

Phyton (Austria)	Vol. 23	Fasc. 1	91—99	15. 2. 1983
------------------	---------	---------	-------	-------------

Institut für Angewandte Botanik, Technische Mikroskopie und Organische
Rohstofflehre, Technische Universität Wien

Veränderungen des Phytosterolgehaltes in *Digitalis lanata* unter Wasserstreß

Von

Friedrich WURST, Christa HOCHÉ und Engelbert BANCHER*)

Mit 4 Abbildungen

Eingegangen am 16. Februar 1982

Key words: Phytosterols, water stress, drought injury, membrane components,
Digitalis lanata

Summary

WURST F., HOCHÉ Ch. & BANCHER E. 1983. Variations of phytosterol content under water stress in *Digitalis lanata*. — *Phyton (Austria)* 23 (1): 91—99, with 4 figures. — German with English summary.

Under water deficient conditions intact *Digitalis* plants show significant changes in their sterol content. At the beginning the amount of the three sterols in the polar fraction, β -sitosterol, stigmasterol and cholesterol increases and falls down when the water deficit in the leaves causes irreversible injuries. The sterols in the non polar fraction decrease until the critical point when the plants have lost their viability and then increase once more. These findings can be observed both in conventional and hydroponic cultivated plants, but in hydroponic the differences are greater. The concentration of the sterols in the non-polar fraction is much higher than in the polar; in the last β -sitosterol is the predominant component followed by stigmasterol and cholesterol.

Zusammenfassung

WURST F., HOCHÉ Ch. & BANCHER E. 1983. Veränderungen des Phytosterolgehaltes in *Digitalis lanata* unter Wasserstreß. — *Phyton (Austria)* 23 (1): 91—99, mit 4 Abbildungen. — Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

Digitalis lanata-Pflanzen zeigen unter Bedingungen des extremen Wassermangels signifikante Veränderungen im Sterolgehalt der Blätter. Die drei

*) Anschrift der Verfasser: p. Adr. Dr. F. WURST, Institut für Angewandte Botanik, Technische Mikroskopie und Organische Rohstofflehre, TU Wien, Getreidemarkt 9, A-1060 Wien (Austria).

getrennt analysierten Sterole der polaren Fraktion, Cholesterol, β -Sitosterol und Stigmasterol, zeigen zunächst einen Anstieg, der sich ab dem Zeitpunkt einer irreversiblen Schädigung durch Wassermangel in ein Absinken umkehrt. Im Gegensatz dazu zeigen die Sterole der nichtpolaren Fraktion am Beginn der Wasseranspannung einen Abfall, der sich zum Zeitpunkt des Verlustes der Viabilität der Blätter in einen Anstieg umkehrt. Diese Beobachtungen können sowohl bei Freilandpflanzen als auch an hydroponisch kultivierten Pflanzen gemacht werden, doch zeigen letztere deutlicher ausgeprägte Unterschiede.

