





**Acetogenine Sekundärmetabolite und ihre Produzenten:  
Physiologie und Botanik ausgewählter Vertreter der  
Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae und Nepenthaceae  
sowie von *Antidesma* (Euphorbiaceae)**

**Dissertation zur Erlangung des  
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Heiko Rischer  
aus  
Sindelfingen**

**Würzburg 2002**

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

der Dissertation

1. Prüfer: \_\_\_\_\_

2. Prüfer: \_\_\_\_\_

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1998 bis Januar 2002  
am Institut für Organische Chemie  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Bringmann danke ich  
für die Überlassung des interdisziplinären Themas  
und die dabei gewährten wissenschaftlichen Freiräume.

Teile der im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse waren bereits Gegenstand von  
Publikationen<sup>[28, 70, 169, 170, 175, 184, 185, 187, 223, 256, 310, 321]</sup> sowie von Postern und Vorträgen.



Für Kristine



<b>ALLGEMEINER TEIL</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Naphthylisochinolin-Alkaloide</b> .....	<b>6</b>
2.1 Phytochemie der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae .....	6
2.2 Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide .....	7
2.3 Volksmedizinischer Nutzen und biologische Aktivitäten .....	10
<b>3 Systematische Stellung der Ancistrocladaceae und der Dioncophyllaceae</b> .....	<b>13</b>
<b>4 Ancistrocladaceae</b> .....	<b>14</b>
4.1 Infragenerische Verwandtschaftsverhältnisse .....	15
4.2 Der ' <i>Ancistrocladus-tectorius</i> -Komplex' .....	18
4.3 Phylogenetische Untersuchungen an Vertretern der Ancistrocladaceae .....	21
4.4 Beobachtungen am Naturstandort .....	25
4.5 Screening auf dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide .....	32
4.6 <i>In-vitro</i> -Kultur ausgewählter <i>Ancistrocladus</i> -Arten .....	33
<b>5 Dioncophyllaceae</b> .....	<b>39</b>
5.1 <i>Triphyophyllum peltatum</i> .....	39
5.2 Lebenszyklus unter Kulturbedingungen .....	40
5.3 <i>In-vitro</i> -Kultur von <i>Triphyophyllum peltatum</i> .....	44
<b>6 Untersuchungen zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten aus Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen</b> .....	<b>49</b>
6.1 Biosynthese von Droseron (43) und Dioncophyllin A (4) in Kalluskulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i> .....	49
6.2 Elicitierungsversuche .....	54
6.3 Physiologische Untersuchungen mittels künstlicher Chimären .....	60
<b>7 Systeme für die Untersuchung der Bioaktivität von Sekundärmetaboliten</b> .....	<b>65</b>
7.1 Etablierung eines Tests auf allelopathische Aktivität .....	65
7.2 Hemmhofstest zur Untersuchung der antibakteriellen Aktivität .....	67
<b>8 Nepenthaceae</b> .....	<b>69</b>
8.1 Phytochemie von <i>Nepenthes</i> .....	70
8.2 Metabolite aus <i>in-vitro</i> -Kulturen von <i>Nepenthes insignis</i> .....	71
8.3 Vorstufenverfütterung <i>in vitro</i> unter Ausnutzung der Carnivorie .....	71
8.4 Praktische, physiologische und ökologische Bedeutung der Verfütterungsergebnisse	74
<b>9 Euphorbiaceae</b> .....	<b>76</b>
9.1 Die Gattung <i>Antidesma</i> : Systematik, Verbreitung und Morphologie .....	76
9.2 Phytochemie von <i>Antidesma</i> .....	77

9.3	Zur Struktur von Antidesmon	79
9.4	Kultur von <i>Antidesma membranaceum</i> und <i>A. venosum</i> für Biosyntheseuntersuchungen	80
9.5	Transformationsversuche von <i>Antidesma membranaceum</i> mit <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	83
9.6	Strukturrevision von Antidesmon	85
9.7	Biosynthese von Antidesmon	86
9.8	Biosynthetisch dem Antidesmon verwandte Naturstoffe	93
9.9	Volksmedizinischer Nutzen von <i>Antidesma</i> und Aktivität von Antidesmon in Biotests	96
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>11</b>	<b>Summary</b>	<b>105</b>
<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>		<b>111</b>
<b>1</b>	<b>Herkunft der Organismen</b>	<b>111</b>
1.1	Lebendes Pflanzenmaterial	111
1.2	Herbarmaterial	112
1.3	Agrobakterien	113
<b>2</b>	<b>Kulturbedingungen</b>	<b>114</b>
2.1	Gewächshauskultur	114
2.1.1	Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Licht	114
2.1.2	Substrate und Düngung	115
2.1.3	Schädlingsbekämpfung	115
2.2	Sterilkulturen	115
2.2.1	Allgemeine Techniken und Geräte	115
2.2.2	Temperatur und Licht	116
2.2.3	Gefäße und Kulturbedingungen	116
2.2.4	Medien	116
2.2.5	Sterilisation von Pflanzenmaterial	118
<b>3</b>	<b>Pfropfversuche</b>	<b>119</b>
<b>4</b>	<b>Filmtest</b>	<b>120</b>
<b>5</b>	<b>Transformationsversuche mit <i>Agrobacterium rhizogenes</i></b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>Hemmhoftest</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>Test auf allelopathische Wirkungen</b>	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Isolierung und Analytik von Sekundärmetaboliten</b>	<b>123</b>

---

8.1	Verwendete Geräte .....	123
8.2	Vorbereitung von Lösungsmitteln .....	124
8.3	Probenvorbereitung .....	124
8.4	Chromatographische Methoden .....	124
8.5	Isolierung von Droseron (43) aus Zellkulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i> .....	125
8.6	Isolierung von Dioncophyllin A (4) aus Zellkulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i> .....	126
8.7	Quantitative Bestimmung von Droseron (43), Plumbagin (13), Isoshinanolon (14) und Dioncophyllin A (4) in Flüssigkulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i> nach Elicitierung .....	126
8.8	Isolierung von Plumbagin (13), Rossolisid (65) und Plumbasid A (66) aus Sterilkulturen von <i>Nepenthes insignis</i> .....	128
8.9	Isolierung von Antidesmon (5) aus Zellkulturen von <i>Antidesma membranaceum</i> ..	132
8.10	Schnelltest auf dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide .....	133
<b>9</b>	<b>Fütterungsversuche mit stabilisotopenmarkierten Vorstufen</b> .....	<b>136</b>
9.1	Verfütterung an <i>Triphyophyllum peltatum</i> .....	136
9.2	Verfütterung an <i>Nepenthes insignis</i> .....	138
9.3	Verfütterung an <i>Antidesma membranaceum</i> .....	139
<b>10</b>	<b>Statistische Methoden</b> .....	<b>140</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>141</b>
	<b>LITERATUR</b> .....	<b>142</b>



---

## ALLGEMEINER TEIL

### 1 Einleitung

'Higher plants have been described as chemical factories that are capable of synthesizing unlimited numbers of highly complex and unusual chemical substances whose structures could escape the imagination of synthetic chemists forever.'<sup>[1]</sup>

Dieser Satz beschreibt das Pflanzenreich treffend als nahezu unerschöpfliche Quelle für die Auf-  
findung neuer Leitstrukturen und Wirkstoffe für die Pharma- und Pflanzenschutzforschung.  
Schon seit Anbeginn der Menschheit wurden Pflanzen nicht nur als Nahrung und Rohstoff,  
sondern auch zur Medikation genutzt.<sup>[2]</sup> Heute sind schätzungsweise 80% der Bevölkerung  
aller Entwicklungsländer, d.h. mehr als vier Milliarden Menschen, auf traditionelle Medizin, die  
wiederum zu *ca.* 85% Pflanzenextrakte benutzt, zur medizinischen Grundversorgung ange-  
wiesen.<sup>[1]</sup> Aber auch die Pharmafirmen der hochtechnisierten Länder sind von Wirkstoffen auf  
Naturstoffbasis abhängig. In bestimmten Marktsegmenten, wie z.B. bei Substanzen mit Antitumor-  
oder Antibiotikawirkung, reicht ihr Anteil bis zu 60%.<sup>[3]</sup>

Dem zugestandenem Wert der Natur als direkter Wirkstofflieferant und als Inspirationsquelle  
für deren Synthese steht eine rasante Vernichtung der Arten gegenüber. Die größte Vielfalt an  
chemischen Strukturen konnte sich als direkte Folge der Konkurrenz der Arten um Ressourcen  
und Nährstoffe dort entwickeln, wo auch die biologische Diversität am größten ist, d.h. in Kor-  
allenriffen und in den tropischen Regenwäldern. Gerade Pflanzen haben mit ihrem chemischen  
Arsenal an Sekundärmetaboliten, die im Primärstoffwechsel keinen Beitrag zum grundlegenden  
Energiehaushalt liefern,<sup>[4]</sup> äußerst effiziente ökologische Abwehrmechanismen entwickelt.  
Allerdings sind sowohl die Größenordnung der weltweiten Artenzahl als auch die Rate ihrer  
Vernichtung heftig umstritten. Schätzungen für erstere reichen auf der Grundlage 1.4 Millionen  
heute beschriebener Arten von fünf bis 50 Millionen Spezies,<sup>[5]</sup> davon *ca.* 500.000 Blüten-  
pflanzen. 20 bis 50% aller rezenten Arten könnten demnächst bereits durch den Einfluß des  
Menschen verschwunden sein.<sup>[6]</sup>

Es gibt drei hauptsächlich durchgeführte Strategien, um bioaktive Substanzen in Pflanzen zu  
entdecken. Bei allen Ansätzen sollten heute internationale Vereinbarungen beachtet werden  
(z.B. Rio-Abkommen, 1992), die die Entnahme von Pflanzenmaterial in den Ursprungsländern  
regeln, unabhängig davon, ob später daraus ein Medikament entwickelt wird oder nicht. Einige  
Länder, wie z.B. Indien, haben bereits zusätzlich nationale Gesetze verabschiedet, die einen  
'Gen-Diebstahl' verhindern sollen.<sup>[7]</sup>

Im einfachsten Fall geht man wahllos vor und durchsucht so viele Arten wie möglich in verschiedenen Tests auf spezielle Indikationen. Moderne Methoden des High Throughput Screenings (HTS) erlauben enorme Probendurchsätze. Dieser Weg wird z.B. vom National Cancer Institute (NCI) in den USA verfolgt, um neuartige Wirkprinzipien gegen Krebs aufzufinden. Die bekannteste mit dieser Methode gefundene Substanz ist das Paclitaxel (Taxol®) (1, Abb. 1), das zunächst nur aus *Taxus brevifolia* (Taxaceae), einer Eibenart aus den temperaten Regenwäldern Nordamerikas, isoliert werden konnte und zur Behandlung von Mamma- und Ovarkarzinomen eingesetzt wird. Zugleich zeigt dieses Beispiel in beeindruckender Weise, wie Wildpflanzenarten in existenzielle Bedrängnis geraten können, wenn sie die einzige Quelle für neuentdeckte und hochwirksame Wirkstoffe darstellen.<sup>[8]</sup> Sowohl *T. brevifolia* als auch später *T. wallichiana* wurden stark durch Übernutzung dezimiert, bis Taxol® schließlich ökonomisch aus Vorstufen, die auch aus anderen Eibenarten wie z.B. der einheimischen Spezies *T. baccata* zugänglich waren, semisynthetisch hergestellt werden konnte.<sup>[9]</sup>

