Diskussion

Mit der Fütterung von $[17-D_2]GA_{20}$ und dem massenspektrometrischen Nachweis der Markierung im $GA_{20-13-O-Glc}$, GA_1 , GA_8 und $GA_8-2-O-Glc$ konnte die metabolische Verknüpfung der in Kap.3.1.3 untersuchten Pools gezeigt werden und bestätigte das in Abb.13 gezeigte Schema.

Die bei der Keimung der gefütterten Karyopsen von cv. Himalaya auftretende Erhöhung von $[17-D_2]GA_{20}$ ist ein eindeutiger Beweis für die bereits nach sechs Stunden Inkubation stattfindende Freisetzung des GA aus konjugierter Form. Unterstützt wird dieser Befund durch die gleichzeitige Abnahme des $[17-D_2]GA_{20-13-O-Glc}$ -Pools.

Im Falle von cv. Salome ist der nach Fütterung von $[17-D_2]GA_{20}$ gefundene Pool von Metaboliten hinsichtlich der bestimmten Mengen insgesamt höher. Auch hier deutet die Erhöhung des $[17-D_2]GA_{20}$ -Pools sechs Stunden nach Inkubation auf die Rekonversion hin, jedoch konnte hier die Abnahme des $[17-D_2]GA_{20-13-O-Glc}$ -Pools nicht nachgewiesen werden.

Gründe dafür könnten in dem insgesamt höheren Gehalt an Glucosid, bedingt durch den Beitrag der Hüllspelzen dieser Sorte liegen. Zusätzlich könnten gleichzeitig vorliegende Glucosylester, die ebenfalls metabolisch gebildet und gleichermaßen hydrolysiert werden, aber in die vorliegenden Untersuchungen nicht einbezogen wurden, zunächst den Pool der freien Gibberellinen beeinflussen.

Als zusätzlicher Beweis für die physiologische Relevanz dieser Rekonversion müssen die in gleicher Richtung sich verändernden endogenen Pools angesehen werden.

Für das $[17-D_2]GA_1$ wurde ein Anstieg 12 Stunden nach Inkubation festgestellt. Obwohl hier die Absolutwerte nur über den internen Standard berechnet und nicht durch Kali-

brierungskurven korrigiert worden, so zeigt die Poolgröße von [17-D₂] GA₁ und GA₁ kongruentes Verhalten (Abb.22 u. 23).

Der Befund, daß bereits wenige Stunden nach Inkubation von Samenmaterial die Enzyme der GA-Biosynthese und der GA-Konjugate aktiv sind, steht im Einklang mit Ergebnissen von Lange et. al. 1997, welche die Aktivitätszunahme einer 2 β , 3 β -Hydroxylase innerhalb der ersten 24 Stunden im Endosperm von Kürbissamen nachweisen konnten [115].

Der aufgefundene frühe Aktivitätspeak von Gibberellinen 6-12 Stunden nach Inkubation könnte bei geeigneter Kompartimentierung der freigesetzten bzw. metabolisch gebildeten Gibberelline entscheidend für den Start der Enzyminduktion in keimenden Karyopsen sein.

3.4 Kompartimentierung von GA₂₀-13-O-Glc und GA₂₀ in reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome

3.4.1 Voraussetzungen

Bei Untersuchungen der in keimenden Reiskaryopsen auftretenden α -Amylase wurden Unterschiede in der Kompartimentierung der Isoenzyme mit variierender GA-Abhängigkeit im Embryo/Scutellum und der Aleuronschicht festgestellt [45, 116]. Ähnliche Unterschiede wurden auch für *Hordeum vulgare* [44] und *Triticum aestivum* [117] gefunden.

Das bedeutet, daß auch die Kompartimentierung der für eine Enzyminduktion verantwortlichen Gibberelline und damit auch ihrer Konjugate in der frühen Keimungsphase von Bedeutung sein könnte. Hierfür sollten Embryo, Scutellum und Endosperm hinsichtlich ihrer Gehalte an GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc getrennt untersucht werden.

Da sich jedoch bei reifen Gerstenkaryopsen das Scutellum vom Embryo bzw. vom Endosperm schwer präparieren läßt, wurden die Samen, wie in Abb.9 gezeigt in den Embryo und das Scutellum sowie geringe Endosperm-Anteile (im folgenden Embryo genannt) und das verbleibende Restendosperm mit anliegender Aleuronschicht (im folgenden Endosperm genannt) zerlegt. Von den Karyopsen der Sorte cv. Salome wurden vor der Trennung in beide Kompartimente die Spelzen entfernt. Mit den so getrennten Karyopsen-Fractionen von *Hordeum vulgare* L cv. Himalaya und cv. Salome wurden

wie in Kap.3.2 beschrieben unter Zusatz interner Standards die Bestimmung der jeweiligen Menge an GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc durchgeführt.

3.4.2 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Verteilung des GA₂₀-13-O-Glc und des GA₂₀ wurden die reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome in den Embryo und das Endosperm zerlegt (s. Abb.9). Danach wurde zerkleinert und extrahiert (s. Kap.2.6.4). Nach Zugabe von jeweils 5 ng/g FG an [17-D₂]-markiertem GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc als internem Standard erfolgte die weitere Reinigung (Kap.2.3), Methylierung bzw. Permethylierung (Kap.2.4.2) und GC-MS-Analyse (Kap.2.4.1) der Proben entsprechend Schema Abb.8. Die mittels GC-SIM und den entsprechenden Kalibrierungskurven (Abb.1,2 im Anhang) bestimmten endogenen Gehalte an GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc sind für den Embryo und das Endosperm beider Gerstensorten in Abb.25 zusammengefaßt. Die Identität des quantifizierten GA₂₀ und seines 13-O-Glucosides wurden durch das FS-Massenspektrum und den R¹-Wert bestätigt.

Wie aus Abb.25 hervorgeht, zeigen die Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome ein auffällig unterschiedliches Verteilungsmuster von GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc.

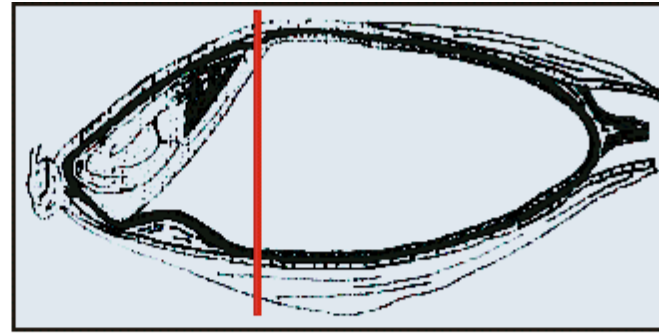
In cv. Himalaya befindet sich die Hauptmenge an GA₂₀-13-O-Glc (190 pg/Karyopse) im Embryo, während nur geringe Mengen an GA₂₀-13-O-Glc (30 pg/Karyopse) im Endosperm nachgewiesen wurden.

Im Vergleich zum Glucosid sind die Mengen an GA₂₀ (20 pg/Karyopse) eindeutig geringer und wurden nur im Endosperm nachgewiesen.


In cv. Salome konnte weder das GA₂₀-13-O-Glc noch das GA₂₀ im Embryo gefunden werden. Beide Verbindungen befinden sich bei dieser Sorte ausschließlich im Endosperm.

Dabei ist das Mengenverhältnis GA₂₀-13-O-Glc/GA₂₀ innerhalb der gesamten Karyopse in beiden Sorten ähnlich (150/40 pg/Karyopse in cv. Salome und 220/20 pg/Karyopse in cv. Himalaya).

Nach der Reifung verbleiben die Mengen an GA₂₀ demnach in beiden Sorten ausschließlich im Endosperm, während die Verteilung des GA₂₀-13-O-Glc in den Kompartimenten beider Sorten unterschiedlich ist.



	Embryo		Endosperm
<i>Hordeum vulgare</i> cv. "Himalaya"	190	20	30
<i>Hordeum vulgare</i> cv. "Salome"		40	150

 = GA₂₀-13-O-glucosid (pg / Karyopse)


 = GA₂₀ (pg / Karyopse)

Abb. 24: Kompartimentierung von GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc in reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome

3.4.3 Diskussion

Aus dem in Abb.24 gezeigten Verteilungsmuster geht eindeutig hervor, daß beide Sorten, cv. Himalaya und cv. Salome, die Restmengen an GA₂₀ im Endosperm konzentrieren. Bei der Speicherung des GA₂₀-13-O-Glc dagegen verhalten sich die Sorten unterschiedlich.

Weitere Untersuchungen müßten hier den physiologischen Zusammenhang mit entsprechenden Enzyminduktionen geben. Eine Rekonversion zum GA₂₀ während der Keimung konnte für beide Sorten festgestellt werden (s. Kap.3.3).

3.5 Bestimmung der α -Amylase in den Kompartimenten von cv. Himalaya und cv. Salome während der Keimung

Die für GA₂₀-13-O-Glc beobachteten Verteilungsmuster in reifen Karyopsen von cv. Himalaya und cv. Salome (Kap.3.4) sowie die nachgewiesene Rekonversion des Glucosides während der frühen Keimungsphase (Kap.3.3) legten nahe, orientierende Versuche zur α -Amylase-Bildung in den untersuchten Kompartimenten Endosperm und Embryo durchzuführen.

Die in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der geteilten Karyopsen nach Standardverfahren (Kap.2.7) gefundenen α -Amylase-Mengen sind in Tab.21 wiedergegeben. Es geht daraus hervor, daß übereinstimmend mit Literaturbefunden [116, 118], die Enzymaktivitäten im Endosperm generell später als im Embryo auftreten. Da dem Endosperm versuchsgemäß der Ort der GA-Biosynthese fehlt, sollte daß dort gebildete Enzym ausschließlich durch vorhandene GA-Depots, z.B. aus GA-O-glucosiden induziert werden.

Beim Vergleich der α -Amylase-Aktivitäten im Embryoteil fällt auf, daß cv. Himalaya im ungekeimten Stadium erhebliche Mengen an α -Amylase enthält, welche mit der Inkubation des Embryos noch weiter ansteigen (s. Tab.21). Ein Zusammenhang dieses Befundes mit der für cv. Himalaya gefundenen Akkumulation von GA₂₀-13-O-Glc in diesem Teil läßt sich vermuten, mit den vorliegenden Daten aber nicht beweisen.