1. Einleitung

Das verbreitete Vorkommen von Phytosterolen in Pflanzen, über das vielfach in der Literatur berichtet wird (Zusammenfassung bei GRUNWALD 1980) ist aus deren Beteiligung am Aufbau biologischer Membranen leicht verständlich. Sterole wurden in vielen niederen Pflanzen und allen Organen einiger höherer Pflanzen gefunden, wobei bei letzteren β -Sitosterin, Stigmasterin, Campesterin und Cholesterin die Hauptkomponenten darstellen. Als freie Sterole sind sie maßgebend sowohl am Aufbau als auch an der Funktion von Membranen beteiligt, wohingegen für ihre Fettsäureester, Glykoside und Acylsterylglykoside keine einheitliche Auffassung hinsichtlich ihrer Bedeutung besteht; in Betracht zu ziehen sind vornehmlich das Vorliegen einer Speicher- und Transportform dieser Verbindungen sowie eine Regulation der Biosynthese der einzelnen Komponenten (BRADY & GAYLOR 1971, GRUNWALD 1975b). Für *Digitalis lanata* Ehrh. besitzen die Phytosterole eine weitere Bedeutung, da hier Cholesterin als Vorstufe bei der Cardenolidbiosynthese erkannt wurde (TSCHESCHE *et al.* 1970, CASPI *et al.* 1966). Durch Versuche mit ^{14}C -markierten Verbindungen, entweder Ausgangssubstanzen oder Zwischenprodukte der Biosynthese, wurde dies mehrfach bestätigt (EVANS & COWLEY 1973, DOUGLAS & PALEG 1978, BENNET & HEFTMANN 1965). Von äußeren, den Gehalt und das Muster der einzelnen Sterole beeinflussenden Faktoren ist vor allem das Licht untersucht (BUSH *et al.* 1971), wobei an einen Zusammenhang mit dem Alterungsprozeß der betreffenden Organe gedacht wird (DUPÉRON 1971). DAVIS & FINKNER 1972 konnten für *Triticum aestivum* eine Temperaturabhängigkeit der Sterolbildung feststellen und dabei die höheren Sterolgehalte bei Temperaturen nahe dem Wachstumsoptimum finden. Über den Einfluß der Wasserversorgung bzw. die Wirkung eines Wasserstress liegen bislang keine Untersuchungen vor, wiewohl dieser Faktor für das Funktionieren der Membranen sehr wesentlich ist. Nach Beobachtungen einer Erhöhung des Lanatosid C-Gehaltes in *Digitalis lanata* unter Einwirkung von Wassermangel (WURST 1982) schien es auf Grund des biogenetischen Zusammenhanges der Cardenolide mit den Sterolen interessant, unter der gleichen Behandlung den Sterolgehalt der intakten Pflanzen zu untersuchen. Dabei sollte auf die unterschiedlichen Sterolpools im Gewebe durch die getrennte Erfassung der Sterole in einer polaren sowie in einer nichtpolaren Fraktion eingegangen werden.

2. Material und Methodik

2.1. Pflanzenmaterial

Für die Untersuchung wurden *Digitalis lanata* Pflanzen aus hydroponischer Kultur und aus dem Freiland verwendet. Die hydroponische Aufzucht erfolgte im Labor unter Verwendung einer Hoagland-Nährlösung, einem lockeren inerten Substrat und Kunstlicht bis zu einem Alter von 3 Monaten. Zu Versuchsbeginn wurde eine Mischprobe alter und junger Blätter geerntet und ab diesem Zeitpunkt die Nährlösungszufuhr abgesetzt. Damit waren die Pflanzen einem Vertrocknungsprozeß ausgesetzt, der je nach dem im Substrat enthaltenen Wasservorrat mehr oder weniger schnell zum Wasserverlust der Pflanzen führt. An bestimmten Tagen des Vertrocknungsprozesses wurden ebenfalls Blattproben geerntet und getrennt einer Wassergehaltbestimmung und Extraktion der Sterole zugeführt. Freilandpflanzen wurden im Alter von sechs Monaten in Töpfe verpflanzt und im Labor weiterkultiviert. Nach drei Wochen weiteren Wachstums wurde die Bewässerung abgesetzt; zu diesem Zeitpunkt und darauf folgend in gewissen Abständen wurden Blattproben geerntet und in gleicher Weise wie bei Hydrokulturlpflanzen weiter verarbeitet.

2.2. Extraktion der Sterole

Die Rohextrakte der polaren und der nichtpolaren Fraktion wurden nach der Vorschrift von COWLEY *et al.* 1971 gewonnen. Die Reinigung der Rohextrakte erfolgte durch präparative Schichtchromatographie auf 0,5 oder 2 mm dick beschichteten Kieselgelplatten. Als bestes Laufmittel erwies sich bei zweimaliger Entwicklung eine Lösung von 5% Petroleumbenzin (40–60° C) in Dichlormethan. Zur Kennzeichnung der sterinhaltigen Zone wurde am Plattenrand Cholesterin aufgetragen, nach dem Entwickeln selektiv diese Laufbahn mit Jod besprüht und die Sterolzone markiert (R_f -Wert 0,19–0,22). In diesem Bereich wurde die Schicht abgeschabt, mit 50 ml Methanol eluiert und das Lösungsmittel zur Trockene eingedampft. Dieser Rückstand enthielt fast vollständig reine Sterole.