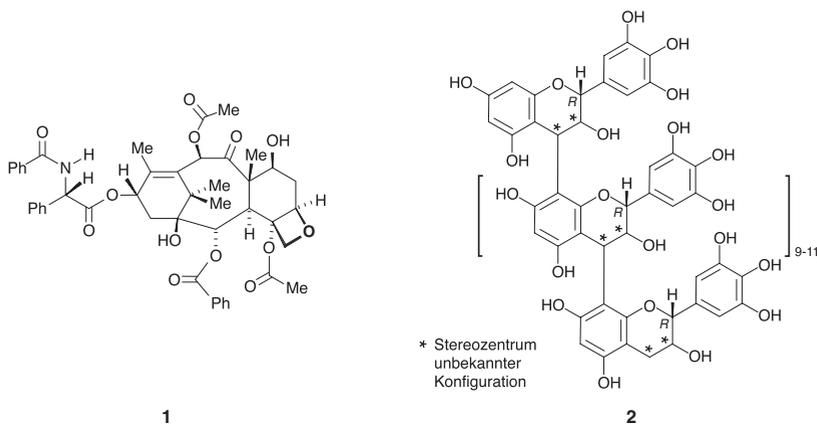


Abb. 1. Paclitaxel (1) als Beispiel für einen therapeutisch wirksamen Naturstoff, der aus einem Zufallsscreening hervorgegangen ist, und SP-303 (2) als Beispiel für ein Therapeutikum natürlichen Ursprungs, das über eine ethnobotanisch geleitete Wirkstoffsuche gefunden wurde

Eine andere Möglichkeit der Wirkstoffsuche ist das Zurückgreifen auf das meist nur mündlich überlieferte Wissen von traditionellen Heilern und Medizinern über Ethnobotaniker als Mittelsmänner. Charakteristisch für diese Vorgehensweise ist der hohe Personaleinsatz und die stark interdisziplinäre Zusammensetzung der Forschungsteams.<sup>[10]</sup> Auch mit diesem Ansatz konnten bereits Erfolge erzielt werden. Als besonders herausragendes Beispiel kann die Ver-

markung des Substanzgemisches SP-303 (2, Abb. 1) unter der Bezeichnung NSF™ durch die Firma Shaman Pharmaceuticals angeführt werden. Auf diese Mischung oligomerer Proanthocyanidine aus dem Milchsafte ('Sangre de Drago') von *Croton lechleri* (Euphorbiaceae)<sup>[11]</sup> wurden die Forscher bei ethnobotanischen Studien im Amazonasgebiet durch den dortigen traditionellen Einsatz gegen Durchfallerkrankungen aufmerksam. Das marktreife Produkt wird heute hauptsächlich bei Aids-Patienten zur Behandlung von Diarrhöe benutzt, die durch die Gabe von Protease-Inhibitoren verursacht wird. Ein zusätzlich positiver Aspekt dieser Erfolgsgeschichte ist, daß die Firmenpolitik von Shaman Pharmaceuticals ausdrücklich die Entlohnung bzw. Gewinnbeteiligung der Ureinwohner, die zur Entdeckung des pharmazeutischen Nutzens beigetragen haben, vorschreibt.<sup>[12]</sup>

Schließlich kann man sich zur Wirkstoffsuche auch auf bestimmte Verwandtschaftsgruppen im Pflanzenreich spezialisieren, aus denen bereits in der Vergangenheit aussichtsreiche Naturstoffe isoliert werden konnten. Gerade der letztere Ansatz wird häufig von Naturstoffchemikern angewandt, so auch in unserem Arbeitskreis, wo man sich seit einigen Jahren schwerpunktmäßig mit Alkaloiden aus Pflanzen des Verwandtschaftskreises der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae beschäftigt. Die ausschließlich für diese beiden Pflanzenfamilien charakteristischen Naphthylisochinolin-Alkaloide (vgl. Kap. 2) waren bereits aussichtsreiche Kandidaten für die Wirkstoffforschung,<sup>[13]</sup> als mit der Entdeckung der antiviralen Aktivität der Michellamine (Abb. 2), die dimere Naphthylisochinoline darstellen, die Forschung an Schub gewann. Extrakte einer zunächst mit *Ancistrocladus abbreviatus* verwechselten afrikanischen Art, die später unter dem Namen *A. korupensis* beschrieben wurde,<sup>[14]</sup> zeigten eine besonders hohe Anti-HIV-Aktivität.<sup>[15, 16]</sup> Als Wirkmechanismus wurde neben der antioxidativen Aktivität<sup>[17]</sup> auch eine Inhibierung von Proteinkinase C<sup>[18]</sup> und HIV Reverse Transkriptase<sup>[19]</sup> beschrieben. Obwohl die weitere klinische Testung der Substanzen mittlerweile wegen potentieller neurotoxischer Effekte fraglich geworden ist,<sup>[20]</sup> hat die verstärkte Nachfrage nach Pflanzenmaterial den Druck auf diese endemische Art, trotz deren Vorkommen in einem Nationalpark, erhöht. Aus diesem Grund wurden rechtzeitig Programme gestartet, die auf eine nachhaltige Produktion von Pflanzenmaterial vor Ort<sup>[21]</sup> unter Einbeziehung der lokalen Bevölkerung<sup>[22]</sup> abzielten. In diesem Zuge wurden auch erstmals biologische Studien an den Pflanzen durchgeführt,<sup>[23, 24]</sup> so daß *A. korupensis* mittlerweile sowohl die chemisch als auch biologisch bestuntersuchte *Ancistrocladus*-Art darstellt. Andere *Ancistrocladus*-Arten und gerade auch das seltene *Triphyphyllum peltatum* (Dioncophyllaceae), das eine große Vielfalt an Naphthylisochinolin-Alkaloiden produziert,<sup>[25]</sup> wie z.B. Dioncophyllin A (4, Abb. 2), mit teilweise hochinteressanten biologischen Wirkungen, wurden im natürlichen Habitat weit weniger umfangreich untersucht. Insbesondere lassen spezielle Strukturmerkmale

der Naphthylisochinoline, wie die Methylsubstituenten an C-1 und C-6 sowie das *meta*-Dioxygenierungsmuster an C-6 und C-8 vieler Vertreter, auf eine acetogenine Biosynthese schließen.<sup>[26]</sup> Ein Beweis dieser Hypothese würde den Naphthylisochinolin-Alkaloide eine weitere Sonderrolle innerhalb der sonst ausschließlich aus Aminosäuren gebildeten Isochinoline zuweisen.<sup>[27]</sup> Experimentell sind Biosyntheseuntersuchungen am aussichtsreichsten mit kultivierten Pflanzen durchzuführen, die unter streng kontrollierten Bedingungen heranwachsen – am besten in Sterilkulturen. Allein die Schaffung dieser Vorbedingungen stellte bei den schwer erhältlichen und schwierig zu kultivierenden *Ancistrocladaceen* und *Dioncophyllaceen* eine große Herausforderung dar. Möglicherweise entstehen viele weitere Naturstoffe auch unverwandter Pflanzen auf ähnliche Weise aus Acetat. Antidesmon (**5**, Abb. 2) aus der *Euphorbiacee* *Antidesma membranaceum* weist bestimmte Strukturelemente auf, wie z.B. eine lange aliphatische Seitenkette, die ebenfalls eine acetogenine Herkunft wahrscheinlich erscheinen lassen. Auch die Biosynthese dieser antiparasitär<sup>[28]</sup> wirksamen Substanz wurde bisher nicht untersucht.

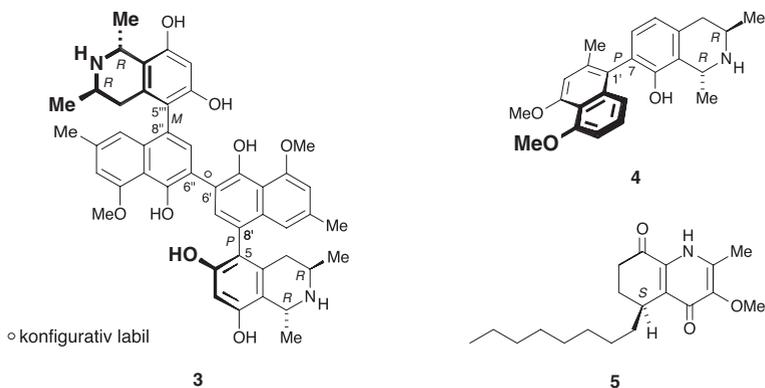


Abb. 2. Michellamin B (**3**), Dioncophyllin A (**4**) und Antidesmon (**5**) als Beispiele für potentiell acetogenine Alkaloide mit interessanten Bioaktivitäten aus den Familien *Ancistrocladaceae*, *Dioncophyllaceae* und *Euphorbiaceae*

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich schwerpunktmäßig folgende Aufgabenstellungen:

- Auffinden von wenig oder gar nicht untersuchten *Ancistrocladus*-Arten in einigen Ursprungsländern und Beobachtung der Pflanzen im natürlichen Habitat;
- Kultur von Lebendmaterial im Gewächshaus und *in vitro* für Erhaltungszwecke;
- Ausarbeitung von Zellkulturtechniken für *Ancistrocladaceen* und *Dioncophyllaceen* zur Biosyntheseforschung an Naphthylisochinolin-Alkaloide und deren stickstofffreien Vorstufen-

derivaten mittels Stabilisotopenmarkierung und NMR-Analyse;

- Screening von *Ancistrocladus*-Proben auf dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide;
- Etablierung weiterer Arten (*Antidesma membranaceum* und *Nepenthes insignis*) mit potentiell acetogeninen Sekundärmetaboliten, wie Antidesmon (**5**), *in vitro* und Untersuchung der Biosynthese ihrer Inhaltsstoffe.

## 2 Naphthylisochinolin-Alkaloide

### 2.1 Phytochemie der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae

Die Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen sind phytochemisch gleichermaßen durch Inhaltsstoffe aus der Alkaloid-Klasse der Naphthylisochinoline<sup>[26]</sup> charakterisiert, die in der Natur ausschließlich in diesen beiden Pflanzenfamilien zu finden sind. Ancistrocladin (**6**, Abb. 3) war der erste Vertreter, der bereits 1970 aus *Ancistrocladus heyneanus* isoliert werden konnte.<sup>[29]</sup> Aus *Triphyophyllum peltatum* wurde dann 1976 Triphyophyllin isoliert,<sup>[30]</sup> das aufgrund widersprüchlicher Angaben in der Publikation allerdings später in Dioncophyllin A (**4**, Abb. 3) umbenannt wurde, nachdem die genaue Stereostruktur aufgeklärt worden war.<sup>[31]</sup> Mittlerweile sind insgesamt mehr als 90 natürliche Vertreter dieses Typs bekannt geworden, davon allein ca. 18 aus *Triphyophyllum*<sup>[25]</sup> Diese Naturstoffe belegen deutlich die strukturelle Vielfalt innerhalb der noch jungen Klasse der Naphthylisochinolin-Alkaloide, die auf folgenden molekularen Eigenschaften beruht:

- Kupplungstypen: Der Naphthalin- und der Isochinolinteil des Moleküls kann auf verschiedene Weise miteinander verknüpft sein (5,1', 5,8', 7,1', 7,3', 7,6' und 7,8' sind bisher gefunden worden).
- Stereoelemente: Die Biarylachse ist aufgrund sterischer Hinderung durch *ortho*-Substituenten in vielen Fällen nicht frei drehbar. Daraus resultieren Atropisomere, die *P*- oder *M*-konfiguriert sind. Im Tetrahydroisochinolin-Teil kann an 1- und 3-Position jeweils *R*- oder *S*-Konfiguration verwirklicht sein.
- O-Methylierung: Das *O*-Methylierungsmuster an den verschiedenen Positionen (z.T. auch eine *O*-Glycosylierung) kann die Strukturvielfalt weiter erhöhen.
- Dehydrierung: Im Isochinolinteil können unterschiedliche Dehydrierungsgrade vorkommen.
- Oxygenierung: Die Positionen C-4 und 2'-Methyl sind in einigen Fällen oxygeniert.
- Dimerisierung: Zwei Naphthylisochinoline können über eine weitere Achse verbunden sein (Dehydrodimerisierung), wie z.B. im Michellamin A (**7**, Abb. 3).