Zur generellen Klärung hinsichtlich der vermuteten Beteiligung der Konjugate an der α -Amylase-Induktion im Endosperm, auch der in dieser Arbeit nicht berücksichtigten GA-

glucosylester, müssten detaillierte Analysen der auftretenden Isoenzyme und ihrer Abhängigkeit vom jeweiligen GA-Gehalt durchgeführt werden.

Tab.21: Menge an α -Amylase (μg) während der Inkubation (Stunden) des Embryo- und Endospermteils von cv. Himalaya und cv. Salome

	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
cv. Himalaya					
Embryo	144,0	192,0	198,0	300,0	300,0
Endosperm	0,2	0,2	0,2	0,3	162,0
cv. Salome					
Embryo	0,22	0,3	138,0	-	300,0
Endosperm	0,2	0,2	0,22	-	126,0

4 Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit werden erstmals Untersuchungen zur Biochemie und Physiologie von Gibberellinkonjugaten unter Einsatz massenspektroskopischer Methoden vorgelegt.

Grundlagen dafür waren die Erarbeitung einer effektiven Probengewinnung für den Nachweis der als Spurenstoffe vorkommenden Gibberellin-O-glucoside, ihre qualitative Analytik mittels GC-MS und besonders ihre quantitative Analytik unter Einsatz von deuterierten Markern als interne Standards in der GC-MS.

Gegenstand der Arbeiten war die hypothetische Rolle von Gibberellin-O-glucosiden als Depots im Zuge der Samenreifung und Keimung von Gerstenkaryopsen (*Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome), indem die Bildung, Speicherung und Rekonversion dieser Konjugate verfolgt wurde.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. In reifen Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome konnten in Bestätigung früherer Befunde von cv. Trumpf [53] GA_{20} -13-O-Glc und GA_8 -2-O-Glc als endogen vorkommende Gibberellinkonjugate durch GC-MS-Analyse identifiziert werden (Full scan, R^1). Insbesondere vom GA_{20} -13-O-Glc wird eine Rolle als Gibberellin-Depot erwartet, da es bei der Hydrolyse zu GA_{20} einen Präkursor für die biologisch aktiven Gibberelline GA_1 und GA_3 liefert.

2. Basierend auf GC-MS-Analysen mit internen Standards ($[17-D_2]GA_{20}$, $[17-D_2]GA_1$, $[17-D_2]GA_{20}$ -13-O-Glc und $[17-D_2]GA_8$ -2-O-Glc) wurde die Poolentwicklung von GA_{20} -13-O-Glc und GA_8 -2-O-Glc zusammen mit ihren Agluca während der Samenreifung von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome quantifiziert.

Für beide Sorten konnte gezeigt werden, daß GA_{20} -13-O-Glc in allen Phasen der Reifung mit einem Maximum, zum Milchreifestadium für cv. Himalaya und für cv. Salome zum Stadium der späten Wachsreife, vorhanden ist.

Trotz Abnahme der Absolutmengen von GA_{20} -13-O-Glc kehrt sich das Verhältnis GA_{20}/GA_{20} -13-O-Glc zugunsten des Glucosides im Reifestadium um. Diese Abnahme des GA_{20} -13-O-Glc während der Endphase der Reifung widerspricht der Theorie, daß Gibberelline zur Entaktivierung in Konjugate umgewandelt und so dem Metabolismus entzogen werden (Akkumulation). Es kann im Gegenteil daraus geschlossen werden, daß

Gibberellin-O-glucoside als ständige Begleiter der freien Gibberelline einem ständigen Metabolismus unterliegen.

Während für das GA₈ der Verlauf der Poolgröße in beiden Sorten gleich ist, zeigen sich beim GA₈-2-O-Glc deutliche Unterschiede, die auf verschiedene Katabolismuskvorgänge für das GA₈ in beiden Sorten hinweisen.

3. Durch Fütterung von [17-D₂]GA₂₀ wurde der Pool von GA₂₀-13-O-Glc in reifen Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome metabolisch markiert.

Während der frühen Keimungsphase dieser markierten Karyopsen konnte mittels GC-MS unter Einsatz interner Standards ([3-D,17-D₂] GA₂₀, [1-D,2-D,17-D₂]GA₁ und [3-D,17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc) bereits nach sechsstündiger Inkubation ein deutlicher Anstieg von [17-D₂]GA₂₀ nachgewiesen werden.

In der Sorte cv. Himalaya konnte parallel dazu eine Abnahme des [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc beobachtet werden.

Damit ist erstmalig der auf MS-Quantifizierung basierende Nachweis der Rekonversion eines GA-O-glucosides *in vivo* gelungen.

Durch das frühe Auftreten des Maximums für [17-D₂]GA₂₀ (6 Stunden nach Inkubation) und für sein metabolisches Folgeprodukt [17-D₂]GA₁ (12 Stunden nach Inkubation) kann auf das Vorliegen konstitutiver Enzyme in der Karyopse für diese metabolischen Schritte geschlossen werden.

Diese in der frühen Keimungsphase nachgewiesene Rekonversion von GA₂₀-13-O-Glc sollte für die Induktion hydrolytischer Enzyme (α -Amylase) vor einer *de novo* GA-Biosynthese von besonderer Bedeutung sein.

4. Reife Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome wurden in einen embryo-/scutellumhaltigen Teil sowie das Endosperm geteilt und mittels GC-MS und interner Standards hinsichtlich der Gehalte an GA₂₀ und GA₂₀-13-O-Glc analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß beide Sorten GA₂₀-Restmengen im Endosperm enthalten. GA₂₀-13-O-Glc dagegen wird von cv. Salome ausschließlich im Endosperm abgelagert, während bei cv. Himalaya die Hauptmenge an Glucosid im Embryo vorliegt. Diese Unterschiede in der Kompartimentierung des GA₂₀-13-O-Glc könnten bei der oben nachgewiesenen Rekonversion wichtig für die organspezifische Induktion der α -Amylase sein.

5. Orientierende Versuche zur Bestimmung der α -Amylase-Menge im embryo- und endospermhaltigen Teil der Karyopsen während der frühen Keimungsphase zeigten zeitlich unterschiedlich auftretende α -Amylaseaktivitäten in beiden Kompartimenten, welche durchaus durch das in den Kompartimenten nachgewiesene GA₂₀-13-O-Glc induziert werden könnten.

Für den Nachweis der Beteiligung dieser GA-Depots an der Induktion hydrolytischer Enzyme sollten jedoch noch detailliertere Untersuchungen hinsichtlich unterschiedlich auftretender Isoenzyme in den verschiedenen Kompartimenten, deren zeitlich unterschiedlicher Wirkungsdauer und deren unterschiedlicher GA-Abhängigkeit durchgeführt werden.

Mit den erzielten Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß sowohl während der Reifung als auch während der Keimung das GA₂₀-13-O-Glc in den Karyopsen von *Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya und cv. Salome ein ständiger und aktiver Bestandteil des Gibberellinstoffwechsel ist, welcher im kontinuierlichen Austausch mit den freien Gibberellinen steht.

Eindeutig belegt wird das durch die Umkehr des Verhältnisses GA₂₀/GA₂₀-13-O-Glc zugunsten des Glucosides am Ende des Reifeprozesses und durch die bewiesene Rekonversion des GA₂₀-13-O-Glc während der frühen Keimungsphase, die einhergeht mit der Zunahme der freien Gibberelline.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Kurosawa, E.
Trans. Natl. Hist. Soc. Formosa **16**, 213-227 (1926)
- [2] Yabuta, T., Sumiki, Y.
J. Agric. Chem. Soc. Jpn. **14**, 1526 (1938)
- [3] Curtis, P. J., Cross, B. E.
Chem. Ind. **1954**, 1066
- [4] Stodola, F. H., Roper, K. B., Fernel, D. I. Conway, H. F., Sohns, V. E.
Langford, C. E., Jackson, R.W.
Arch. Biochem. Biophys. **54**, 240-245 (1955)
- [5] Lona, F.
Nuovo G. Bot. Ital. **63**, 61-76 (1956)
- [6] Radley, M.
Nature (London) **178**, 1070-1071 (1956)
- [7] Phinney, B. O., West, C. A., Ritzel, M., Neely, P. M.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **43**, 398-404 (1957)
- [8] Brian, P. W.
Symp. Soc. Exp. Biol. **11**, 166-182 (1957)
- [9] MacMillan, J., Suter, P. J.
Naturwissenschaften **45**, 46 (1958)
- [10] Nakayama, M., Nishijima, T., Koshioka, M., Mander, L.
Identification of 12 β -hydroxy GA₂₄ and GA₄₀ (2 α -hydroxy GA₉) from
Raphanus sativus
Twenty-Fourth Annual Meeting of The Plant Growth Regulation
Society of America, Atlanta (1997)
- [11] MacMillan, J., Takahashi, N.
Nature (London) **217**, 170-171 (1968)
- [12] Rowe, J. W.
In: The common and systematic nomenclature of cyclic diterpenes,
3rd. Revision, U.S. Forest Product Laboratory Madison WI (1968)
- [13] MacMillan, J.
Natural Product Reports **14**, 221-243 (1997)