2.3. Quantitative Bestimmung der Sterole

Die quantitative Analyse erfolgte gaschromatographisch. Dazu wurde der trockene Rückstand des gereinigten Extraktes in 1 ml Pyridin aufgenommen und mit 0,5 ml Hexamethyldisilazan und 0,5 ml Chlortrimethylsilan 30 Min. bei 60° C erhitzt. Für die Chromatographie wurde eine OV-17-Säule verwendet, als Trägergas Stickstoff (20 ml/min.), die Temperatur betrug 285° C isotherm. Die Quantifizierung erfolgte über die Flächenwerte einer Eichkurve von Reinsubstanzen, wobei sich bei ausgezeichneter Reproduzierbarkeit Absolutmengen von 0,05 µg nachweisen ließen.

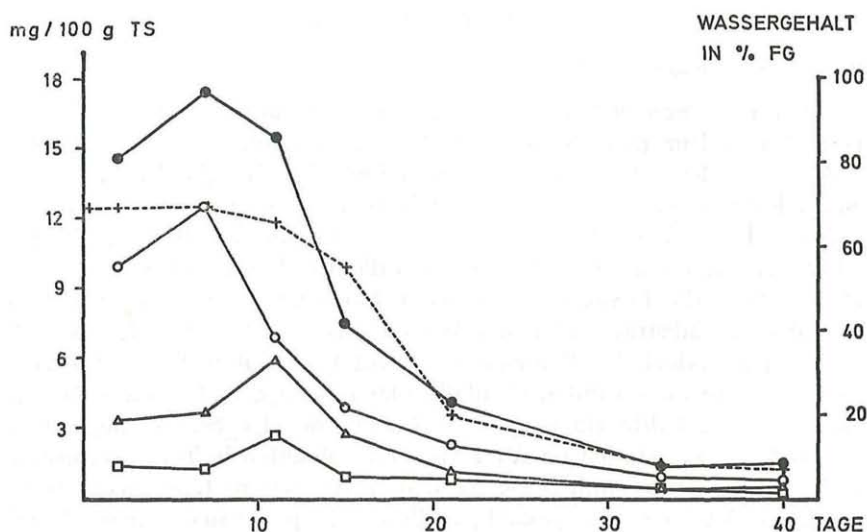


Abb. 1. Sterolgehalt der polaren Fraktion der Hydrokulturlpflanzen während der Trocknungsperiode. ● — ● Gesamtsterole, ○ — ○ β -Sitosterin, Δ — Δ Stigmasterin, □ — □ Cholesterin, + — — + Wassergehalt

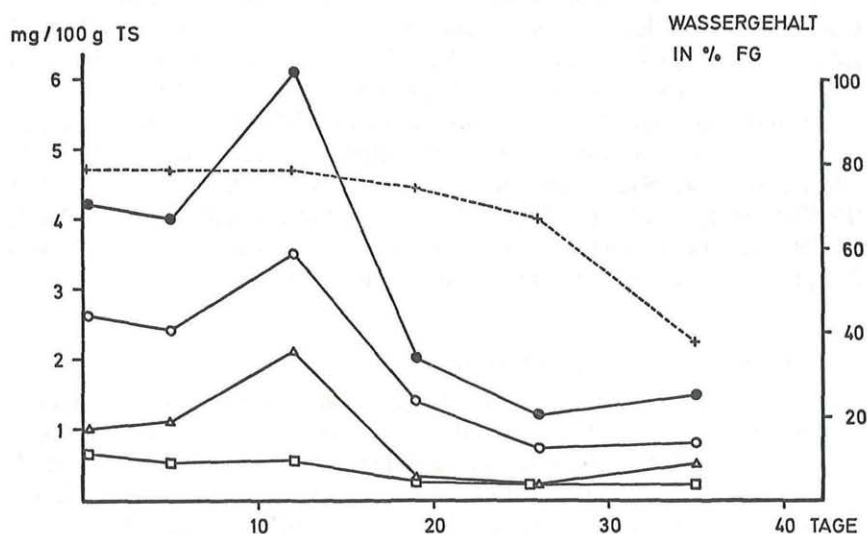


Abb. 2. Sterolgehalt der polaren Fraktion der Erdkulturlpflanzen während der Trocknungsperiode. ● — ● Gesamtsterole, ○ — ○ β -Sitosterin, Δ — Δ Stigmasterin, □ — □ Cholesterin, + — — + Wassergehalt