Desweiteren wurden Derivate der Naphthalin-<sup>[32-37]</sup> und der Isochinolinhälften<sup>[34, 38-40]</sup> unverknüpft in Ancistrocladaceen gefunden. Aus Dioncophyllaceen wurden ebenfalls freie Naphthalinderivate<sup>[30, 41]</sup> als auch Isochinoline<sup>[42]</sup> isoliert.

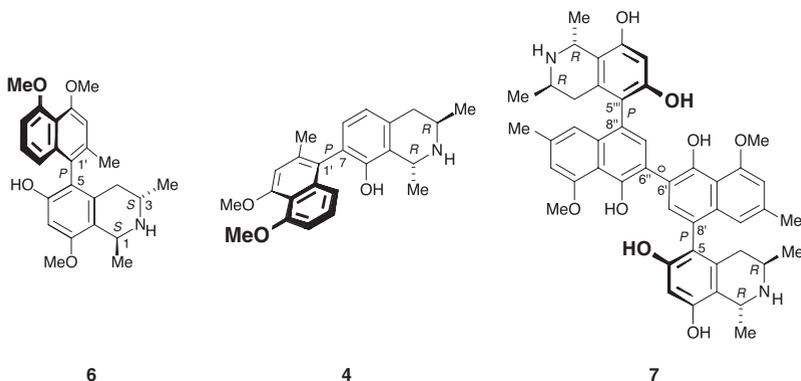
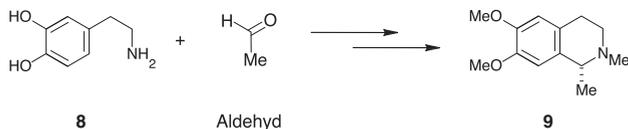


Abb. 3. Strukturbeispiele für Naphthylisochinolin-Alkaloide

## 2.2 Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide

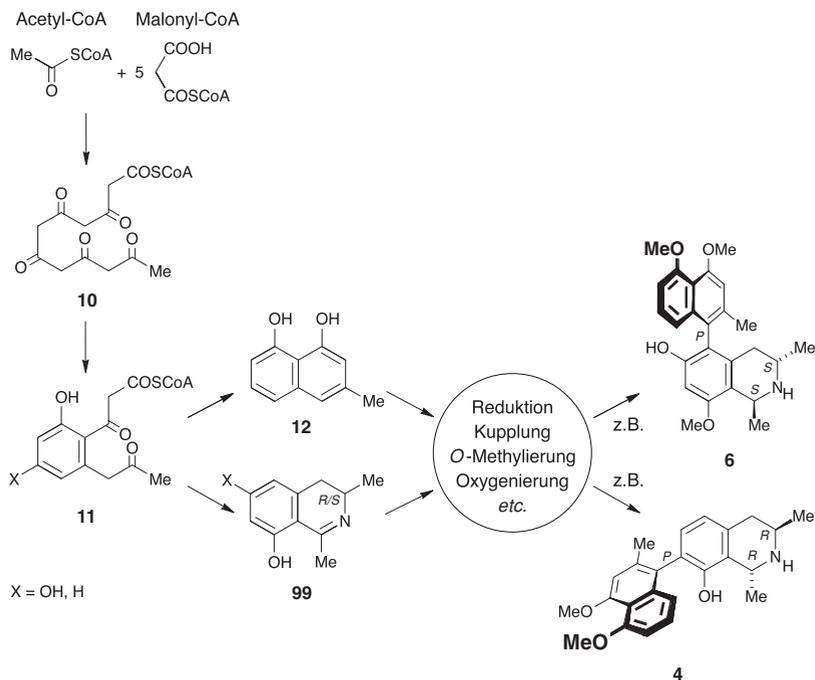
Insgesamt sind über 2500 Tetrahydroisochinolin-Alkaloide bekannt.<sup>[27]</sup> Sie stellen somit die größte Gruppe innerhalb der Alkaloide dar.<sup>[43]</sup> Ursprünglich nahm man an, daß generell alle Tetrahydroisochinoline aus den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin oder Tyrosin hervorgehen.<sup>[44]</sup> Die Pictet-Spengler-Reaktion<sup>[45]</sup> einer funktionalisierten Aminokomponente wie Dopamin (**8**) mit einem Aldehyd ist der Schlüsselschritt dieser Biosynthese (Schema 1).



Schema 1. Bildung von (-)-Pelletin (**9**),<sup>[46, 47]</sup> einem typischen Vertreter der Tetrahydroisochinoline, aus Dopamin (**8**)

Obleich das ungewöhnliche *meta*-Oxygenierungsmuster und die Anordnung der Methylsubstituenten der Naphthylisochinolin-Alkaloide, sowie auch einiger Isochinolone,<sup>[48, 49]</sup> nicht ohne weiteres in dieses Schema paßt, wurde erst 1977 eine alternative Biogenese vorgeschlagen,<sup>[50]</sup> im Jahre 1982 genauer ausformuliert<sup>[51]</sup> und durch biomimetische Synthesen der entsprechenden Naphthalin- und Isochinolinbausteine plausibilisiert.<sup>[52-54]</sup> 'Biogenese' bezeichnet die hypothetische Spekulation über Vorläufer-Produkt-Beziehungen und sollte daher begrifflich von 'Biosynthese', welche die experimentelle Untersuchung der Bildung von Sekundärmetaboliten meint, unterschieden werden.<sup>[55]</sup>

Die postulierte Biogenese der Naphthylisochinoline besagt, daß sowohl der Naphthalin- als auch der Isochinolinenteil aus einem gemeinsamen, vermutlich enzymgebundenen, Diketonvorläufer **11** durch direkte Cyclisierung bzw. reduktive Aminierung hervorgehen (Schema 2). Das Diketon **11** wiederum entsteht danach aus einem intermediär gebildeten  $\beta$ -Polyketid (**10**), welches aus Essigsäure-Einheiten aufgebaut wird. Die Grundlage für diese Hypothese liefert das Polyketid-konzept, das von Birch<sup>[56]</sup> maßgeblich entwickelt wurde. Den Begriff 'Polyketid' prägte Collie bereits 1893,<sup>[57]</sup> und er vermutete damals schon, daß seine Cyclisierungsexperimente von Polyketosäuren zu Aromaten Modellreaktionen für viele Naturstoffe sein könnten<sup>[58]</sup> – heute anerkanntes Lehrbuchwissen.<sup>[59]</sup>



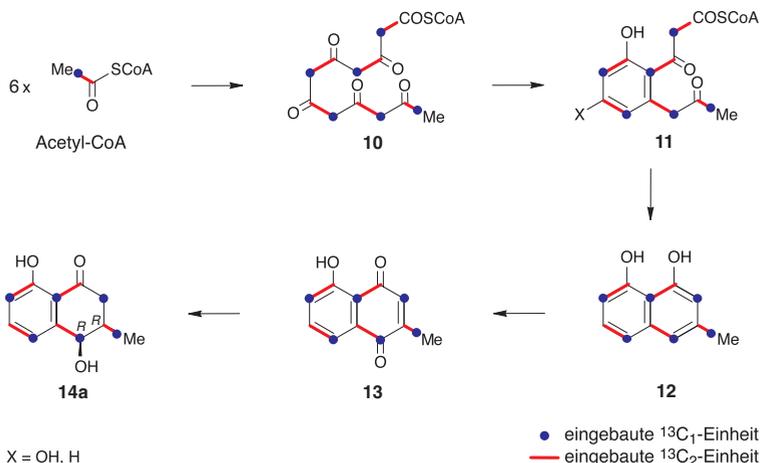
Schema 2. Postulierte Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide

Experimentelle Untersuchungen zur Biosynthese der Naphthylisochinoline wurden in der Vergangenheit zunächst mit Ganzpflanzen durchgeführt. An *Ancistrocladus hamatus* wurden mittels der Dochtmethode [1-<sup>14</sup>C]- und [2-<sup>14</sup>C]-Acetat verabreicht.<sup>[13]</sup> Es konnte zwar eine Aufnahme des radioaktiven Materials beobachtet werden, jedoch hauptsächlich in die oberirdischen Organe, so daß die aus der Wurzelrinde extrahierten Alkaloide nur sehr geringe Einbautraten von

ca. 0.011% aufwiesen. Einbauraten von bis zu 0.006% wurden bei der Verfütterung von [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Natriumacetat und [ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Natriummalonat über eine Kanüle an *A. heyneanus*-Pflanzen, die in einem Klimaschrank kultiviert wurden, erhalten.<sup>[35]</sup> Zur Kontrolle verfüttertes L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Phenylalanin ergab nur eine um den Faktor 100 geringere Einbaurate und bestätigte somit die Theorie, daß es sich dabei nicht um einen spezifischen Vorläufer handelt. Jedoch konnten auch in weiteren Versuchen, bei denen man [ $2,3\text{-}^{13}\text{C}_2$ ]-Natriumpyruvat<sup>[60]</sup> oder speziell synthetisierte Diketone in  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierter Form<sup>[60-62]</sup> an *A. heyneanus* in Hydrokultur<sup>[63]</sup> verabreichte, keine aussagekräftigeren Ergebnisse erzielt werden.

Ein weiterer, ganz anderer Versuch wurde mit der Verfütterung von (L)-[ $^{13}\text{C}_2$ ]-Alanin an die carnivoren Drüsenblätter (vgl. Kap. 5) von *Triphyophyllum peltatum* am Naturstandort gemacht.<sup>[64]</sup> Unter Ausnutzung der Carnivorie<sup>[65]</sup> konnte eine Aufnahme des Alanins in die Blätter nachgewiesen werden, aber markierte Sekundärmetabolite konnten ebenfalls nicht detektiert werden.<sup>[66, 67]</sup>

Erst die Abkehr vom Ganzpflanzen-System und die Nutzung von Kalluskulturen brachte einen wesentlichen Fortschritt. Zwar wurden auch hier  $^{13}\text{C}$ -markierte Diketonvorstufen von *A. heyneanus*-Kalluskulturen nicht eingebaut,<sup>[68]</sup> vermutlich weil diese in der Zelle nur enzymgekoppelt an Polyketidsynthese (PKS) vorliegen,<sup>[69]</sup> Plumbagin (**13**) und Isoshinanolon (**14**) zeigten jedoch nach Fütterung mit [ $^{13}\text{C}_2$ ]-Acetat ein für Polyketide charakteristisches Einbaumuster aus ganzen Acetateinheiten<sup>[70]</sup> (Schema 3).



Schema 3. Biosynthese von Plumbagin (**13**) und Isoshinanolon (**14**) in *A. heyneanus*

Da die Metabolite als Vorläuferderivate der Naphthylisochinoline aufgefaßt werden können und aus diesem Versuch auch das Faltungsmuster des intermediären Polyketids hervorgeht, kann das Ergebnis als weitere Bestätigung der Hypothese einer acetogeninen Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide gewertet werden. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit Fütterungsexperimenten zur Biosynthese von Plumbagin (**13**), die bereits früher mit Droseraceen und Plumbaginaceen durchgeführt worden waren.<sup>[71, 72]</sup>

### 2.3 Volksmedizinischer Nutzen und biologische Aktivitäten

In ihren Ursprungsländern werden einzelne Arten der Ancistrocladaceae und der Dioncophyllaceae auf vielfältige Weise von der Landbevölkerung genutzt. Prominentestes und gleichzeitig ältestes Beispiel ist das Abdecken von Häusern und Booten mit den sehr witterungsbeständigen Blättern von *Ancistrocladus tectorius*, was Loureiro bereits 1790 dazu veranlaßte, die Pflanze zunächst mit dem Namen *Bembix tectoria* (von lat. *Tectum* = Dach) zu belegen.<sup>[73]</sup> Die lianenförmigen Sprosse von *Habropetalum dawei* und *Triphyphyllum peltatum* werden als haltbare Seile genutzt,<sup>[74]</sup> während auf den Andamanen das harte Holz von *Ancistrocladus extensus* zur Herstellung von Pfeilen dient.<sup>[75]</sup> Neben der Nutzung von Pflanzenteilen als Gebrauchsgegenstände werden diese auch direkt aufgrund ihrer Inhaltsstoffe volksmedizinisch oder zur Jagd benutzt (Tabelle 1).