- [14] Hedden, P., Kamiya, Y.
Ann. Rev. Plant Physiol. **48**, 431-460 (1997)
- [15] Hasson, E. P., West, C. A.
Plant Physiol. **58**, 473-484 (1976)
- [16] Sponsel, V. M.
The Biosynthesis and Metabolism of Gibberellins in Higher Plants, pp. 6697
In: Davies, P. J. (ed.) *Plant Hormones*
Kluwer Academic Publishers, Netherland (1995)
- [17] Phinney, B. O.
Gibberellin Biosynthesis in the Fungus *Gibberella fujikuroi* and in higher
Plants, pp. 57
In: Mandava, N. B. (ed.) *Plant Growth Substances*
ACS Symposium Series, No 111, Washington (1979)
- [18] Lange, T., Graebe, J. E.
Planta **179**, 108-115 (1989)
- [19] Spray, C. Phinney, B. O., Gaskin, S. J., MacMillan, J.
Planta **160**, 464-468 (1984)
- [20] Smith, V. A., Albone, K. S., MacMillan, J.
Enzymatic 3 β -Hydroxylation of GA₂₀ and GA₅, pp. 62-71
In: Takahashi, N., Phinney, B. O., MacMillan, J. (eds.) *Gibberellins*
Springer-Verlag, New York (1991)
- [21] Sponsel, V. M.
Planta **159**, 454-468 (1983)
- [22] Sponsel, V. M.
Planta **168**, 119-129 (1987)
- [23] Ross, J. J., Reid, J. B., Swain, S. M., Hasan, O., Poole, A.T.
Genetic regulation of gibberellin deactivation in Pisum. Plant J. **7**,
15-23 (1995)
- [24] Mohr, H., Schopfer P.
Pflanzenphysiologie
Springer-Verlag, Berlin (1992)

- [25] Davies, P. J.
The Plant Hormone Concept: Concentration, Sensivity and Transport,
pp.13-38
In: Davies, P. J. (ed.) *Plant Hormones - Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*
Kluwer Academic Publishers, Netherland (1995)
- [26] Kende, H., Zeevaart, J. A. D.
Plant Cell **9**, 1197-1210 (1997)
- [27] Parthier, B.
Bot. Acta **104**, 446-454 (1991)
- [28] Adam, G., Petzold, U.
Naturwissenschaften **81**, 210-217 (1994)
- [29] Huttly, A., K., Phillips, A., L.
Physiologia Plantarum **95**, 310-317 (1995)
- [30] Ross, J. J.
Plant Growth Regul. **15**, 193-206 (1994)
- [31] Zwar, J. A., Chandler, P. M.
Planta **197**, 39-48 (1995)
- [32] Adam, G., Voigt, B., Lischewski, M.
Synthesis and Labelling of Gibberellins, pp. 51-102
In: Ebing, W. (ed.) *Chemistry of Plant Protection*
Springer-Verlag, Berlin (1991)
- [33] Hoad, G. V.
Gibberellin Bioassays and Structure Activity Relationships, pp. 57-94
In: Crozier, A. (ed.) *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins* Vol. 2
Praeger Publishers, New York (1983)
- [34] Sponsel, V. M.
The Biosynthesis and Metabolism of Gibberellins in Higher Plants,
pp. 66-97
In: Davies, P. J. (ed.) *Plant Hormones-Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*
Kluwer Academic Publishers, Netherland (1995)

- [35] Ingram, T. J., Reid, J. B., Murfet, J. C., Gaskin, P., Willis, C. W., MacMillan, J.
Planta **160**, 455-463 (1984)
- [36] Groot, S. P. C., Bruinsma, J., Karssen, C. M.
Physiol. Plant **71**, 184-190 (1987)
- [37] Ross, J. J., Murfet, I. C., Reid, J.B.
Physiol. Plant **102**, 603-608 (1993)
- [38] Paleg, L. G.
Plant Physiol. **35**, 293-299 (1960)
- [39] Yomo, H.
Hakko Kyokaishi 18, 600-602 (1960)
- [40] Varner, J. E., Johri, M. M.
Hormonal control of enzyme synthesis, p. 793
In: Wightman und Setterfield (eds.) *Biochem. and Physiol. of Plant Growth Substances*
Runge Press, Ottawa (1968)
- [41] Higgins, T. J. V., Jacobsen, J. V.
The influence of plant hormones on selected aspects of cellular metabolism, pp. 467-514
In: Letham, D. S., Goodwin, P. B. und Higgins, T. J. V. (eds.)
Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise Vol. 1
Elsevier, North Holland (1978)
- [42] Jones, R.L., Jacobsen, J.V.
Int. Rev. Cytol. **126**, 49-88 (1991)
- [43] Chrispeels, M.J., Varner, J. E.
Plant Physiol. **42**, 398-406 (1967)
- [44] Jacobsen, J. V., Higgins, T. J.
Plant Physiol. **70**, 1647-1653 (1982)
- [45] Akazawa, T., Yamaguchi, J., Hayashi, M.
Rice α -Amylase and Gibberellin Action - A Personal View, pp. 114-124
In: Takahashi, N., Phinney, B. O. und MacMillan, J. (eds.) *Gibberellins*
Springer-Verlag, Berlin (1991)

- [46] Huang, N., Sutliff, T. D., Rodriguez, R.L.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 7526-7530 (1992)
- [47] Jacobsen, J. V., Gubler, F., Chandler, P. M.
Gibberellin Action in Germinated Cereal Grains, pp. 246-271
In: Davies, P. J.(ed.) *Plant Hormones - Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*
Kluwer Academic Publishers, Netherland (1995)
- [48] Thomas, B. R., Rodriguez, R. L.
Plant Physiol. **106**, 1235-1239 (1994)
- [49] Okamoto, K., Kitano, H., Akazawa, T.
Plant Cell Physiol. **21**, 201-204 (1980)
- [50] Großelindemann, E., Graebe, J. Stöckl, D., Hedden, P.
Plant Physiol. **96**, 1099-1104 (1991)
- [51] Lenton, J. R., Appleford, N. E. J., Croker, S.J.
Plant Growth Regul. **15**, 261-270 (1994)
- [52] Trewavas, A. J.
Physiol. Plant **55**, 60-72 (1982)
- [53] Schneider, G., Schliemann, W. Schaller, B., Jensen, E.
Identification of native gibberellin-O-glucosides in *Zea mays* L. and
Hordeum vulgare L., pp. 566-570
In: Karssen, C. M., Van Loon, L. C., Vreugdenhil, D. (eds.)
Progress in Plant Growth Regulation
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992)
- [54] Sembdner, G., Weiland, J. Aurich, O., Schreiber, K.
Isolation, structure and metabolism of a gibberellin glucoside, pp. 70-86
In: *Plant Growth Regulators*
S.C.I. Monograph No. 31, London (1968)
- [55] Sembdner, G., Atzorn, R., Schneider, G.
Plant Molecular Biology **26**, 1459-1481 (1994)
- [56] Kleczkowski, K., Schell, J.
Critical Reviews in Plant Sciences **14**, 283-298 (1995)

- [57] Schneider, G.
Gibberellin conjugates, pp. 389-456
In: Crozier, A. (ed.) *The biochemistry and physiology of gibberellins* Vol.1
Praeger Publishers, New York (1983)
- [58] Yokota, T., Kobayashi, S., Yamane, H., Takahashi, N.
Agric. Biol. Chem. **42**, 1811-1812 (1978)
- [59] Schliemann, W., Schneider, G.
Plant Growth Regul. **8**, 85-90 (1989)
- [60] Sembdner, G., Schliemann, W., Schneider, G.
Biochemical and physiological aspects of gibberellin conjugation,
pp. 249-263
In: Takahashi, N., Phinney, B. O., MacMillan, J. (eds.) *Gibberellins*
Springer-Verlag, Berlin (1991)
- [61] Schliemann, W., Schaller, B., Jensen, E., Schneider, G.
Phytochemistry **35**, 35-38 (1994)
- [62] Yokota, T., Murofushi, N., Tamura, S.
Agric. Biol. Chem. **35**, 583-595 (1971)
- [63] Yokota, T., Takahashi, N., Murofushi, N., Tamura, S.
Tetrahedron Lett. **1969**, 2081-2084
- [64] Harada, H., Yokota, T.
Planta **92**, 100-104 (1970)
- [65] Yokota, T., Takahashi, N., Murofushi, N., Tamura, S.
Planta **87**, 180-184 (1969)
- [66] Schreiber, K., Weiland, J., Sembdner, G.
Tetrahedron Lett. **1967**, 4285-4288
- [67] Hiraga, K., Kawabe, S., Yokota, T., Murofushi, N., Takahashi, N.
Agric. Biol. Chem. **38**, 2521-2527 (1974)
- [68] Hiraga, K., Yokota, T. Murofushi, N. und Takahashi, N.
Agric. Biol. Chem. **38**, 2511-2520 (1974)
- [69] Schneider, G., Sembdner, G., Jensen, E., Bernhard, U., Wagenbreth, T.
Plant Growth Regul. **11**, 15-18 (1992)

8

8

8

- [70] Lenton, J. R., Appleford, N. E. J., Crokers, J.
Gibberellin-independent α -amylase production in germinating wheat
(*Triticum aestivum*) grain
In: *Frontiers of Gibberellin Research* Abstr. 19, Tokyo Riken (1993)
- [71] Schneider, G., Schliemann, W.
The occurrence of gibberellin-O-glucosides in mature seeds of *Gramineae*
and *Leguminosae*
XVth Intern. Bot. Congress Yokohama, Abstr. 4160 (1993)
- [72] Yokota, T., Murofushi, N., Takahashi, N.
Tetrahedron Lett. **1970**, 1489-1491
- [73] Yamane, H., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N.
Agric. Biol. Chem. **35**, 1144-1146 (1971)
- [74] Yamane, H., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N.
Agric. Biol. Chem. **38**, 649-655 (1974)
- [75] Schreiber, K., Weiland, J., Sembdner, G.
Tetrahedron Lett. **1967**, 4285-4288
- [76] Rivier, L., Gaskin, P., Albone, K., MacMillan, J.
Phytochemistry **20**, 687-692 (1981)
- [77] Schneider, G.
Gaschromatographie von Gibberellinen, S.127-132
In: Sembdner, G., Schneider, G., Schreiber, K. (Hrsg.)
Methoden zur Pflanzenhormonanalyse
Gustav Fischer Verlag Jena (1988)
- [78] Gaskin, P., MacMillan, J.
GC-MS of Gibberellins and Related Compounds: Methodology and a
Library of Spectra
Cantocks Enterprises, Bistol (1991)
- [79] Moritz, T., Schneider, G., Jensen, E.
Biol. Mass. Spectrom. **21**, 554-559 (1992)
- [80] Schneider, G., Schreiber, K., Jensen, E., Phinney, B.O.
Liebigs Ann. Chem. **1990**, 491-494
- [81] Schneider, G., Schliemann, W.
Plant Growth Regul. **15**, 247-260 (1994)