3. Ergebnisse

Der Gesamtsterolgehalt, berechnet als Summe der aus allen Sterolkomponenten freigesetzten Sterole, betrug in den frischen Blättern von hydroponisch kultivierten Pflanzen 78 mg/100 g TS, bei den Freilandpflanzen hingegen nur 71 mg/100 g TS; damit liegen für den anschließenden Trocknungsprozeß etwa gleiche Ausgangswerte vor. Der Gehalt der Sterole der polaren und nichtpolaren Fraktion zeigt beträchtliche Unterschiede. Nach dem hier angewandten Extraktionsgang findet sich in der nichtpolaren Phase ein wesentlich höherer Sterolgehalt; dies gilt sowohl für die Summe als auch für die drei getrennt erfaßten Substanzen β -Sitosterin,

Tabelle 1

Gesamtsterolgehalt der Hydroponikpflanzen während der Vertrocknung

Zeitdifferenz in Tagen ab dem Aussetzen der Wasserversorgung	Sterolgehalt in mg/100 g TS
2	78,51
7	44,31
11	31,88
15	30,75
21	53,22
33	66,72
40	63,66

Stigmasterin und Cholesterin. Ebenso ist die Verteilung der einzelnen Sterole in einer Phase sehr unterschiedlich. β -Sitosterin ist vor allem in der polaren Phase das dominante Sterin, gefolgt von Stigmasterin und Cholesterin, bzw. Cholesterin und Stigmasterin in der nichtpolaren Phase. Die Abb. 1, 2, 3 und 4 zeigen die Veränderungen der einzelnen Steringehalte während des Trocknungsprozesses. Es zeigt sich eine Übereinstimmung der Kurvenverläufe der drei untersuchten Verbindungen. In der polaren Fraktion steigen zu Beginn der Vertrocknung die Werte bis zu einem Maximum an, später fallen sie rasch ab und nähern sich einem Minimalwert. Die Gehalte aller Sterine der Hydrokulturlpflanzen sind am Beginn des Beobachtungszeitraumes wesentlich höher und das Maximum ausgeprägter als bei Erdkulturlpflanzen; der Minimalwert am Ende der Trocknungsphase liegt jedoch auf gleichem Niveau. Im Vergleich dazu zeigt die nichtpolare Fraktion einen umgekehrten Kurvenverlauf, jedoch in einem höheren Konzentrationsbereich (Abb. 3). Auch hier ist eine deutlich stärker ausgeprägte Reaktion der Hydrokulturlpflanzen nachweisbar. Betrachtet man die Mengen der gesamten Sterine beider Fraktionen, dann resultiert während