Tab. 1. Traditionelle medizinische und jagdliche Nutzung der Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen

Familie	Art	Pflanzenteil	Anwendung	Literatur
Ancistrocladaceae	<i>Ancistrocladus abbreviatus</i> Airy Shaw	Oberirdische Teile	bei Masern, Fieber	[76]
	<i>Ancistrocladus hamatus</i> (Vahl) Gilg	Rinde, Blätter	als Froschgift	[77]
	<i>Ancistrocladus</i> spec.	Wurzeln	bei Unterleibsschmerzen	[78]
	<i>Ancistrocladus tectorius</i> (Loureiro) Merrill	Junge Pflanzen	als Gewürz	[79]
	<i>Ancistrocladus tectorius</i> (Loureiro) Merrill	Wurzeln	bei Dysenterie, Malaria	[79]
Dioncophyllaceae	<i>Dioncophyllum thollonii</i> Baillon	Blätter	als Aphrodisiacum, bei Altersschwäche, Alkoholabusus	[80, 379, 41]
	<i>Dioncophyllum thollonii</i> Baillon	Wurzeln	bei Nierenschmerzen, Lepraflecken	[80, 379, 41]

<i>Habropetalum dawei</i> (Hutch. et Dalz.) Airy Shaw	Junge Blätter	als Fischgift	[74, 81]
<i>Habropetalum dawei</i> (Hutch. et Dalz.) Airy Shaw	Junge Blätter	gg. Sandflöhe	[74]
<i>Triphyophyllum peltatum</i> (Hutch. et Dalz.) Airy Shaw	Wurzeln	als Abführmittel	[74]

Mit modernen wissenschaftlichen Methoden konnten experimentell bei den Extrakten und Reinsubstanzen eine Reihe von Bioaktivitäten festgestellt werden, die einen Teil der empirisch ermittelten Naturheilverfahren stützen:

- spasmolytische Aktivität,[82]
- antivirale Aktivität gegen HIV,[15, 16, 83, 84]
- antiplasmodiale Wirkung *in vitro*,[84-86] und *in vivo*,[87]
- antileishmaniale Wirkung *in vitro*,[88]
- molluskizide Aktivität,[89, 90]
- larvizide Aktivität,[91]
- insektizide Aktivität,[92-95]
- fungizide Aktivität.[96]

Besonders hervorzuheben sind die ausgeprägten antiplasmodialen Wirkungen einiger Naphthylisochinolin-Alkaloide. Diese Substanzen gelten daher als Leitstrukturen für neue antiparasitäre Wirkstoffe (Abb. 4). Aufgrund der beschriebenen Vielfalt der bereits bekannten und noch zu erwartenden Strukturen der Naphthylisochinoline ist auch zukünftig mit dem Auffinden weiterer Bioaktivitäten zu rechnen.

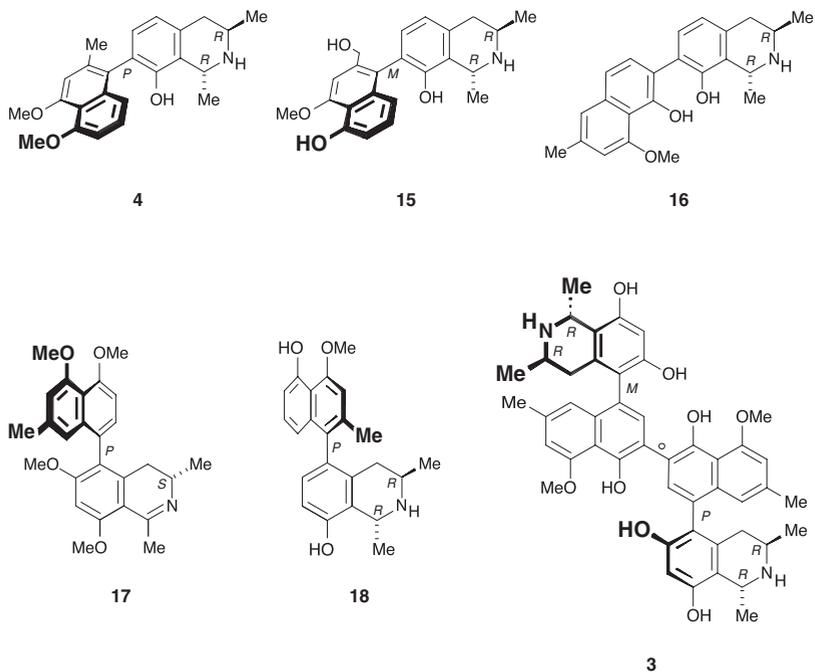


Abb. 4. Naphthylisochinolin-Alkaloide als potente Wirkstoffe: Dioncophyllin A (**4**), Dioncopeltin A (**15**) und Dioncophyllin C (**18**) mit antiplasmodialer sowie Dioncophyllin B (**16**) mit fungizider Wirkung aus *Triphyophyllum peltatum*; Ancistrocalin A (**17**) mit antileishmanialer Wirkung aus *Ancistrocladus ealaensis*; Michellamin B (**3**) mit antiviraler Wirkung aus *A. korupensis*

### 3 Systematische Stellung der Ancistrocladaceae und der Dioncophyllaceae

Die enge systematische Verwandtschaft der Familien Ancistrocladaceae und der Dioncophyllaceae gilt erst seit jüngster Zeit als gesichert, nachdem molekulargenetische Befunde<sup>[97, 98, 99]</sup> frühere anatomische<sup>[100, 101, 102, 103]</sup> und palynologische<sup>[104]</sup> Untersuchungen bestätigten. Lange Zeit waren die Positionen der beiden Familien unklar. Man ordnete die Ancistrocladaceae zunächst nacheinander in die Malpigiaceae,<sup>[105]</sup> Combretaceae,<sup>[106]</sup> Dipterocarpaceae<sup>[107]</sup> und Pittosporaceae,<sup>[108]</sup> später in die Linaceae,<sup>[109]</sup> Parietales,<sup>[110]</sup> und schließlich in die Ochnales,<sup>[111]</sup> Violales,<sup>[112]</sup> Theales<sup>[113]</sup> und Theanae<sup>[114]</sup> ein. Die Dioncophyllaceae wurden in die Nähe der Bixaceae und Passifloraceae gestellt,<sup>[115]</sup> und den Flacourtiaceae<sup>[116]</sup> zugeordnet. Heute wird den Familien ein benachbarter Platz (Abb. 5) innerhalb der Caryophyllidae *sensu lato* zugewiesen<sup>[117]</sup>. Nächstverwandt sind demnach die Drosophyllaceae, Nepenthaceae (vgl. Kap. 8), Droseraceae, Plumbaginaceae, Polygonaceae, Tamaricaceae und Frankeniaceae. Besonders auffallend ist hierbei der hohe Anteil an Familien mit carnivoren Arten. Zusätzlich gestützt wird die Anordnung durch phytochemische Befunde (vgl. Kap. 2.1).<sup>[118, 119]</sup>

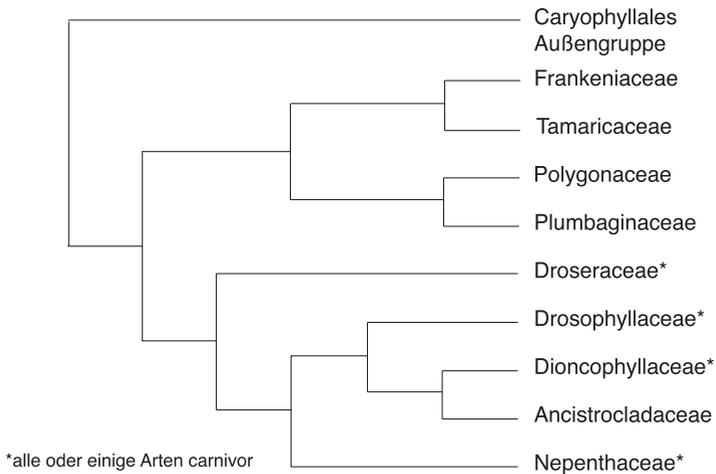


Abb. 5. Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Caryophyllidae *s. l.*

#### 4 Ancistrocladaceae

Die monogenerische Familie der Ancistrocladaceae enthält nur die Gattung *Ancistrocladus* (frühere Synonyme: *Bembix*,<sup>[73]</sup> *Wormia*<sup>[120]</sup> und *Bigamea*<sup>[106]</sup>) mit gegenwärtig 30 beschriebenen Arten (vgl. Tab. 2, Tab. 3 und Anmerkungen). In ihrer Verbreitung sind die Arten auf die Paläotropis beschränkt. *Ancistrocladus*-Pflanzen sind durchweg verholzende Lianen, die über 20 m hoch an anderen Pflanzen emporklettern können. Als Kletterhilfe bilden sie uhrfederartige Ranken (vgl. griech. *Ankistron* = Haken, *Klados* = Ast), die jeweils einem Sproßabschluß entsprechen (Abb. 6A).

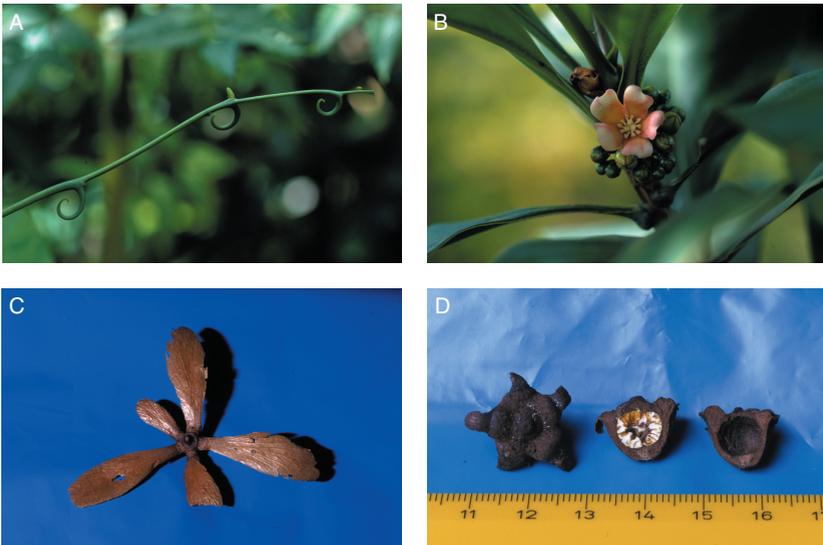


Abb. 6. *A. abbreviatus*: Hakenast (A); Blüte und Infloreszenz (B); *A. aff. tectorius*: geflügelter Same (C); *A. congolensis*: ungeflügelter Same, Samenquerschnitte (D); Skala in [cm]

Daraus ergibt sich ein auffälliges sympodiales Verzweigungssystem.<sup>[121, 122]</sup> Die Blätter sind durch eingesenkte vielzellige Drüsen unbekannter Funktion charakterisiert. Während Jungpflanzen und der Haupttrieb nur wenige wechselständige Blätter tragen, trifft man bei älteren Exemplaren diese oft rosettig gedrängt in Kurztrieben an. Bei adulten Pflanzen finden sich hier auch die zymösen Infloreszenzen.<sup>[123]</sup> Die fünf Petalen sind weißlich bis leuchtend rot gefärbt. Meist sind zehn z.T. aber auch nur fünf<sup>[124]</sup> oder bis zu 15<sup>[125]</sup> Stamina mit introrsen Antheren vorhanden, deren Filamente an der Basis verbreitert und mit den Petalen verwachsen sind (Abb. 6B). Das Ovar ist mittelständig mit ursprünglich drei, davon zwei abortierenden basalen

Samenanlage.<sup>[126]</sup> Die drei Griffel sind frei. Bei der Samenreife bilden sich die fünf verwachsenen Sepalen bei vielen Arten ungleich aus und dienen als Flügel der Ausbreitung der Samen (Abb. 6C), während sich bei anderen Arten die Sepalen fast gar nicht vergrößern und stattdessen ein verkorktes Hypanthium für Auftrieb bei der Verbreitung im Wasser sorgt (Abb. 6D). Der Embryo ist immer von gefurchtem, stärkehaltigem Endosperm umgeben (Abb. 6D),<sup>[127]</sup> welches den cryptocotylären Keimling noch längere Zeit ernährt.