- [82] Sembdner, G., Groß, D., Liebisch, H. W., Schneider, G.
Biosynthesis and metabolism of plant hormones, pp. 218-444
In: MacMillan, J. (ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. 9
Springer-Verlag Berlin (1980)
- [83] Rood, S. B., Pharis, R. P., Koshioka, M.
Plant Physiol. **73**, 340-346 (1983)
- [84] Schneider, G., Jensen, E., Spray, C. R., Phinney, B.O.
Proc. Natl. Acad. Sci USA **89**, 8045-8048 (1992)
- [85] Knöfel, H. D., Swarzkopf, E., Müller, P., Sembdner, G.
Plant Growth Regul. **3**, 127-140 (1984)
- [86] Schliemann, W.
Phytochemistry **27**, 689-692 (1988)
- [87] Lenton, J. R., Appleford, N. E. J.
Gibberellin production and action during germination of wheat,
pp. 125-135
In: Takahashi, N., Phinney, B. O., MacMillan, J. (eds.) *Gibberellins*
Springer-Verlag Berlin (1991)
- [88] Langenscheidts Enzyklopisches Wörterbuch
Langenscheidt KG, Berlin-Schöneberg (1963)
- [89] Hedden, P.
Gibberellins, pp. 9-112
In: Rivier, L. und Crozier, A. (eds.) *Principles and Practice of Plant
Hormone Analysis* Vol. 1
Academic Press, London (1987)
- [90] Liebisch, H.-W.
Extraktion und Reinigung von Gibberellinen, S. 31-37
In: Sembdner, G., Schneider, G., Schreiber, K. (Hrsg.)
Methoden zur Pflanzenhormonanalyse
Gustav Fischer Verlag, Jena (1988)
- [91] Gräbner, R., Schneider, G., Sembdner, G.
J. Chromatogr. **121**, 110-115 (1976)

- [92] Müller, P.
Säulenchromatographie von Gibberelinen, S.59-68
In: Sembdner, G., Schneider, G., Schreiber, K. (Hrsg.)
Methoden zur Pflanzenhormonanalyse
Gustav Fischer Verlag, Jena (1988)
- [93] Senns, B., Fuchs, P., Schneider, G.
Phytochemistry 1997 (im Druck)
- [94] Gaskin, P., MacMillan, J. F., R. D., Pryce, R.J.
Phytochemistry **10**, 1155-1157 (1971)
- [95] Van den Dool, H., Kratz, P. D.
J. Chromatogr. **11**, 463-471 (1963)
- [96] Croker, S. J., Gaskin, P., Hedden, P., MacMillan, J., Kenneth, A. G.
Phytochemical Analysis **5**, 74-80 (1994)
- [97] Kitson, F. G., Larsen, B. S., McEwen, C. N.
Gas Chromatography and Mass Spectrometry - A Practical Guide
Academic Press, San Diego (1996)
- [98] Leenheer, A. P., Cruyl, A. A.
Quantitative Mass Spectrometry, pp. 1169-1207
In: Waller, G. R., Dermer, O. C. (eds.) *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*
A Wiley-Interscience Publication, New York (1980)
- [100] Watson, J. T.
Introduction to Mass Spectrometry
Raven Press, New York (1985)
- [101] Lehmann, W. D.
Massenspektrometrie in der Biochemie
Akademischer Verlag Spektrum, Heidelberg (1996)
- [102] Houben-Weyl
Methoden der Organischen Chemie, Band 10/4
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962)
- [103] Schneider, G., Schaller, B., Jensen, E.
Phytochemical Analysis **5**, 11-115 (1994)

- [104] Organikum (Organisch-chemisches Grundpraktikum)
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1986)
- [105] Sponsel, V. M.
Planta **159**, 454 (1983)
- [106] Lombardo, L.
Tetrahedron Lett. **23**, 4283 (1982)
- [107] Fuchs, P. und Schneider, G.
Phytochemistry **42**, 7-10 (1996)
- [108] Schmidt, J., Schneider G.
Biomedical and Environmental Mass Spectrometry **17**, 7-13 (1988)
- [109] Rinderknecht, H., Wilding, P., Haverback, B. J.
Experientia **23**, 805 (1967)
- [110] Bernhardt, D., Köhler, K.-H., Sembdner, G.
Biochem. Physiol. Pflanzen **174**, 607 (1979)
- [111] Großelindemann, E. Lewis, M. J., Hedden, P., Graebe, J. E.
Planta **188**, 252-257 (1992)
- [112] Schneider, G., Schmidt, J.
Conjugation of Gibberellins in *Zea mays*, pp.300-306
In Pharis, R. P., Rood, S. B. (eds.) *Plant Growth Substances 1988*
Springer-Verlag, Berlin (1990)
- [113] Fujioka, S., Yamane, H. Spray, C. R., MacMillan, J., Phinney, B. O.,
Takahashi, N.
Plant Physiol. **88**, 1367-1372 (1988)
- [114] Croker, S. J., Hedden, P., Lenton, J. R., Stoddart, J. L.
Plant Physiol. **94**, 194-200 (1990)
- [115] Lange, T., Robatzek, S., Frisse, A.
Plant Cell **9**, 1459-1467 (1997)
- [116] Ranjhan, S., Karrer, E. E., Rodriguez, R.L.
Plant Cell Physiol. **33**, 73-79 (1992)
- [117] Appleford, N. E. J., Lenton, J. R.
Physiologia Plantarum **100**, 534-542 (1997)
- [118] Karrer, E. E., Litts, J. C., Rodriguez, R. L.
Plant Molecular Biology **10**, 797-805 (1991)

Anhang

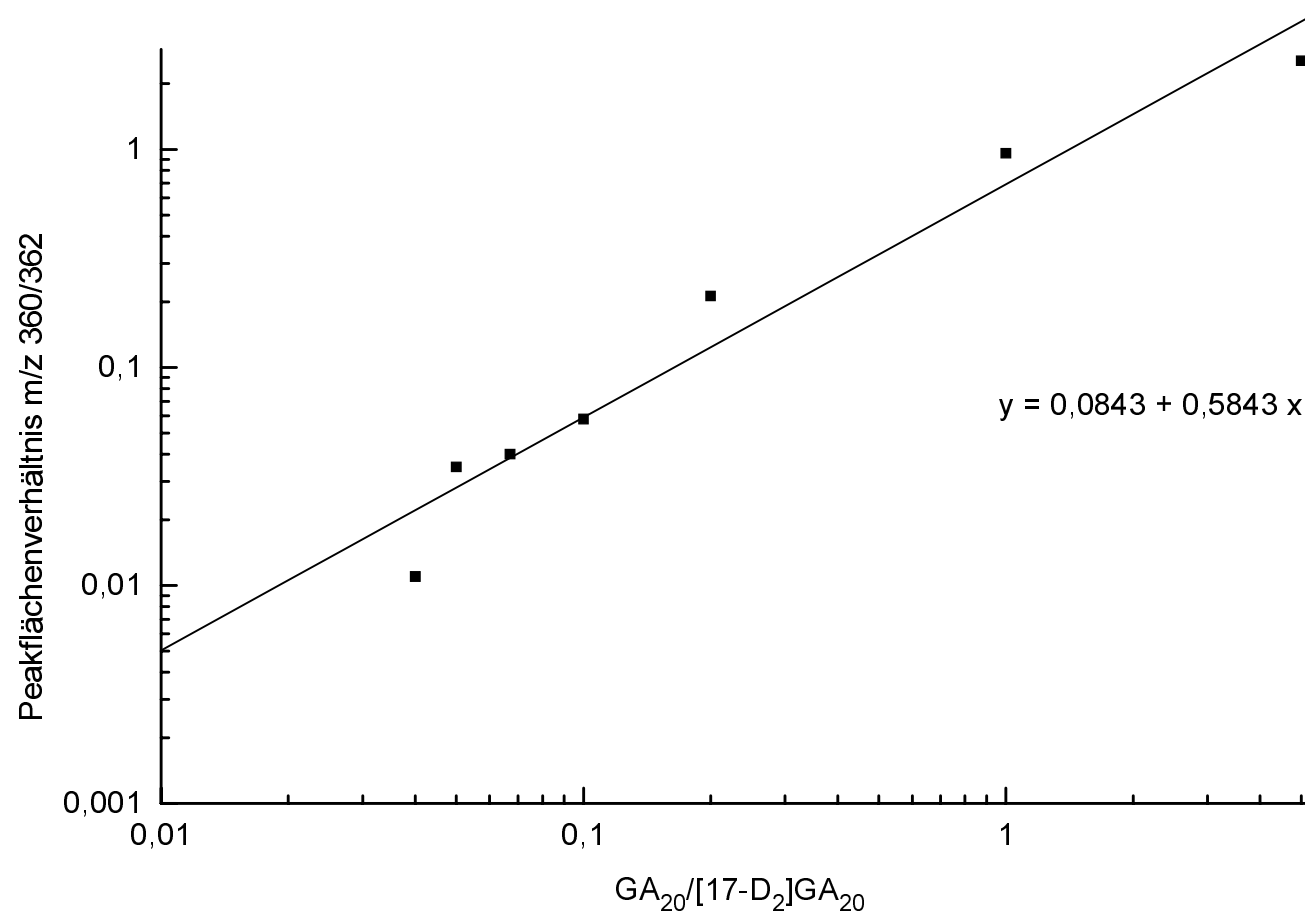


Abb.1: Kalibrierungskurve von Gemischen aus unmarkiertem und [17-D₂]-markiertem GA₂₀ (permethyliert) zur Quantifizierung des endogenen GA₂₀ (permethyliert)