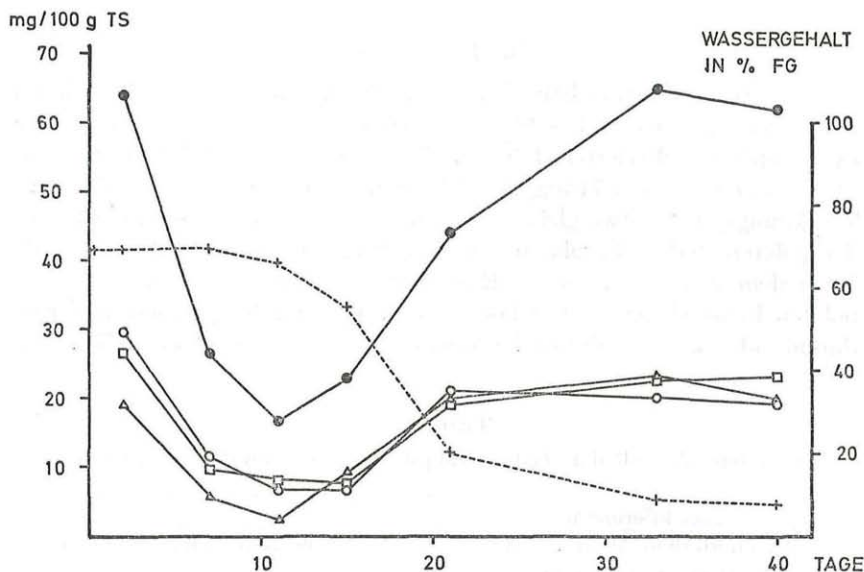


Abb. 3. Sterolgehalt der nichtpolaren Fraktion der Hydrokulturpflanzen während der Trocknungsperiode. ● — ● Gesamtsterole, ○ — ○ β-Sitosterin, △ — △ Stigmasterin, □ — □ Cholesterin + — + Wassergehalt

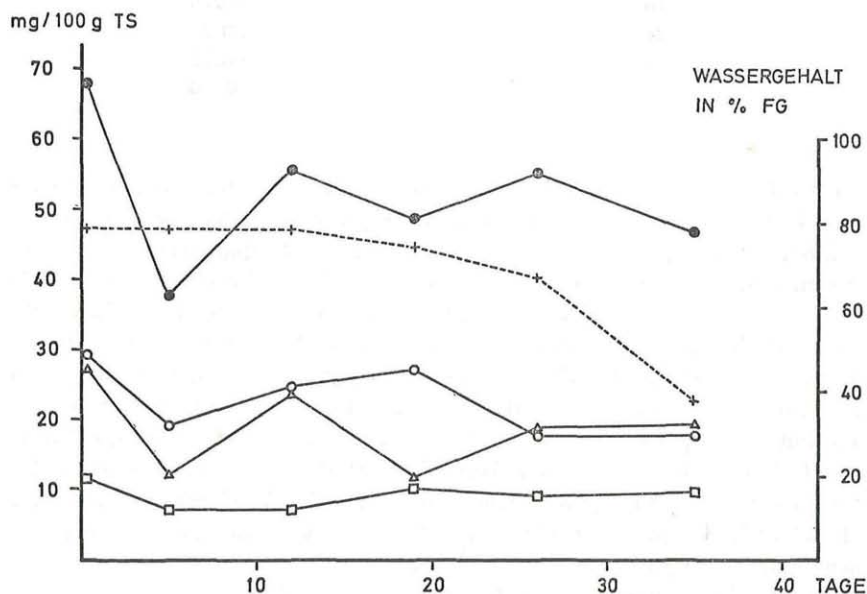


Abb. 4. Sterolgehalt der nichtpolaren Fraktion der Erdkulturpflanzen während der Trocknungsperiode. ● — ● Gesamtsterole, ○ — ○ β-Sitosterin, △ — △ Stigmasterin, □ — □ Cholesterin, + — + Wassergehalt

des Trocknungsprozesses auf Grund des höheren Konzentrationsniveaus der nichtpolaren Fraktion ein Kurvenverlauf, der dieser entspricht (Tab. 1). Man erkennt darin einen absoluten Minimalwert, der mit der kritischen Phase des Trocknungsprozesses — Übergang von Viabilität in Mortalität — in Zusammenhang steht.