#### 4.1 Infragenerische Verwandtschaftsverhältnisse

Obwohl die systematische Stellung der Ancistrocladaceae im System der Angiospermen heute als gesichert angesehen werden kann (vgl. Kap. 3), so fehlt doch eine umfassende taxonomische Behandlung der Familie. Die Bestimmung der Arten wird dadurch erschwert, daß die Blätter ein- und desselben Individuums erhebliche Variabilität aufweisen. Bei unverzweigten Jungpflanzen und an Langtrieben finden sich keil- bis lanzettförmige Blätter, während die Rosetten der Kurztriebe insbesondere in der Nähe von Infloreszenzen verkehrt eiförmige Blätter tragen. Erschwerend kommt noch hinzu, daß eine Unterscheidung anhand der Blüten, die prinzipiell möglich ist, daran scheitert, daß viele Typusexemplare steril sind. Gereau hat die existierenden Artnamen zusammengestellt und typifiziert,<sup>[128]</sup> jedoch wurden *A. stelligerus* Wallich *ex* A. DC.<sup>[129]</sup> sowie zwei mittlerweile neu beschriebene Arten, *A. grandiflorus* Cheek<sup>[130]</sup> und *A. tanzaniensis* Cheek & Frimodt-Møller,<sup>[131]</sup> dabei nicht berücksichtigt.

Für die morphologisch etwas besser unterscheidbaren afrikanischen Arten ist die Situation leichter überschaubar, und mittlerweile wurde sogar ein Bestimmungsschlüssel veröffentlicht, der allerdings ebenfalls notgedrungen auf unvollständigen Herbarexemplaren beruht.<sup>[130]</sup> Die Mehrzahl der Arten ist in Zentral- und Westafrika ('guineo-congolesisch') verbreitet,<sup>[132]</sup> mit den Ausnahmen *A. robertsoniorum* und *A. tanzaniensis*, die in Küstenwäldern Ostafrikas vorkommen. Tabelle 2 umfaßt alle bis heute aus Afrika beschriebenen *Ancistrocladus*-Arten inklusive der jeweiligen Typusexemplare.

Tab. 2. Beschriebene Ancistrocladaceen aus Afrika

Art	Autor	Typus/Herbarium	Locus classicus	Bemerkungen
<i>Ancistrocladus abbreviatus</i>	Airy Shaw <sup>[134]</sup>	Deighton 2589/K	Sierra Leone, Njala	
<i>Ancistrocladus barteri</i>	Scott Elliot <sup>[135]</sup>	Scott Elliot 4860/K	Sierra Leone, Mount Gonkwi, Duunia Talla Hills	

<i>Ancistrocladus congolensis</i>	J. Léonard <sup>[136]</sup>	Louis 11171/BR	Zaire, Forestier Central, Env. Yangambi, Yafunga	
<i>Ancistrocladus ealaensis</i>	J. Léonard <sup>[136]</sup>	Léonard 1057/BR	Zaire, Forestier Central, Env. Eala, Riv. Yuli	
<i>Ancistrocladus grandiflorus</i>	Cheek <sup>[130]</sup>	Cheek & P. Ndumbe 3915/K	SW Cameroon, near Limbe, Mabeta-Moliwe forest	Syn. <i>A. abbreviatus?</i>
<i>Ancistrocladus guineensis</i>	Oliver <sup>[137]</sup>	Mann 2234/K	Nigeria, Old Calabar	
<i>Ancistrocladus korupensis</i>	D.W. Thomas & Gereau <sup>[14]</sup>	Gereau, Thomas, Namata & Jato 5180/MO	Cameroon, SW Province, Ndian Division, 0.6 km E confluence of Mededibe (Moliba) and Ndian (Mana) Rivers	
<i>Ancistrocladus letestui</i>	Pellegrin <sup>[138]</sup>	Le Testu 8627/P	Gabon, region de Latoursville, monts Iboudji	
<i>Ancistrocladus likoko</i>	J. Léonard <sup>[136]</sup>	Léonard 1850/BR	Zaire, Forestier Centrale, Env. de Yangambi, rivière Boamba	
<i>Ancistrocladus pachyrrhachis</i>	Airy Shaw <sup>[139]</sup>	Baldwin 5839/K	Liberia, Montserrado Co., Monrovia, sandy area	
<i>Ancistrocladus robertsoniorum</i>	J. Léonard <sup>[125]</sup>	Robertson 3687/BR	Kenya, Kwale Distr., Buda Forest	
<i>Ancistrocladus tanzaniensis</i>	Cheek & Frimodt-Møller <sup>[131]</sup>	Frimodt-Møller, Ndangalasi & Jøker TZ 537/K	Tanzania, Iringa Distr., Uzungwa Scarp F. R., 35°58'E, 8°21'S, 1100 m alt.	
<i>Ancistrocladus uncinatus</i>	Hutchinson & Dalziel <sup>[140]</sup>	Talbot 3108/K	Nigeria, Southern Provinces, Eket	

Bei den asiatischen *Ancistrocladus*-Arten ist die Situation sehr unübersichtlich. Hier wurden 17 Namen verliehen (Tab. 3, Abb. 7), zwei davon, nämlich *A. pentagynus* Warburg und *A. sagittatus* Wallich ex Planchon, müssen ausgeschlossen werden, da sie fälschlich für Aufsammlungen von *Durandea*<sup>[109]</sup> bzw. *Tetramerista*<sup>[133]</sup> vergeben wurden. *A. vahlii* Arnott und *A. thwaitesii* Tieghem sind spätere Synonyme von *A. hamatus* (Vahl) Gilg, der bereits 1810 von Vahl selbst als *Wormia hamata* beschrieben worden war.<sup>[120]</sup>

Tab. 3. Beschriebene Ancistrocladaceen aus Asien

Nr.	Art	Autor	Typus/Herbarium	Locus classicus	Bemerkungen
1	<i>Ancistrocladus attenuatus</i>	Dyer <sup>[141]</sup>	Helfer 724/K	Tenasserim and Andaman Islands	
2	<i>Ancistrocladus carallioides</i>	Craib <sup>[142]</sup>	Kerr 5053/K	Nan, Doi Tiu	
3	<i>Ancistrocladus cochinchinensis</i>	Gagnepain <sup>[143]</sup>	Pierre 16/P	Binh Dinh	
4	<i>Ancistrocladus extensus</i>	Wallich ex Planchon <sup>[107]</sup>	Wall. Numer. List 152.1.1829/K	Amherst, dans le province de Martaban, Mergui	
5	<i>Ancistrocladus griffithii</i>	Planchon <sup>[107]</sup>	Griffith <i>s.n.</i> /K	Mergui	
6	<i>Ancistrocladus hainanensis</i>	Hayata <sup>[144]</sup>	Katsumata <i>s.n.</i> /?	Hainan	Syn. <i>A. tectorius</i> ?
7	<i>Ancistrocladus hamatus</i>	(Vahl) Gilg <sup>[120, 145]</sup>	Koenig <i>s.n.</i> /C	Ceylon, dans les bois de Canneliers, près de Bigamen	
8	<i>Ancistrocladus harmandii</i>	Gagnepain <sup>[143]</sup>	Harmand 989/P	Bassin de Sémoun, Prov. de Kou-kou	
9	<i>Ancistrocladus heyneanus</i>	Wallich ex J. Graham <sup>[146]</sup>	Wall. Numer. List 7262.1832/K	?	
10	<i>Ancistrocladus pentagynus</i>	Warburg <sup>[147]</sup>	-		= <i>Durandea</i> Planchon (Linaceae)
11	<i>Ancistrocladus pinangianus</i>	Wallich ex Planchon <sup>[107]</sup>	G. Porter <i>s.n.</i> /K	Penang	Syn. <i>A. tectorius</i> ?
12	<i>Ancistrocladus sagittatus</i>	Wallich ex Planchon <sup>[107]</sup>	Wall. Numer. List 1055.1829	Singapore	= <i>Tetramerista glabra</i> Miquel (Tetrameristaceae)
13	<i>Ancistrocladus stelligerus</i>	Wallich ex A. DC. <sup>[129]</sup>	Wall. Numer. List 1053/K	Prov. Martaban	
14	<i>Ancistrocladus tectorius</i>	(Loureiro) Merrill <sup>[73, 148]</sup>	Loureiro <i>s.n.</i> /BM	Vietnam	Syn. <i>Bembix tectoria</i> Loureiro
15	<i>Ancistrocladus thwaitesii</i>	Tieghem <sup>[108]</sup>	Thwaites 1600/P	Ceylon	Syn. <i>A. hamatus</i>
16	<i>Ancistrocladus vahlii</i>	Arnott <sup>[105]</sup>	Koenig <i>s.n.</i> /C	Ceylon	Syn. <i>A. hamatus</i>
17	<i>Ancistrocladus wallichii</i>	Planchon <sup>[107]</sup>	F. de Sylva <i>s.n.</i> , Wall. Numer. List 1052.2.1829/K	Pundua	

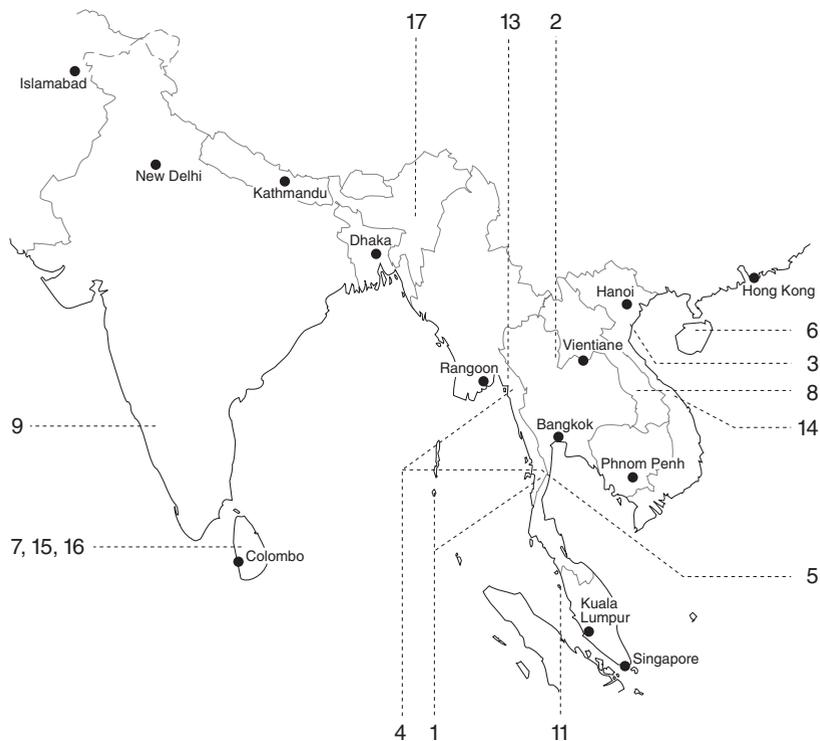
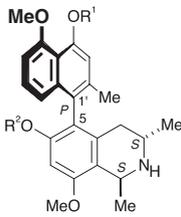


Abb. 7. *Loci classici* asiatischer Ancistrocladaceen

Von den verbleibenden 13 Arten wurden neun vor dem Jahre 1900 beschrieben, und die jüngste Beschreibung stammt aus dem Jahre 1925. In verschiedenen Floren und regionalen Abhandlungen wurden sodann nur noch die jeweiligen Namen gelistet und synonymisiert,<sup>[75, 133, 141, 148-156]</sup> ohne daß man sich näher mit den Pflanzen auseinandersetzte.