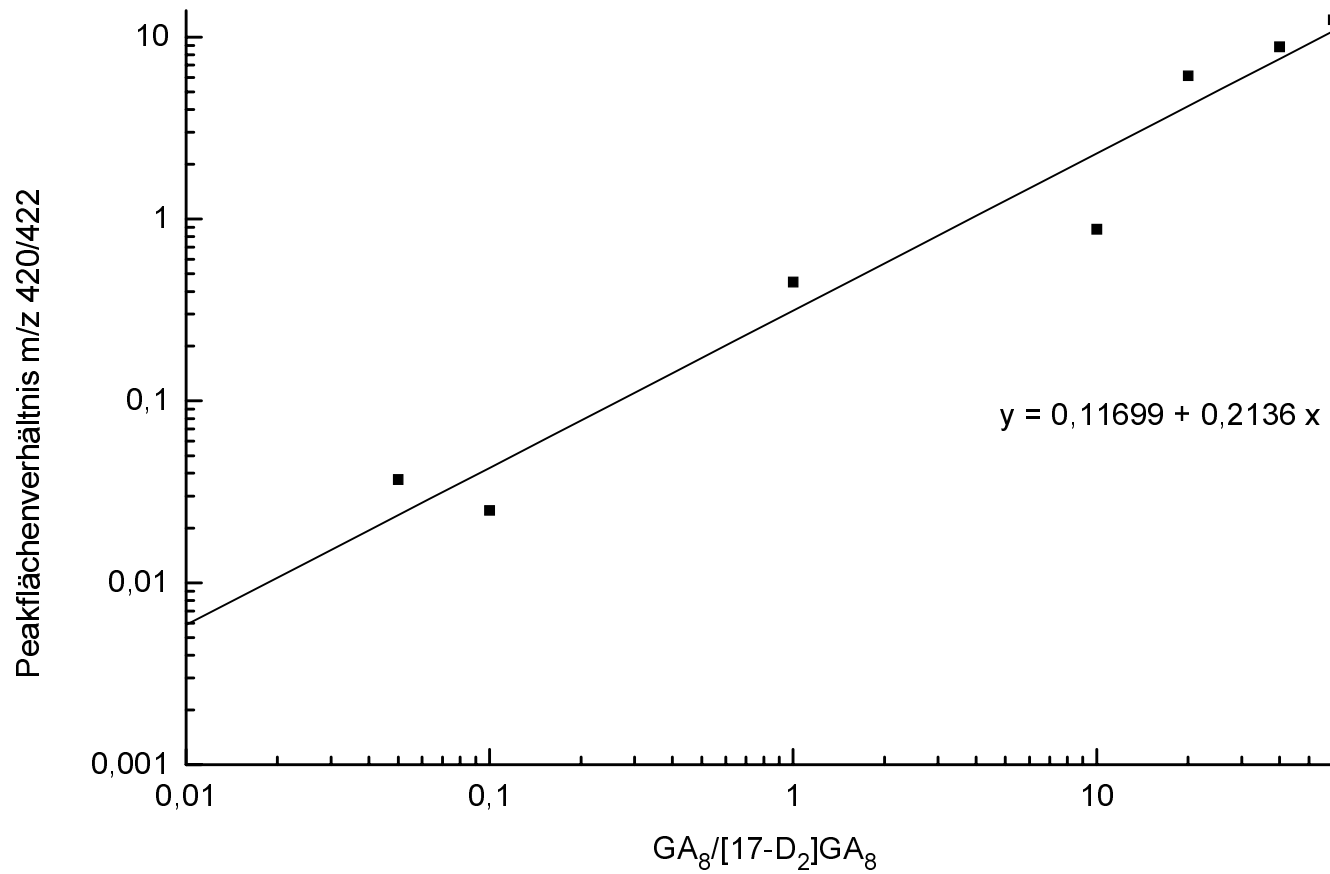


Abb.2: Kalibrierungskurve von Gemischen aus unmarkiertem und [17-D₂]-markiertem GA₈ (permethyliert) zur Quantifizierung des endogenen GA₈ (permethyliert)

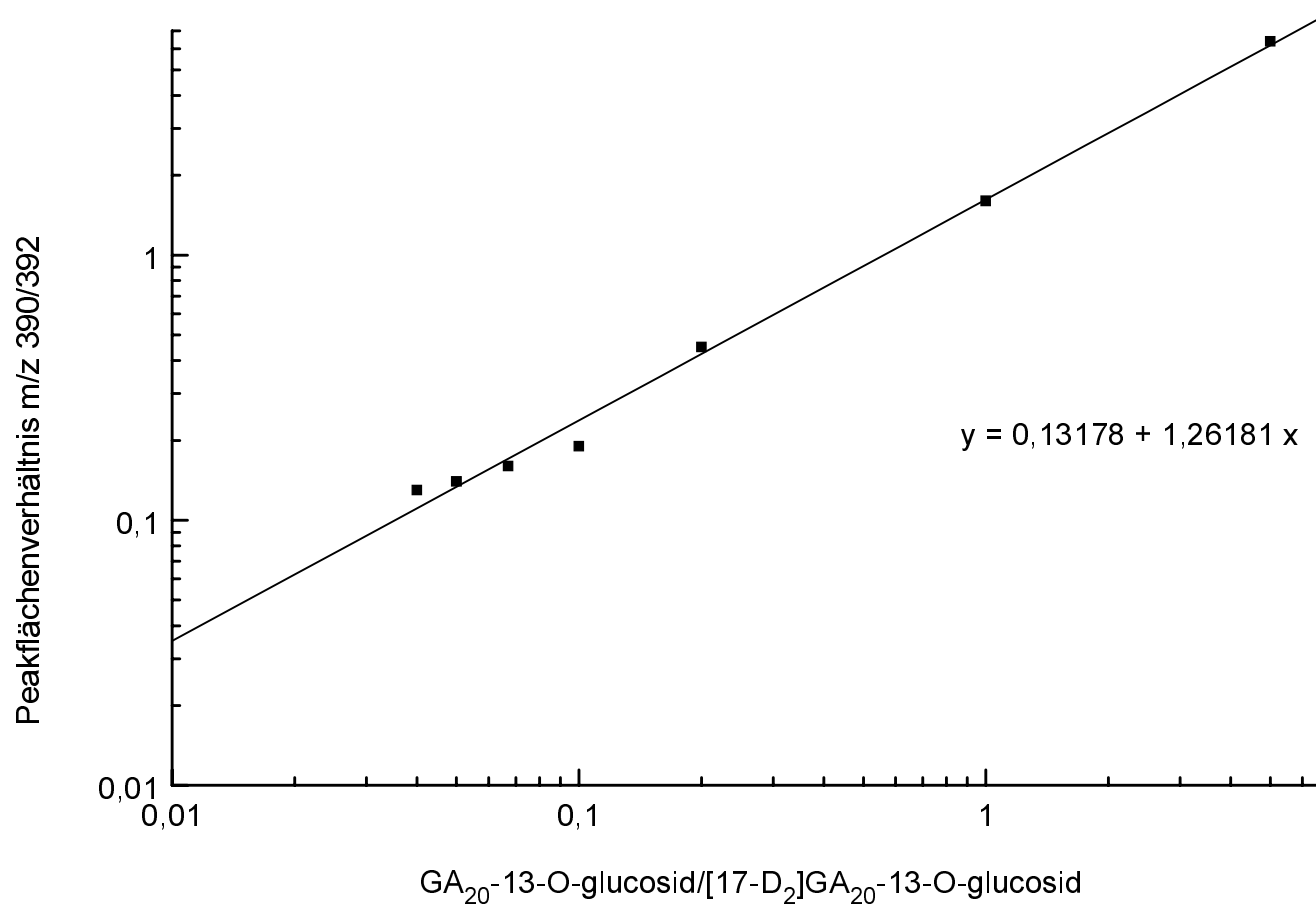
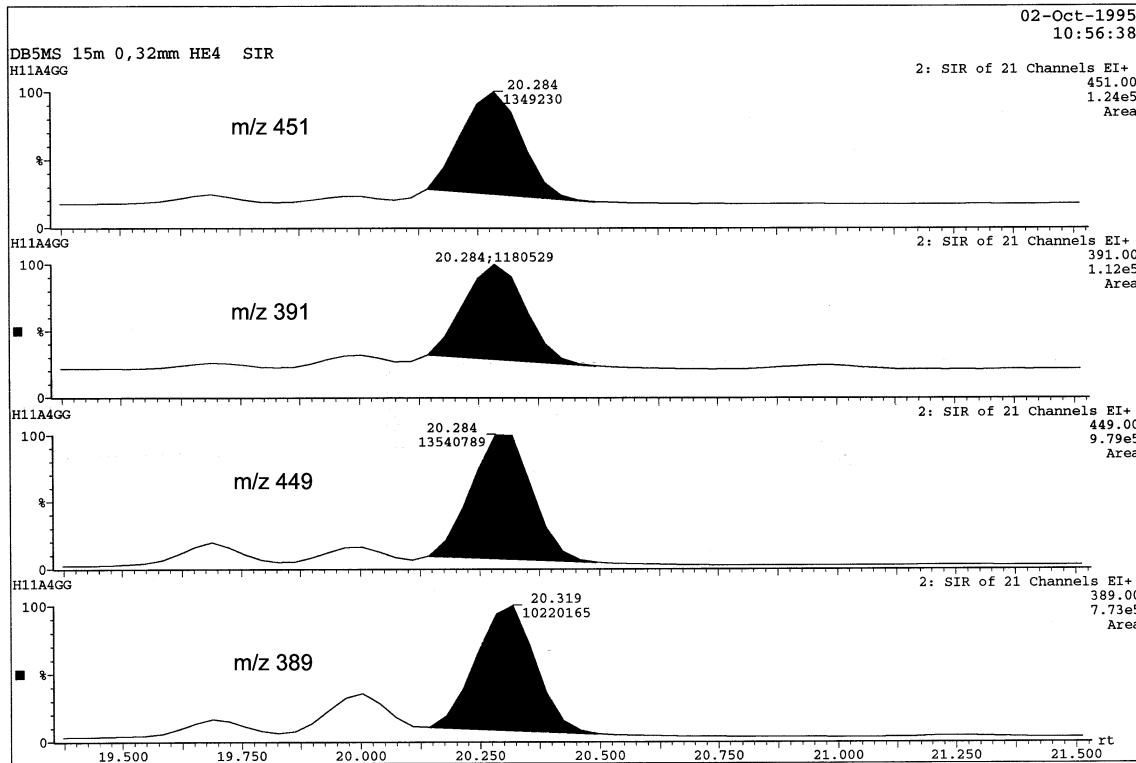