4. Diskussion

Bei der kritischen Betrachtung der Ergebnisse sind zwei Gesichtspunkte auseinanderzuhalten. Der erste bezieht sich auf die am Beginn des Trocknungsprozesses vorliegenden Sterolgehalte in den beiden untersuchten Fraktionen und auf die Differenzen, die sich zwischen Hydrokultur und Erdkultur zu diesem Zeitpunkt zeigen. In beiden Kulturformen ist der Sterolgehalt in der nichtpolaren Phase höher. Zu dem gleichen Ergebnis kommt auch EVANS 1972, der an *Digitalis purpurea* die Phytosterine während des Wachstums untersucht hat. Unterschiede zwischen Pflanzen aus Hydro- und aus Erdkultur treten markant nur in der polaren Sterolfraction auf, wobei die ersteren einen etwa um den Faktor 3 höheren Gehalt aufweisen. Diese Differenz muß auf die unterschiedliche Vorgeschichte, auf ungleiches Alter und die andere Kultivationsform zurückgeführt werden. Die Erdkulturpflanzen hatten auf Grund ihres höheren Alters und der Kultivation im Freiland auch einen anderen Habitus. DAVIS & FINKNER 1972 konnten an *Triticum aestivum* eine positive Beziehung zwischen Sterolgehalt und Wachstumstemperaturoptimum nachweisen. Möglicherweise gilt dies auch für die hier untersuchten Pflanzen, zumal die Hydroponikkultur im Labor unter höheren und gleichmäßigeren Temperaturbedingungen erfolgte. Sicher können noch weitere Umweltbedingungen, die als Einflußgrößen auf den Sterolgehalt bekannt sind, für die Unterschiede verantwortlich sein; insbesondere liegen für den Faktor Licht Ergebnisse vor (BUSH *et al.* 1971, DUPÉRON 1968). An Tabakblättern stellt GRUNWALD 1975a fest, daß für den Anstieg des Sterolgehaltes mit zunehmender Reife der Blätter vor allem die Fraktion an freien Sterolen verantwortlich ist. Nach dem hier bei *Digitalis lanata* angewandten Extraktionsvorgang enthält die polare Fraktion ebenfalls freie Sterole, wodurch auch hier der Unterschied möglicherweise auf die letztere Komponente zurückgeführt werden kann. Eine exakte Aussage darüber bleibt allerdings einer vollständigen Auftrennung der Sterolkomponenten vorbehalten.

Der zweite Gesichtspunkt betrifft die Änderung der Sterolgehalte während eines Trocknungsprozesses und bezieht sich somit auf die eingangs gestellte Frage. Dabei zeigt sich interessanterweise eine Übereinstimmung zwischen beiden Kultivationsformen, die für die polare Sterolfraction exakt den gleichen Kurvenverlauf, zeitlich aber etwas verschoben, ergab und auch bei der nichtpolaren in ihrer Tendenz zu gleichem Ergebnis führt. Diese zeitliche Verschiebung beruht auf dem unterschiedlichen Wasservorrat des jeweiligen Pflanzensubstrates, der sich auch bei der Messung des

Wassergehaltes der Pflanzen manifestiert. Kommt es am Beginn der Trocknung zu einem Anstieg der polaren Sterolkomponenten, so setzt ab jenem Zeitpunkt, zu welchem eine übermäßige Wasseranspannung am Wassergehalt der Blätter meßbar wird, ein starkes Absinken ein. Aus einer getrennten Beobachtung an wasserdefizienten Pflanzen war abzuleiten, daß eine sichtbar verminderte Turgeszenz der Blätter von *Digitalis lanata* bis etwa zu diesem Zeitpunkt, wenn sich im Wassergehalt nur kleinste Unterschiede nachweisen lassen, reversibel ist. Unter fortgesetzter Wasseranspannung erleiden die Pflanzen — zunächst die äußeren Blätter der Rosette — irreversible Schäden. Spiegelbildlich verkehrt dazu zeigt sich der Kurvenverlauf mit geringer zeitlicher Verschiebung in der nichtpolaren Fraktion.

Die Bedeutung der Sterole bei Aufbau und Funktion biologischer Membranen leitet über zum Konzept des Wasserstress (LEVITT 1980). Auf fortschreitende Dehydratation sinkt der Turgor, wodurch eine Kontraktion der Membran bewirkt wird. Eine Erniedrigung der Permeabilität unter Wasserstreß konnten LÜTTGE *et al.* 1977 für Malat und eine Verkleinerung des Membranpotentials RUBINSTEIN *et al.* 1977 feststellen. Damit einhergehende Änderungen der Proteinkonformation und der Aktivitätsänderung von membrangebundenen Enzymen sind der Ausgangspunkt für die anschließenden letalen Stoffwechselstörungen. Die deutlichen Veränderungen des Sterolgehaltes scheinen ein früher und empfindlicher Parameter im Gefolge eines Wasserstress zu sein. Inwieweit davon membrangebundene Sterole betroffen sind, läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht mit Sicherheit ableiten, doch wird es aus der Änderung der polaren Sterolkomponente wahrscheinlich. Scheinbar ist der Grund für die beobachtete Erhöhung des Lanatosid C-Gehaltes (WURST 1982) durch die metabolische Verflochtenheit der Phytosterole mit den Steroidglykosiden in den hier aufgezeigten Änderungen der Sterolgehalte zu sehen.