#### 4.2 Der '*Ancistrocladus-tectorius*-Komplex'

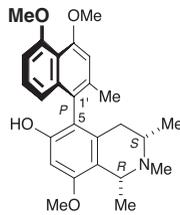
Bei der Klassifizierung von *Ancistrocladus*-Arten kommt man mit ausschließlich morphologischen Kriterien oft nur sehr mühsam voran. Neben molekulargenetischen Untersuchungen (vgl. Kap. 4.3) kann hier die phytochemische Analytik zur Bestimmung des jeweiligen Alkaloidpatterns eine wichtige Hilfestellung leisten. Gerade dieser Ansatz ließ erste Zweifel aufkommen, ob die gängige Einstufung vieler *Ancistrocladus*-Aufsammlungen als *A. tectorius* richtig ist.



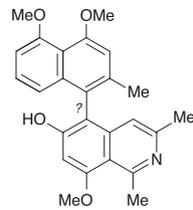
**6** R<sup>1</sup>=Me, R<sup>2</sup>=H

**19** R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H

**20** R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=Me

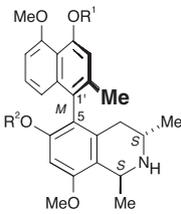


**21**



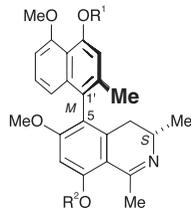
**22**

?: Konfiguration unbekannt



**23** R<sup>1</sup>=Me, R<sup>2</sup>=H

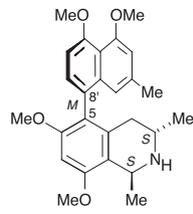
**24** R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=Me



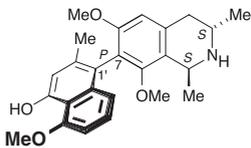
**25** R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=Me

**26** R<sup>1</sup>=Me, R<sup>2</sup>=H

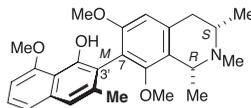
**27** R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H



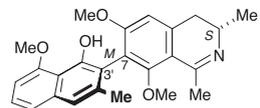
**28**



**29**



**30**



**31**

Abb. 8. Aus *A. tectorius* isolierte Naphthylisochinolin-Alkaloide: Abhängigkeit der gefundenen Strukturen vom Standort der Pflanzen in Südostasien

Vergleicht man phytochemische Isolierungsarbeiten asiatischer Ancistrocladaceae, so wird eine ausgeprägte geographische Abhängigkeit der Strukturen diverser Naphthylisochinolin-Alkaloide offenbar, obwohl in den entsprechenden Publikationen davon ausgegangen worden war, daß es sich bei der untersuchten Art ausschließlich um *A. tectorius* handle. Abhängig von der Herkunft des Pflanzenmaterials wurden von verschiedenen Forschergruppen z.T. völlig verschiedene Alkaloide isoliert (Abb. 8). So wurden nur in einer Aufsammlung von Süd-Malaysia neben den Naphthylisochinolininen auch drei 'freie', nicht an Naphthaline gekuppelte (monomere) Isochinoline gefunden, die sonst in keiner der anderen Arbeiten beschrieben wurden.<sup>[40]</sup> Ähnliche Isochinoline wie z.B. Gentrymin A<sup>[38]</sup> und B<sup>[39]</sup> oder Phyllin<sup>[42]</sup> waren bisher entweder nur aus der afrikanischen Art *A. korupensis* oder der Dioncophyllacee *Habropetalum dawei* bekannt.

Vermutlich wurden einzelne Aufsammlungen falsch als *A. tectorius* bestimmt, da sich die Verbreitungsgebiete verschiedener Arten überschneiden (vgl. Abb. 7). Möglicherweise verbirgt sich unter '*A. tectorius sensu lato*' in Wirklichkeit aber auch ein Aggregat morphologisch äußerst ähnlicher Taxa, das neben den beschriebenen zusätzlich bislang unbeschriebene Arten enthält.

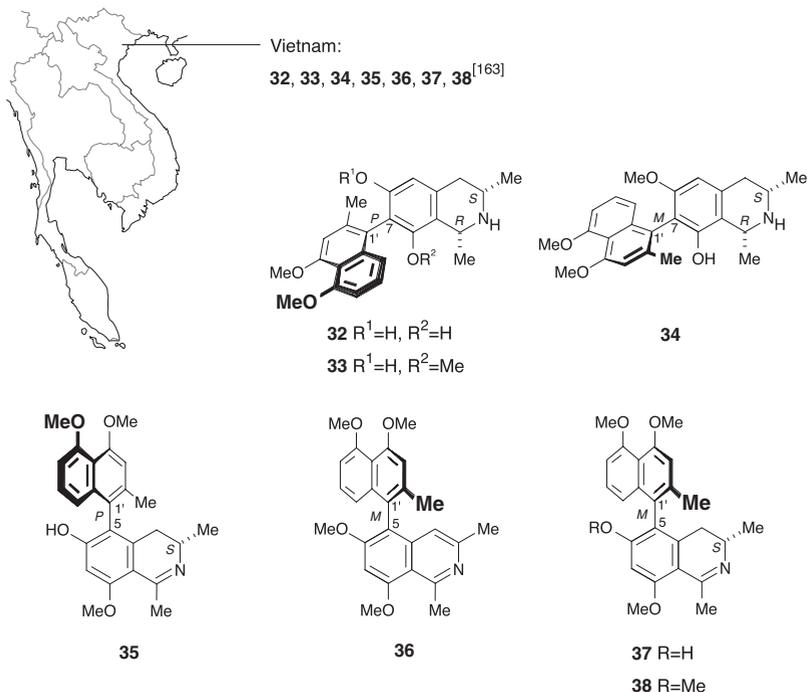


Abb. 9. Aus *A. cochinchinensis* bekannte Naphthylisochinolin-Alkaloide

Dagegen unterscheidet sich interessanterweise eine Aufsammlung von *A. cochinchinensis* vom *Locus classicus* in Nordvietnam tatsächlich auch von ihrem Alkaloidspektrum her von allen anderen *A. 'tectorius'* (Abb. 9).<sup>[163]</sup> Zudem wurden in dieser Pflanze auch eine Reihe von Naphthochinonen gefunden, die in den anderen Untersuchungen nicht aufgefallen waren.<sup>[37, 164]</sup> In diesem Fall wird die Separierung von *A. cochinchinensis* vom '*A.-tectorius*-Komplex' also auch phytochemisch gestützt.

### 4.3 Phylogenetische Untersuchungen an Vertretern der Ancistrocladaceae

Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher, der Frage nach der Artabgrenzung nachzugehen. Im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Kooperationsprojekts mit dem Titel 'Molekulare Phylogenie und Chemotaxonomie der Familie Ancistrocladaceae' unserer Arbeitsgruppe und der von Prof. Heubl wird diese Fragestellung gemeinsam bearbeitet. Im Verlauf mehrerer Sammelexkursionen nach Südostasien, geleitet von H. Meimberg (AK Heubl) und dem Verfasser dieser Arbeit (AK Bringmann), konnten bereits stichprobenhaft Aufsammlungen aus einem großen geographischen Gebiet (West-Malaysia, Thailand) gemacht werden (vgl. Abb. 10). Alle diese Proben werden derzeit mittels der analytischen 'Triade' (HPLC MS-MS/NMR/CD)<sup>[165]</sup> von Dreyer<sup>[166]</sup> auf ihr Inhaltsstoffspektrum 'gescreent'. Desweiteren wurden alle Proben auf das Vorkommen von dimeren Naphthylisochinolininen getestet (vgl. Kap. 4.5) und von Meimberg<sup>[167]</sup> phylogenetisch anhand von Sequenzanalysen eines Kern-(ITS1; 5.8S; ITS2) und eines Chloroplastenmarkers (trnK 5' Exon; Intron 1; matK, Intron 2; trnK 3' Exon) analysiert. Die Proben gruppieren sich in den mit statistischen Methoden nach dem maximalen Parsimonieprinzip (PAUP 4.0) berechneten Kladogrammen für beide Sequenzen ähnlich (Abb. 11, Abb. 12), jedoch zeigen sich unterschiedliche phylogenetische Beziehungen, die noch weiterer Untersuchung bedürfen.<sup>[167]</sup> Einbezogen in diese phylogenetischen Untersuchungen wurden auch alle zur Verfügung stehenden afrikanischen Aufsammlungen aus dem Herbarium Bringmann (HB) und von unserem Lebendmaterial aus dem Botanischen Garten Würzburg. Generell fällt auf, daß sich die morphologisch hinreichend unterscheidbaren zentralafrikanischen Arten in den untersuchten Sequenzen kaum unterscheiden, während die äußerlich sehr ähnlichen asiatischen Pflanzen in viele Gruppen aufspalten.

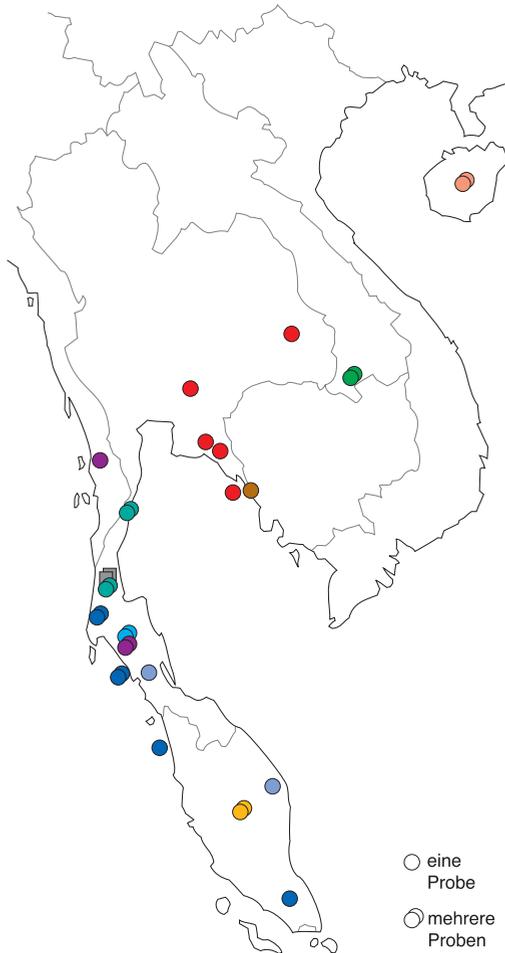


Abb. 10. Geographische Verbreitung anhand von ITS-Sequenzvergleichen ermittelter verwandtschaftlicher *Ancistrocladus*-Taxa in Südostasien

Bislang konnten bereits von allen gesammelten Proben die ITS-Sequenzen verglichen werden. Die trnK-Sequenzierung der Proben ist hingegen noch nicht abgeschlossen. Drei Äste im Kladogramm, das basierend auf den ITS-Sequenzinformationen berechnet wurde, konnten gültigen Namen zugeordnet werden, indem entsprechende Isotypen miteinander verglichen wurden. Dies ist enorm wichtig, um die Verbreitung der bereits beschriebenen Arten abschätzen zu können. Es ist daher für die Zukunft geplant, sobald die Genehmigungen der entsprechenden Herbarien vorliegen, noch mehr Isotypen zu sequenzieren.