Abb.3: Kalibrierungskurve von Gemischen aus unmarkiertem und [17-D₂]-markiertem GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert) zur Quantifizierung des endogenen GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert)



↙ ↘
[17-D₂]GA₈-2-O-Glc (permethyliert)

interner Standard

↙ ↘
GA₈-2-O-Glc (permethyliert)

endogene Verbindung

Abb.4: Integrierter Ionencluster im GC-MS-Ionenchromatogramm zur Quantifizierung des endogenen GA₈-2-O-Glc (permethyliert) in reifenden Gerstenkaryopsen von cv. Himalaya (1994, kurz vor der Vollreife), interner Standard: [17-D₂]GA₈-2-O-Glc (permethyliert)

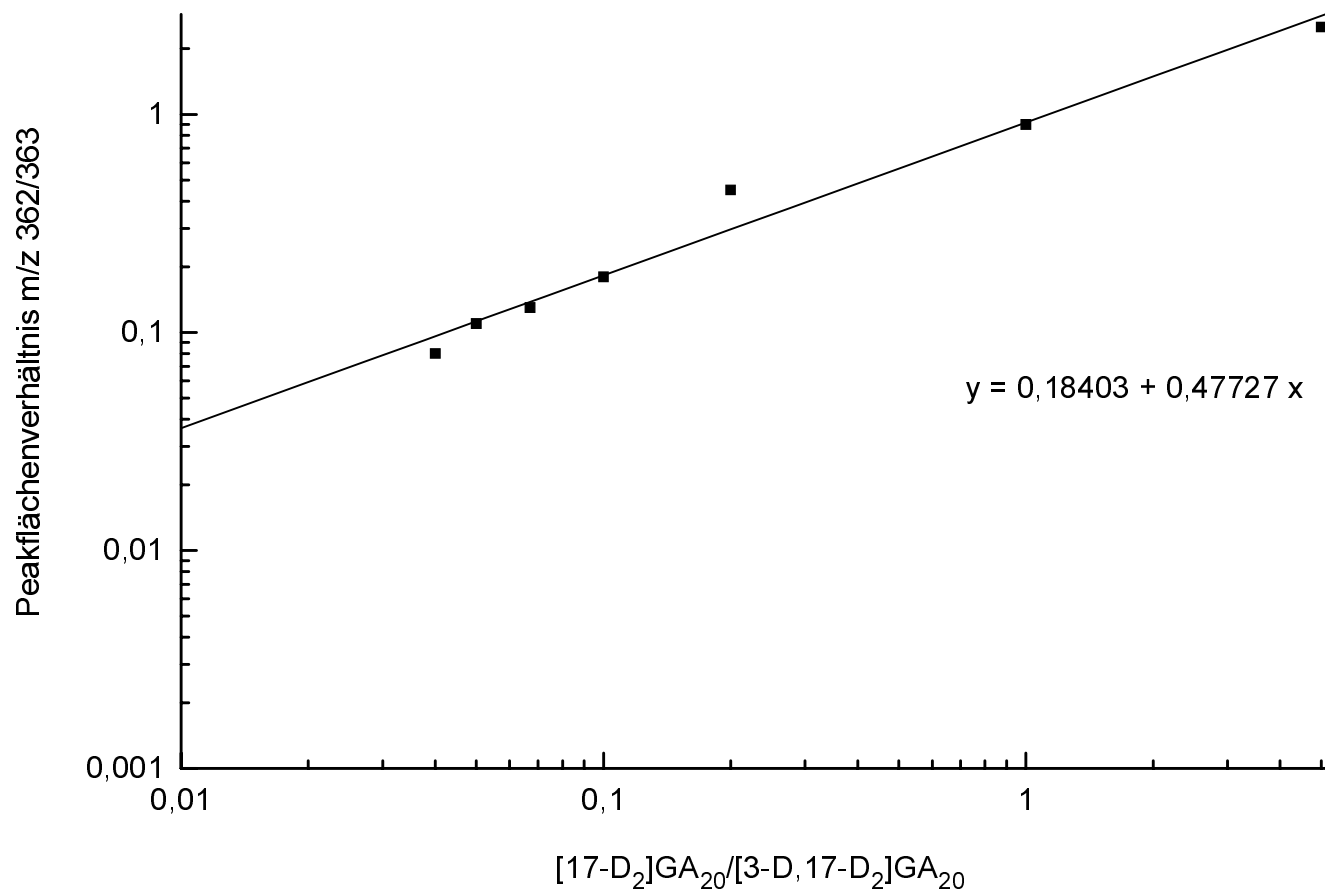


Abb.5: Kalibrierungskurve von Gemischen aus [17-D₂]GA₂₀ (permethyliert) und [3-D,17-D₂]GA₂₀ (permethyliert) zur Quantifizierung des metabolisch gebildeten [17-D₂]GA₂₀ (permethyliert)

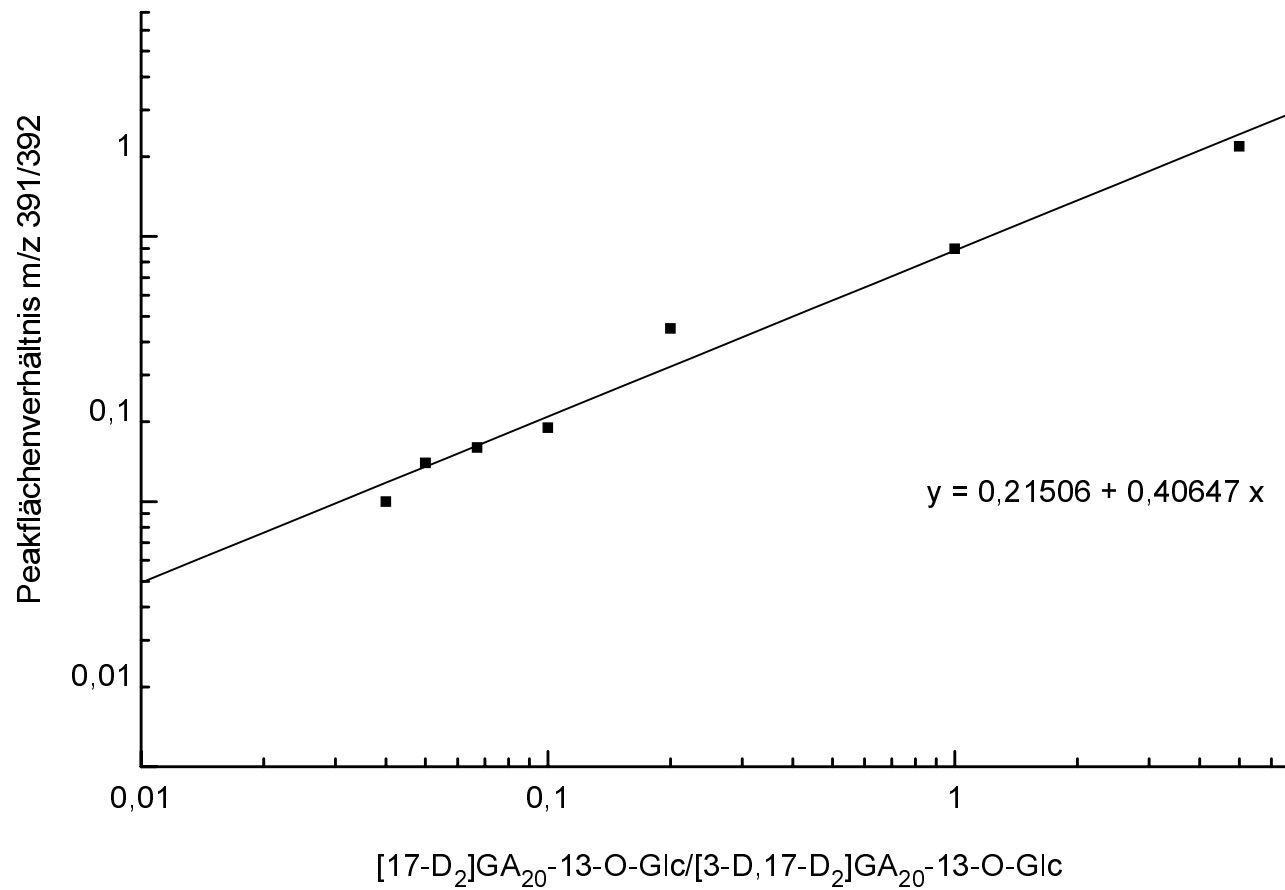
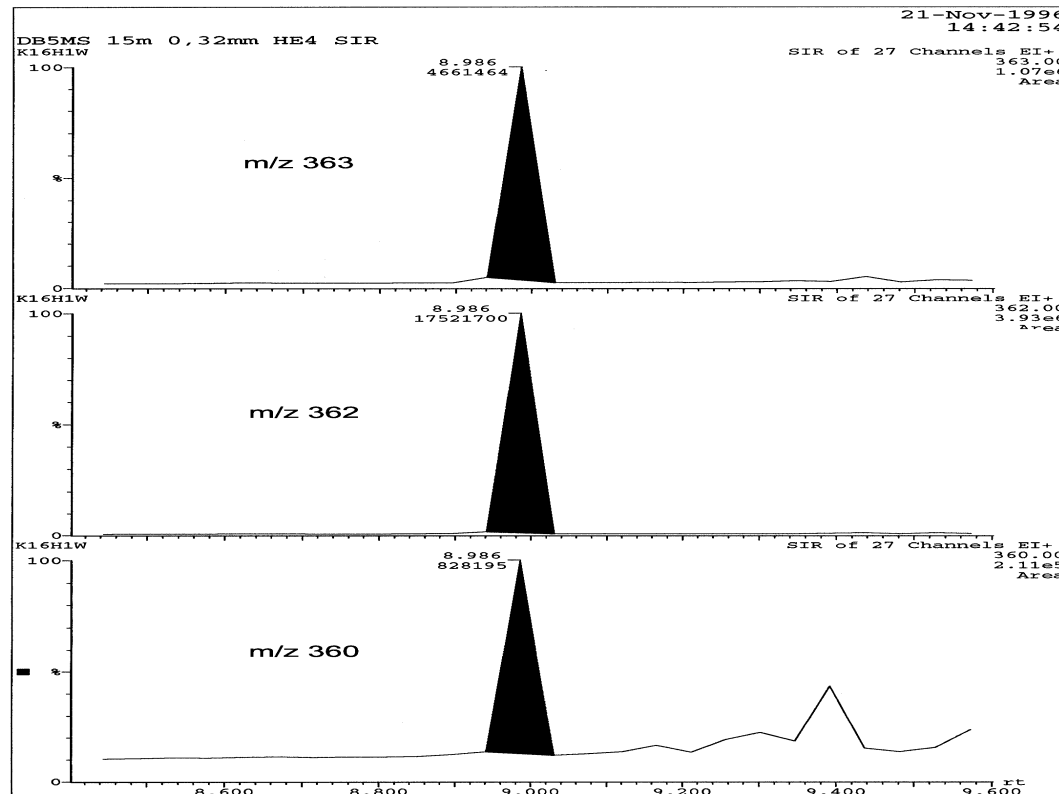