Literatur

- BENNETT R. D. & HEFTMANN E. 1975. *In vivo* conversion of squalene to β -sitosterol. — *Phytochemistry* 4: 475—479.
- BRADY D. R. & GAYLOR J. L. 1971. Enzymic formation of esters of methyl sterol precursors of cholesterol. — *J. Lipid Res.* 12: 270—276.
- BUSH P. B., GRUNWALD C. & DAVIS D. L. 1971. Changes in sterol composition during greening of etiolated barley shoots. — *Plant Physiol.* 47: 745—749.
- CASPI E., LEWIS D. O., PIATAK D. M., THIMANN K. V. & WINTER A. 1966. Biosynthesis of plant sterols. Conversion of cholesterol to pregnenolone in *Digitalis purpurea*. — *Experientia* 22: 506—507.
- COWLEY P. S., EVANS F. J. & GINMAN R. F. A. 1971. Simultaneous spectrometric determination of 5-ene and 7-ene sterols from leaves and seeds of *Digitalis purpurea*. — *Planta Med.* 19: 249—257.
- DAVIS D. L. & FINKNER V. C. 1972. Influence of temperature on sterol biosynthesis in *Triticum aestivum*. — *Plant Physiol.* 52: 324—326.

- DOUGLAS T. J. & PALEG L. G. 1978. AMO 1618 effects on incorporation of ^{14}C -mevalonic acid and ^{14}C -acetate into sterols in *Nicotiana* and *Digitalis* seedlings and cell-free preparations from *Nicotiana*. — *Phytochemistry* 17: 713—718.
- DUPÉRON P. 1968. Evolution des stérols au cours de la germination des semences de *Raphanus sativus*. Influence de la lumière et de la nutrition minérale. — *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D* 266: 1658—1661.
- 1971. Nature et comportement des stérols "libres" et estérifiés, au cours de la germination de divers types de semences. Hypothèses sur le rôle de ces substances chez le végétal. — *Physiol. Vég.* 9: 373—399.
- EVANS F. J. 1972. The composition of phytosterols in first and second year *Digitalis purpurea*. — *J. Pharm. Pharmac.* 24: 645—650.
- & COWLEY P. S. 1973. Incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ into cardenolide and sapogenin steroids of *Digitalis purpurea*. — *Phytochemistry* 12: 791—794.
- GRUNWALD C. 1975a. Phytosterols in tobacco leaves at various stages of physiological maturity. — *Phytochemistry* 14: 79—82.
- 1975b. Plant sterols. — *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 209—236.
- 1980. Steroids. — In: BELL E. A. & CHARLWOOD B. V. (Eds.), *Secondary plant products*, p. 221—256. — Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- LEVITT J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. II. 2nd Edition. — Academic Press New York.
- LÜTTGE U., BALL E. & GREENWAY H. 1977. Effects of water and turgor potential on malate efflux from leaf slices of *Kalanchoe daigremontiana*. — *Plant Physiol.* 60: 521—523.
- RUBINSTEIN B., MAHAR B. & TATTAR T. A. 1977. Effects of osmotic shock on some membrane-regulated events of oat coleoptile cells. — *Plant Physiol.* 59: 365—368.
- TSCHESCHE R., HOMBACH R., SCHOLTEN H. & PETERS M. 1970. Neue Beiträge zur Biogenese der Cardenolide in *Digitalis lanata*. — *Phytochemistry* 9: 1505—1515.
- WURST F. 1982. Änderungen der Lanatosid-Gehalte in *Digitalis lanata* unter Wassermangel. — *Arch. Pharm.* im Druck.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1983

Band/Volume: [23_1](#)

Autor(en)/Author(s): Wurst Friedrich, Hoch Christa, Bancher Engelbert

Artikel/Article: [Veränderungen des Phytosterolgehaltes in Digitalis lanata unter Wasserstreß. 91-99](#)