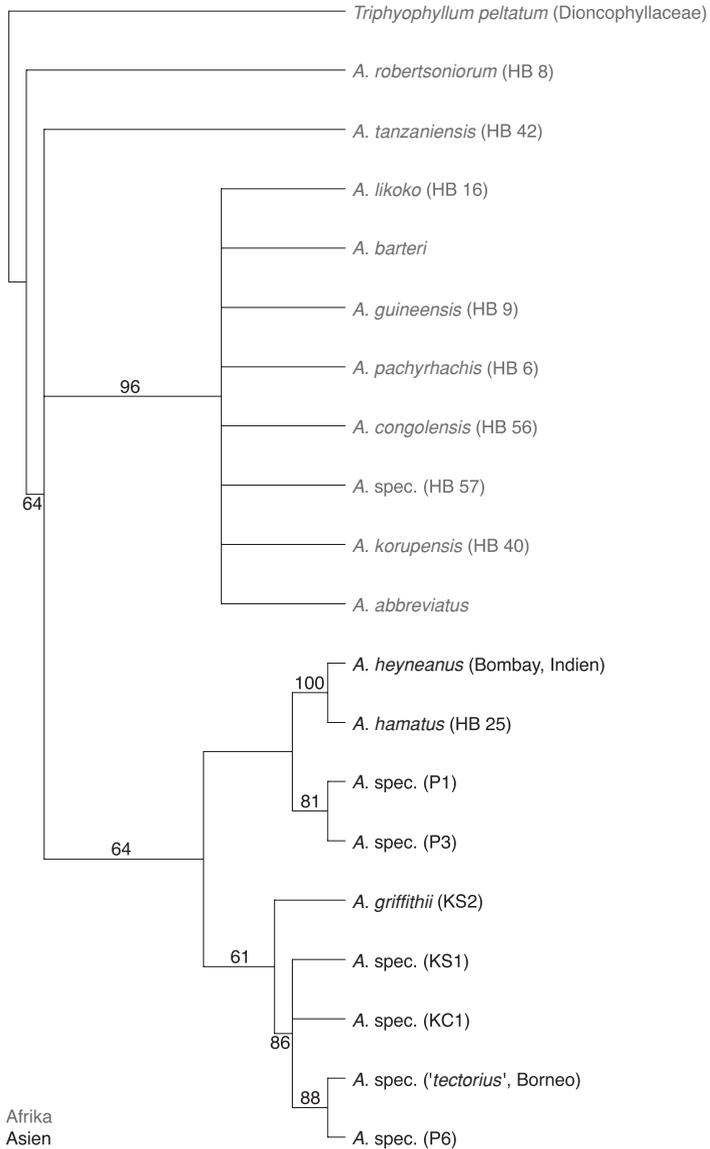


Abb. 11. Kladogramm der *Ancistrocladus*-Proben basierend auf trnK-Sequenzen (Sequenzierung und Berechnung durch H. Meimberg, Abb. mit freundlicher Genehmigung); Bezeichnung entsprechend Tab. 28, 29

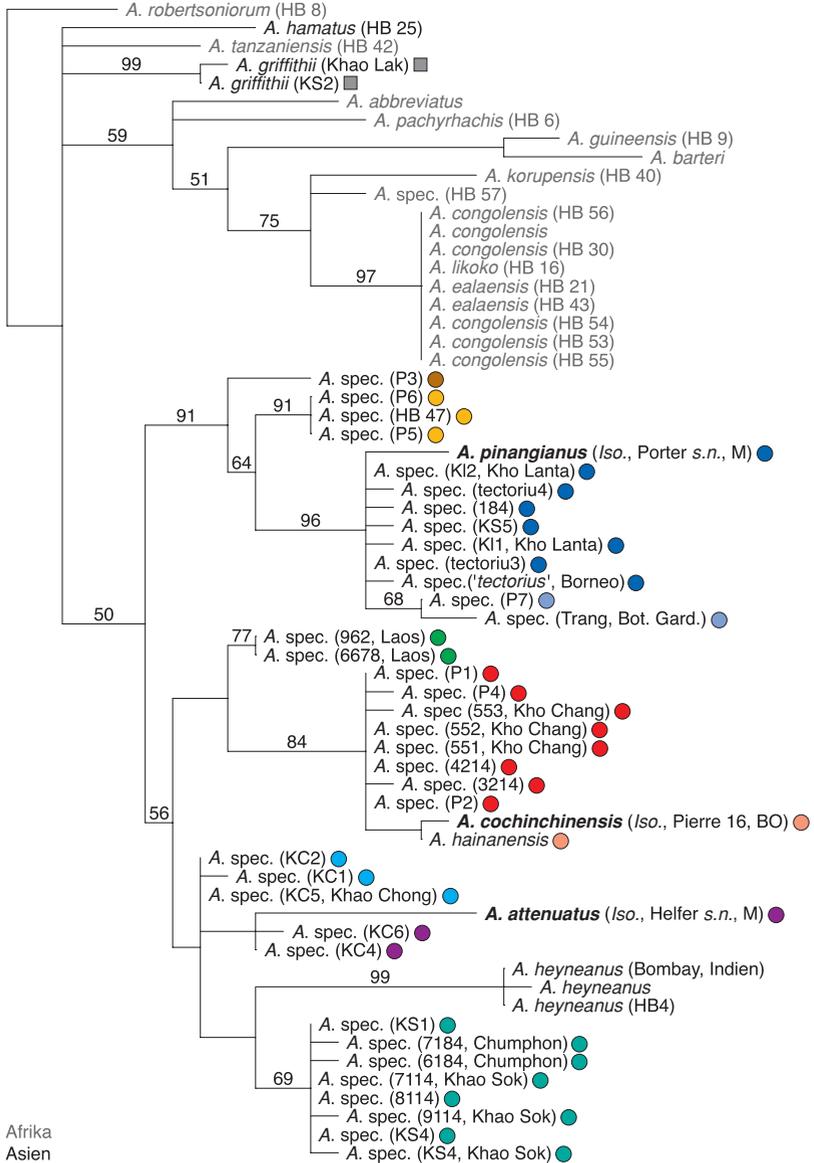


Abb. 12. Kladogramm der *Ancistrocladus*-Proben basierend auf ITS-Sequenzen (Sequenzierung und Berechnung durch H. Meimberg, Abb. mit freundlicher Genehmigung); Bezeichnung entsprechend Tab. 28, 29

#### 4.4 Beobachtungen am Naturstandort

Im Verlauf zweier Forschungsreisen nach Südostasien (West-Malaysia und Thailand) wurden zahlreiche Habitats von Ancistrocladaceen aufgesucht und die Pflanzen am Naturstandort beobachtet. Obwohl die Aufenthalte jeweils zeitlich eng begrenzt waren, soll die folgende Zusammenstellung Angaben zum Fundort und ökologische Aspekte katalogisieren. Diese Daten sollten auch im Zusammenhang mit Kap. 4.1, 4.2 und 4.3 gesehen werden.

*Ancistrocladus aff. tectorius* (Johor):

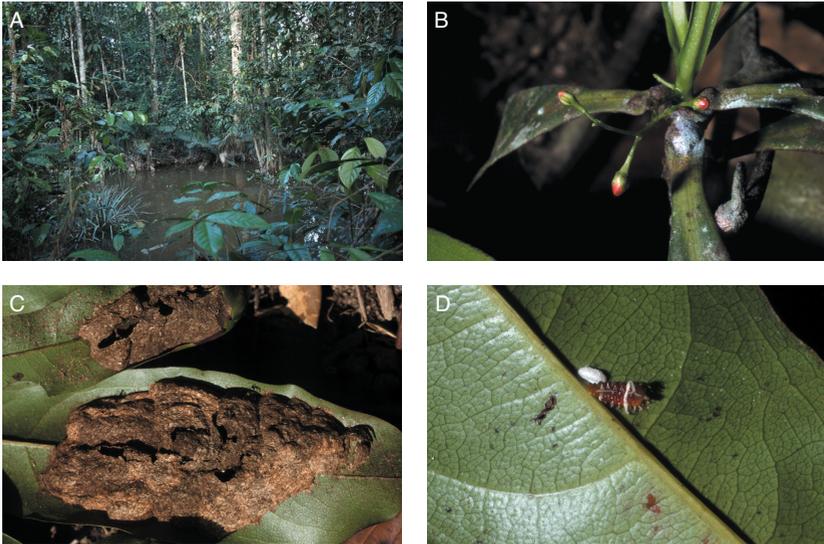


Abb. 13. *A. aff. tectorius* aus Johor, Malaysia: Habitat (A); Infloreszenz (B); Ameisen-nest auf Blattunterseite (C); Von Schlupfwespe parasitierte Raupe auf Blatt (D)

**Fundort:** 87 km von Johor Bahru entfernt, Johor, Malaysia.

**Datum:** 06.03.1999.

**Habitat:** Tieflandregenwald in Flußnähe, 180 m NN (Abb. 13A).

**Bemerkungen:** Der Fundort befand sich in einem von langsam fließenden Flüssen durchzogenen Sumpfgelände. Die Luftfeuchtigkeit betrug 100%. An ausgewachsenen Pflanzen waren zu dieser Jahreszeit nur sehr vereinzelt wenigblütige Infloreszenzen zu finden (Abb. 13B). Viele Blätter im Kronendach waren auf den Unterseiten mit Ameisennestern besetzt (Abb. 13C). Diese bestanden aus zerkaumtem Pflanzenmaterial ähnlich einem Wespennest und waren in mehrere Kammern aufgeteilt, in denen sich die Larven befanden. Es könnte sich um eine *Myrmecaria*-Art,

eine Myrmecine, handeln. Die interessante Frage, ob *Ancistrocladus* nur zufällig besiedelt wird oder ob die Pflanze als Wohnstätte präferiert wird bzw. in einem anderen speziellen ökologischen Verhältnis zu den Ameisen steht, konnte leider nicht beantwortet werden. Ebenfalls ungeklärt bleibt, ob die unbestimmte Raupe und ihr Parasit (Abb. 13D), die auf einem Blatt angetroffen wurden, auf *Ancistrocladus* angewiesen sind.

*Ancistrocladus aff. tectorius* (G. Benom):



Abb. 14. *A. aff. tectorius* vom G. Benom, Malaysia: Expeditionsteam von 1999 (A); Expeditionsteam von 2000 (B); Jungpflanzen im Unterwuchs (C); Sammlung von Bulkmaterial (D); Vorbereiten des Herbarmaterials (E)

Fundort: Gunung Benom, Pahang, Malaysia.

Datum: 09./10./12.03.1999, 12./13.04.2000.

Habitat: Tieflandregenwald bis Bergregenwald, 500–1180 m NN.

Bemerkungen: Der 2107 m hohe Gunung Benom (Mon-Khmer: Benom = Berg) liegt im 53095 ha großen Kerau Game Reserve, das eines der letzten zusammenhängenden Tiefland-Dipterocarpaceenwälder in ganz Südostasien darstellt. Das Gebiet ist nur mit einer speziellen Geneh-

migung zugänglich, und der Berg ist nur zu Fuß zu erreichen. Bei einer ersten Erkundungsexpedition im Jahr 1999 (Abb. 14A) wurde in der Höhenregion von 600–1180 m NN eine *Ancistrocladus*-Art gefunden. Das Vorkommen von *Ancistrocladus* in dieser Höhe ist ungewöhnlich und wird nur noch von der afrikanischen Art *A. tanzaniensis* übertroffen, die bis zu 1500 m aufsteigt. Temperaturmessungen an der untereren Verbreitungsgrenze ergaben um acht Uhr 29° C und um 20 Uhr 27° C. An der oberen Verbreitungsgrenze wurden um 20 Uhr nur noch 20° C gemessen. Im dichten Unterwuchs kamen oft Jungpflanzen von ca. 1.5 m Höhe vor (Abb. 14C). Nur in Lichtungen, die von umgestürzten Bäumen verursacht worden waren, bekamen diese genügend Helligkeit, um an den umstehenden Bäumen emporzuklimmen. Genetische ITS-Sequenzanalysen deuten auf eine von anderen Ancistrocladaceen der Malayischen Halbinsel separierte Stellung hin. Auch erste phytochemische HPLC-MS/MS-Untersuchungen zeigen ein spezielles Metabolitmuster.<sup>[168]</sup> Bei einer zweiten Expedition im Jahr 2000 (Abb. 14B, D, E) wurden deshalb in Kooperation mit Prof. Hadi (University of Malaya, Kuala Lumpur) unter Einhaltung der gesetzlichen Auflagen Bulkmenen der Pflanzen, insgesamt 350 g getrocknete Rinde und 1.25 kg getrocknete Blätter, gesammelt und nach Würzburg gebracht. Derzeit wird dieses Material von Dreyer in unserem Arbeitskreis intensiv chemisch untersucht.<sup>[166]</sup> Leider konnten bei beiden Aufenthalten keine blühenden Pflanzen gefunden werden.