Abb.6: Kalibrierungskurve von Gemischen aus [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert) und [3-D,17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert) zur Quantifizierung des metabolisch gebildeten [17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc (permethyliert)



[3-D,17-D₂]GA₂₀ (permethyliert)

interner Standard

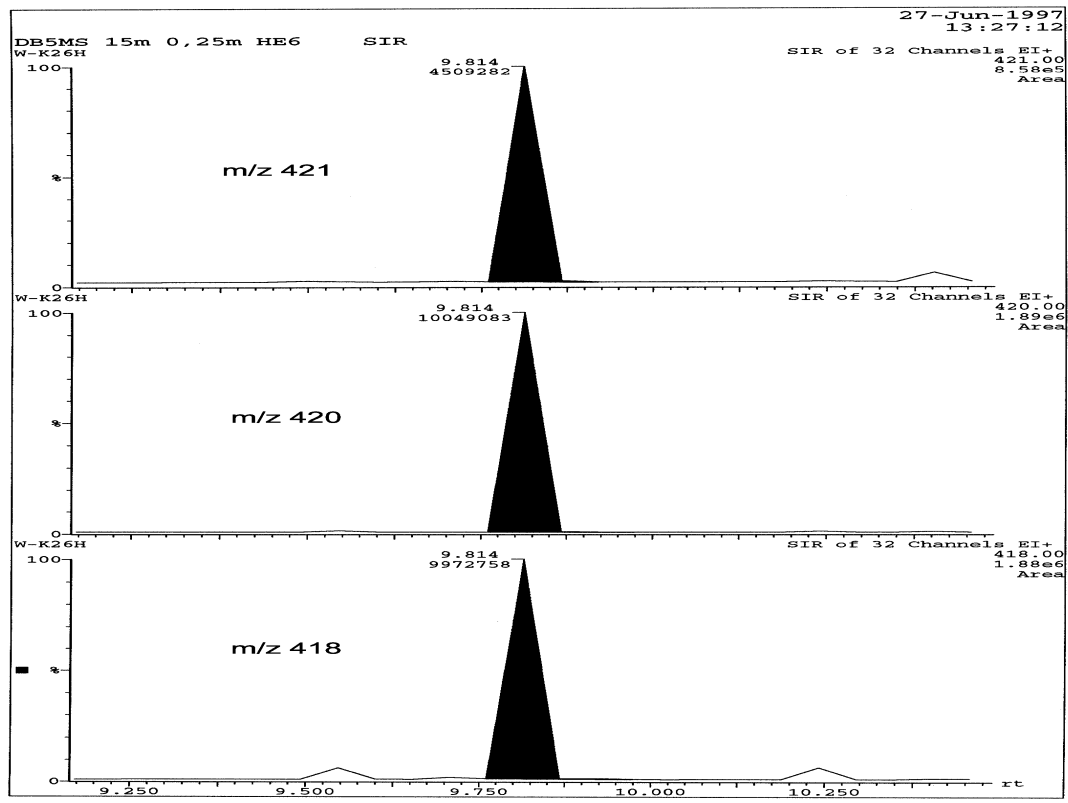
[17-D₂]GA₂₀ (permethyliert)

metabolisch gebildet

GA₂₀ (permethyliert)

endogene Verbindung

Abb.7: Integrierter Ionencluster im GC-MS-Ionenchromatogramm für die Quantifizierung des endogenen GA₂₀ (permethyliert) und des metabolisch gebildeten [17-D₂]GA₂₀ (permethyliert) nach sechs Stunden Inkubation von cv. Himalaya, interner Standard: [3-D,17-D₂]GA₂₀ (permethyliert)

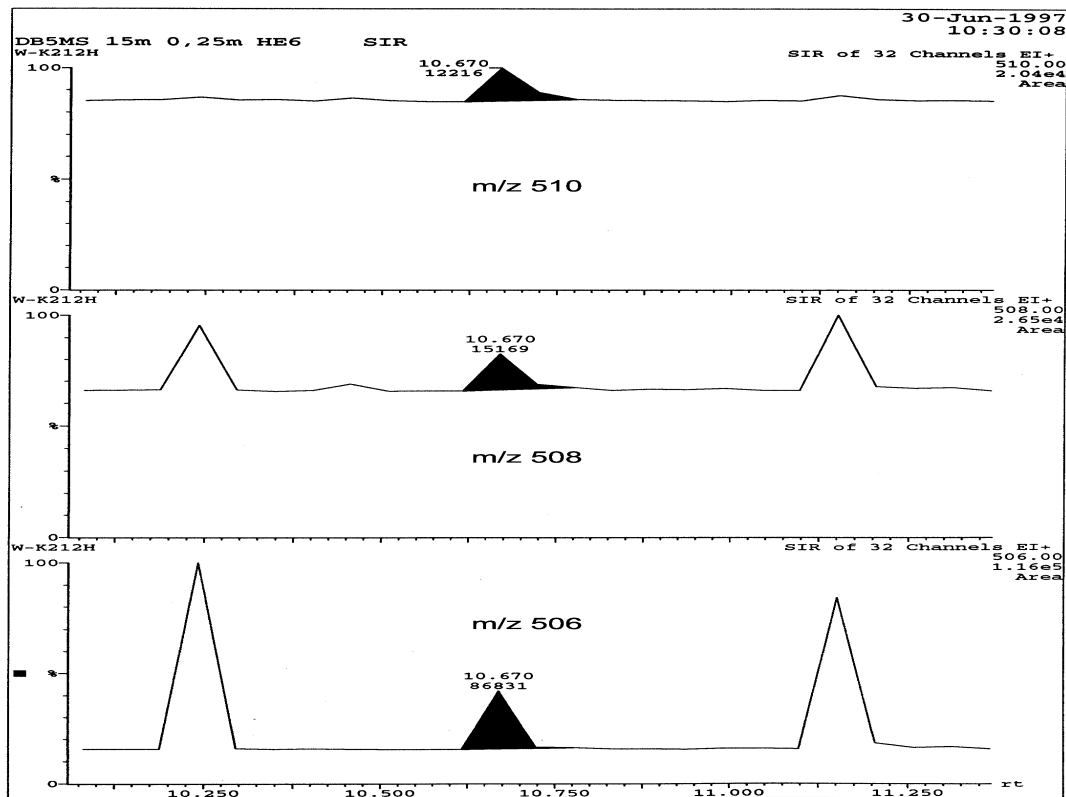


[3-D, 17-D₂]GA₂₀ (trimethylsilyliert)
interner Standard

[17-D₂]GA₂₀ (trimethylsilyliert)
metabolisch gebildet

GA₂₀ (trimethylsilyliert)
endogene Verbindung

Abb.8: Integrierter Ionencluster im GC-MS-Ionenchromatogramm für die Quantifizierung des endogenen GA₂₀ (triomethylsilyliert) und des metabolisch gebildeten [17-D₂]GA₂₀ (trimethylsilyliert) nach sechs Stunden Inkubation von cv. Himalaya, interner Standard: [3-D, 17-D₂]GA₂₀ (trimethylsilyliert)



[1-D,2-D,17-D₂]GA₁ (trimethylsilyliert)

interner Standard

[17-D₂]GA₁ (trimethylsilyliert)

metabolisch gebildet

GA₁ (trimethylsilyliert)

endogene Verbindung

Abb.9: Integrierter Ionencluster im GC-MS-Ionenchromatogramm für die Quantifizierung des endogenen GA₁ (triumethylsilyliert) und des metabolisch gebildeten [17-D₂]GA₁ (trimethylsilyliert) nach 12 Stunden Inkubation von cv. Himalaya, interner Standard: [3-D,17-D₂]GA₁ (trimethylsilyliert)

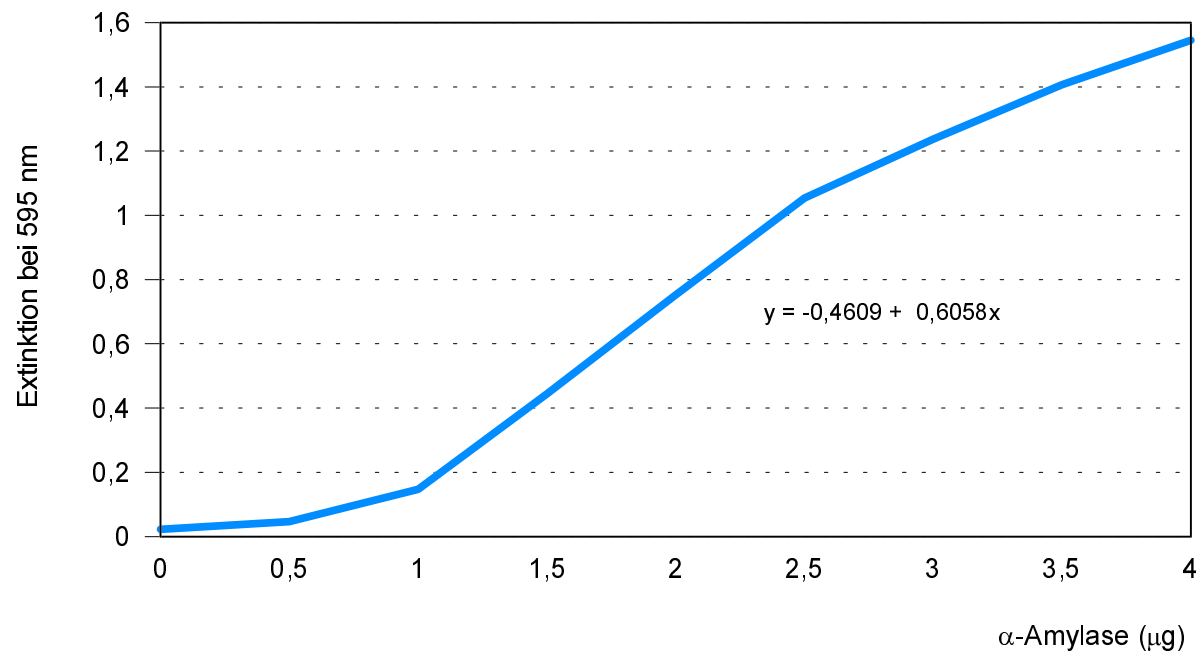


Abb.10: Kalibrierungskurve für die colorimetrische Bestimmung der α -Amylase mit Remazolbrilliantblue R

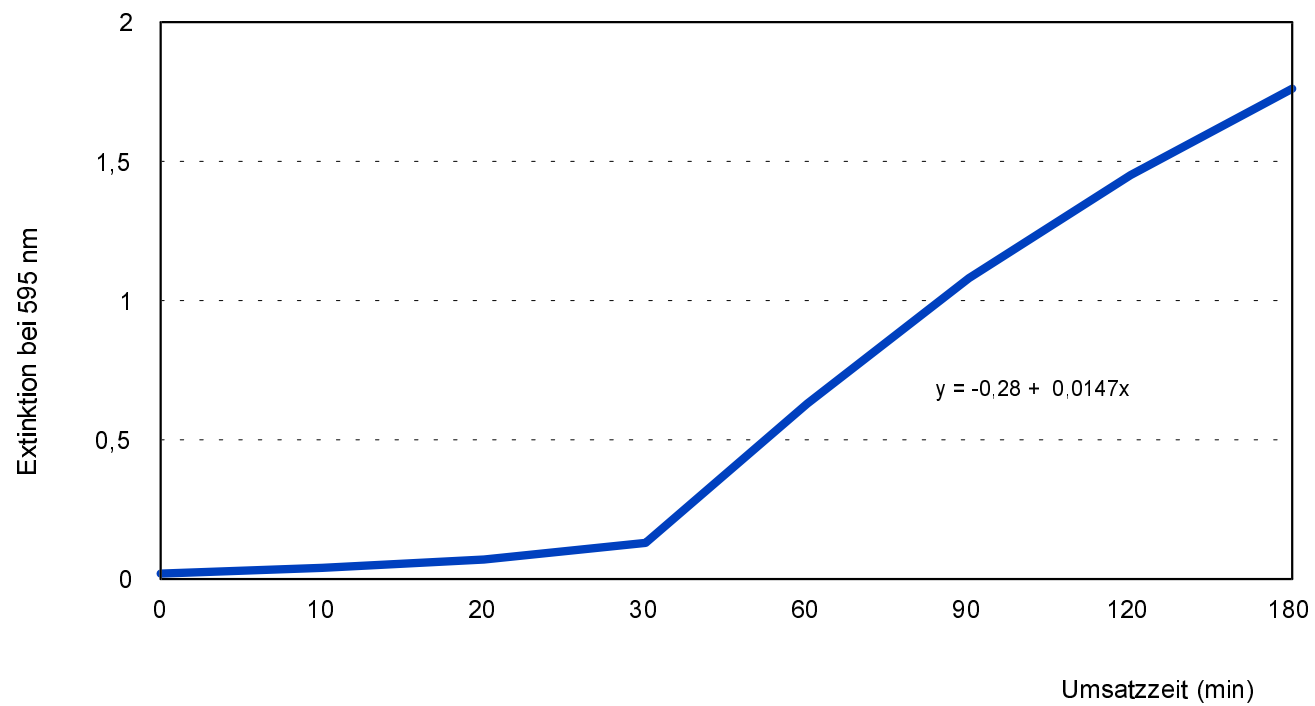


Abb.11: Zeit-Substrat-Umsatzkurve für 2 µg α-Amylase im Stärke-Azur Test

Parameter der linearen Regression für die Kalibrierungskurven

Abbildungsnummer im Anhang	a	s _a	b	s _b	r
1	0,0843	0,07865	0,5483	0,04076	0,98431
2	0,11699	0,51371	0,2136	0,018	0,9827
3	0,13178	0,04797	1,26181	0,02486	0,99903
5	0,18403	0,06761	0,47727	0,03504	0,98679
6	0,21506	0,07249	0,40647	0,03757	0,9793
10	-0,28	0,05659	0,0147	0,00069	0,99781
11	-0,4609	0,00529	0,6058	0,00288	0,99998

a,b Parameter der Geradengleichung: $y = a + bx$ (s. auch Abb.)

s_a, s_b Standardabweichungen der Parameter

r Regressionskoeffizient

Berechnung der Standardabweichungen für die GC-MS-Analyse

Probe: GA₂₀-13-O-Glc/[17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc, Gemisch 1:20

Meßwerte: Peakflächenverhältnis *m/z* 389/391:

$$y_1 = 0,1210$$

$$y_2 = 0,1215$$

$$y_3 = 0,1200$$

$$y_4 = 0,1215$$

$$y_5 = 0,1205$$

Mittelwert: $y = 0,1209$

relative Standardabweichung: $s_r = 0,0076$ (0,76%)

Probe: GA₂₀-13-O-Glc/[17-D₂]GA₂₀-13-O-Glc, Gemisch 1:1

Meßwerte: Peakflächenverhältnis *m/z* 389/391:

$$y_1 = 1,473$$

$$y_2 = 1,329$$

$$y_3 = 1,303$$

$$y_4 = 1,412$$

$$y_5 = 1,390$$

Mittelwert: $y = 1,381$

relative Standardabweichung: $s_r = 0,069$ (6,9%)

Probe: GA₂₀/[17-D₂]GA₂₀, in cv. Himalaya 1993-späte Wachsreife

Meßwerte: Peakflächenverhältnis *m/z* 360/362:

$$y_1 = 1,359$$

$$y_2 = 1,288$$

$$y_3 = 1,138$$

$$y_4 = 1,304$$

$$y_5 = 0,912$$

Mittelwert: $y = 1,200$

relative Standardabweichung: $s_r = 0,213$ (21,3%)

Formeln zur Berechnung:

Mittelwert:
$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i$$

relative
Standardabweichung:

$$s_r = \frac{s_y}{\bar{y}}$$

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1993 bis Dezember 1997 am Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abteilung Naturstoffchemie, angefertigt.

Herrn Professor Dr. G. Adam danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in der Abteilung Naturstoffchemie.

Für die Überlassung des interessanten Themas, die günstigen Arbeitsbedingungen und die wertvollen Hinweise und Diskussionen während dieser Arbeit gilt meinem Betreuer, Dr. G. Schneider, ein ganz besonderer Dank.

Frau Dr. P. Fuchs und Frau E. Neidhardt danke ich für die Bereitstellung der internen Standards.

Bei Frau G. Hahn möchte ich mich für die Anleitung und Übermittlung experimenteller Erfahrungen im Umgang mit Pflanzenextrakten bedanken.

Für die Betreuung während der zahlreichen GC-MS-Messungen bin ich Frau Ch. Kuhnt und Herrn Dr. J. Schmidt sehr dankbar.

Frau Otschik danke ich für die Durchführung der Radioaktivitätsmessungen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. W. Schliemann und Frau A. Kolbe für die Hinweise und die technische Hilfe bei der Bestimmung der α -Amylase.

Bei der Gärtnerei des Institutes möchte ich mich für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials bedanken.

Frau Ch. Kaufmann danke ich für die technische Hilfe bei den Zeichenarbeiten und Frau A. Kohlberg für die Aufnahme der Photographien.

Allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenbiochemie, die durch freundliche Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, möchte ich ebenfalls danken.

Die Untersuchungen wurden finanziell durch das Kultusministerium des Landes Sachsen-Anhalt unterstützt (FKZ 919A/8284 und 919A/0931).

Besonders danken möchte ich an dieser Stelle meiner Mutter, meinen Schwestern und Lothar für die moralische Unterstützung und das Verständnis bei der Anfertigung der Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche am Ende der Dissertation kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Halle/Saale, Mai 1998

Lebenslauf

Name: Bianca Senns

geboren: 27. 08. 1968 in Halle / Saale

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1975 - 1981 Polytechnische Oberschule "Wittekind" Halle
1981 - 1985 KJS "Friedrich Engels" Halle
1985 - 1987 Erweiterte Oberschule "Thomas Müntzer" Halle
1987 Abitur

Berufsausbildung:

1987 - 1988 Ausbildung zum Chemiefacharbeiter im Kombinat
VEB Chemische Werke BUNA in Schkopau

Berufstätigkeit:

1987 - 1988 Anlagenfahrer in der chemischen Produktion im
Kombinat VEB Chemische Werke BUNA in
Schkopau

Studium:

1988 - 1993 Studium der Chemie an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
Okt. 1992 - Juli 1993 Diplomarbeit zum Thema:
"Synthese und Reaktionsverhalten von N-Acryloyl-,
N-Cinnamoyl- und N-Crotonoyl-L-Aminosäurederivaten

Promotion:

Sept. 1993 - Dez. 1997 Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale
Betreuer:
Dr. habil. G. Schneider
Thema der Promotionsarbeit:
"Untersuchungen zur Gibberellin-konjugation
in Gerstenkaryopsen (*Hordeum vulgare* L. cv.
Himalaya und cv. Salome)"