*Ancistrocladus aff. tectorius* (Khao Lak):

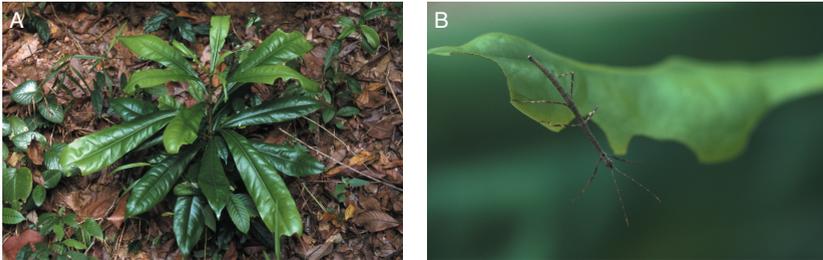


Abb. 15. *A. aff. tectorius* im Khao Lak, Thailand: stark durch Insektenfraß geschädigte Jungpflanze (A); Stabheuschrecke auf Blatt (B)

Fundort: Khao Lak, Thailand.

Datum: 17.03.1999.

Habitat: Küstenwald, 5 m NN.

Bemerkungen: Diese Region südlich des Isthmus von Kra erhält durch den Südwestmonsun, der sich an der Phuket-Kette abregnet, die höchste Niederschlagsmenge von Thailand. Die Pflanzen wuchsen hier direkt am Waldrand hinter dem Strand. Das Substrat war sandig. Viele der Pflanzen waren an den jüngsten Blättern stark durch Insektenfraß geschädigt (Abb. 15A).

Am frühen Morgen fanden sich einzelne juvenile Stabheuschrecken (Phasmida) auf den Blättern (Abb. 15B). Diese Insekten werden entweder nicht durch Naphthylisochinolin-Alkaloide geschädigt, oder die jungen Blätter beinhalten diese noch nicht, da ältere Blätter, die möglicherweise zu einer Zeit ohne Schädlingsdruck heranwuchsen, völlig unversehrt waren.

*Ancistrocladus* aff. *tectorius* (Khao Yai):

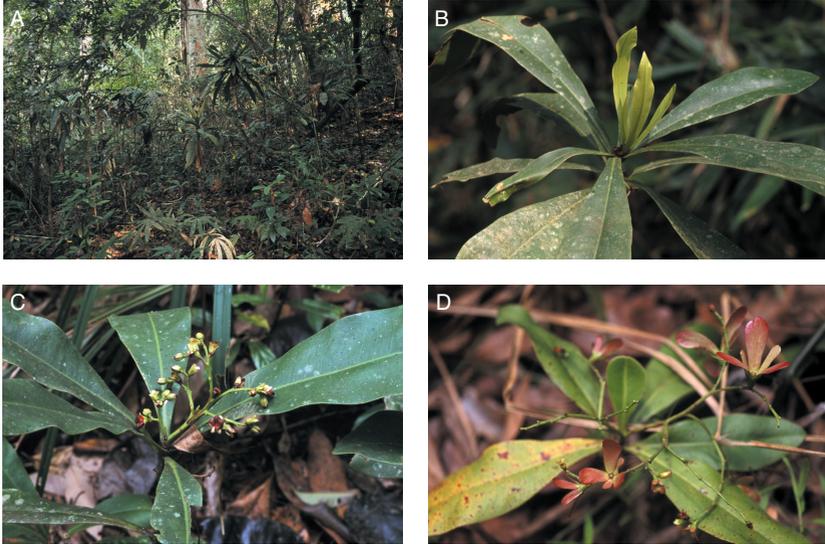


Abb. 16. *A. aff. tectorius* im Khao Yai, Thailand: Habitat (A); Blattrosette (B); Infloreszenzen (C); unreife Früchte (D)

Fundort: Khao Yai, Thailand.

Datum: 21.–24.03.2000.

Habitat: Tieflandregenwald, 450–900 m NN.

Bemerkungen: Der Khao-Yai-Nationalpark wurde 1962 eingerichtet und stellt somit den ältesten Nationalpark Thailands dar. Das Gebiet ist ein Ausläufer der Dongrak-Kette mit großen Sandsteinplateaus. Zur Zeit des Aufenhaltes war die wärmste Jahreszeit. Morgens um sechs Uhr war es 27° C warm, abends um 20 Uhr herrschten immer noch 30° C. Im Park war *Ancistrocladus* zum Teil sehr häufig von 500–900 m NN (Abb. 16A) anzutreffen. Es fanden sich sowohl reichlich blühende als auch fruchtende Pflanzen (Abb. 16C, D), die oft nicht höher als 50 cm waren. Die jungen Blätter der Rosetten sind weißlich bis rötlich gefärbt (Abb. 16B). Dadurch sind die monopodialen Jungpflanzen aus der Ferne oft mit *Agrostistachys* (Euphorbiaceae) verwechselbar.

*Ancistrocladus aff. tectorius* (Namtok Phliu):

Fundort: Namtok Phliu bei Chantaburi, Thailand.

Datum: 26.03.2000.

Habitat: Tieflandregenwald, 200 m NN.

Bemerkungen: Namtok Phliu liegt im Khao Sabab Forest. Das isolierte Granitmassiv erhält hohe Niederschläge und ragt bis 924 m über die umgebende Ebene hinaus. *Ancistrocladus* wurde nur vegetativ angetroffen.

*Ancistrocladus aff. tectorius* (Khao Kitchakut):

Fundort: Khao Kitchakut bei Chantaburi, Thailand.

Datum: 29.03.2000.

Habitat: Tieflandregenwald, 200 m NN.

Bemerkungen: Dieses ebenfalls hügelige Gebiet mit dem Khao Prabat (1085 m NN) grenzt an das Khao-Soi-Dao-Wildlife Sanctuary. *Ancistrocladus* war stellenweise sehr häufig.

*Ancistrocladus aff. tectorius* (Namtok Sapanhin):



Abb. 17. *A. aff. tectorius* beim Namtok Sapanhin, Thailand: Habitat (A); Jungpflanze in erodiertem Gelände (B)

Fundort: Namtok Sapanhin bei Chantaburi, Thailand.

Datum: 26.03.2000.

Habitat: Tieflandregenwald, 120 m NN.

Bemerkungen: Das Gebiet liegt unweit der thailändisch-kambodschanischen Grenze am Fuße der Cardomom-Kette. Das Habitat war ein eher trockener Bambus- und Schilfwald (Abb. 17A). Dementsprechend fühlten sich die Blätter des dort vorkommenden *Ancistrocladus* ledrig bis papierartig an. Blühende oder fruchtende Individuen wurden nicht angetroffen. Im Unterwuchs fanden sich aber viele Sämlinge. Teilweise wuchsen die Pflanzen in stark erodiertem Gelände auf felsigem Untergrund (Abb. 17B). Im ITS-Kladogramm bildet diese ungewöhnliche Pflanze ein eigenes Clade.

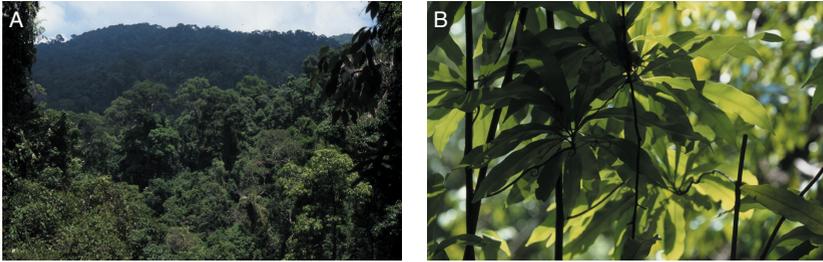
*Ancistrocladus griffithii* (Khao Lak):

Abb. 18. *A. griffithii* im Khao Lak Thailand: Habitat (A); Lianen (B)

**Fundort:** Khao Lak, Thailand.

**Datum:** 19.03.1999.

**Habitat:** Tieflandregenwald, 100–120 m NN.

**Bemerkungen:** *A. griffithii* wurde bereits 1849 von Planchon anhand von Typusmaterial aus Burma beschrieben. Offensichtlich ist die Art entlang der Tenasserim- und der Phuket-Kette weitverbreitet. Im Gegensatz zur Originalbeschreibung gedeiht die Art aber nicht nur entlang von Flüssen, sondern vor allem in hügeligem Gelände (Abb. 18A). In der genetischen Sequenzanalyse zeigte sich eine basale Stellung. Bisher war die Art phytochemisch nicht untersucht, fiel jedoch im Dimerentest auf.<sup>[169]</sup> Mittlerweile konnten eine Reihe interessanter Alkaloide aus dieser Pflanze isoliert werden (vgl. Kap. 4.5).<sup>[170]</sup> Diese scheinen die Pflanzen am Naturstandort sehr wirksam vor Insektenfraß zu schützen, da kaum geschädigte Blätter vorhanden waren (Abb. 18B). Einige ausgehöhlte Äste dienen einer kleinen Ameisenart (*Tapinoma* spec.) als Behausung. Inwieweit diese Insekten speziell mit *A. griffithii* assoziiert sind, können nur längere Feldforschungen ergeben.

*Ancistrocladus congolensis* (Luchuadi):

Im Rahmen einer langjährigen Kooperation wurden von Prof. V. Mudogo in der Republik Kongo Samen und Bulkmaterial von *A. congolensis* gesammelt und nach Würzburg gebracht. An dem gesammelten Material konnten einige interessante Beobachtungen gemacht werden, die der Vollständigkeit halber in diesem Kapitel aufgeführt werden, obwohl sie nicht direkt am Naturstandort gemacht wurden.

**Fundort:** Luchuadi, Republik Kongo.

**Datum:** 27.09.2000.

**Habitat:** Tieflandregenwald.

**Bemerkungen:** Die Beobachtung, daß sich an Infloreszenzen von *A. congolensis* neben normal

entwickelten Früchten ungewöhnlich viele organoide Gallen finden, hat bereits Léonard publiziert.<sup>[136]</sup> Nach der Samenreife und dem Loslösen der Samen an einer präformierten Stelle bleiben die vertrockneten Infloreszenzachsen noch geraume Zeit an den Pflanzen. Die Gallen lösen sich nicht von den Blütenstielen und fallen erst mit den kompletten Infloreszenzresten ab (Abb. 19A). Sie sind erdbeerförmig und mit einem Durchmesser von *ca.* 2 cm deutlich größer als normal entwickelte Samen (Abb. 19B vgl. Abb. 6D, Kap. 4).

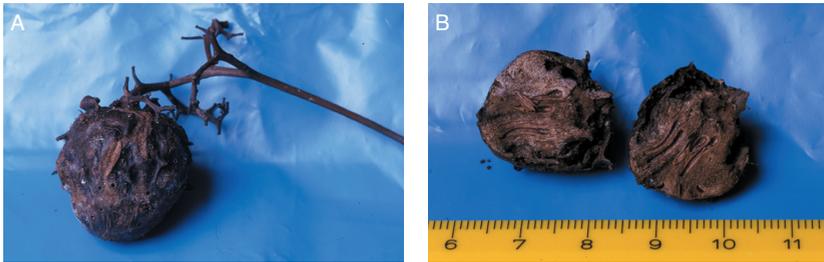


Abb. 19. Gallen von *A. congolensis*: Galle an Infloreszenz (A); Querschnitt durch Galle (B)

In den Gallen finden sich weder ein Embryo noch das charakteristische Endosperm. Dennoch zeigt ein Vergleich der Trockengewichte von zufällig ausgewählten Proben von Samen und Gallen eines Standortes, daß die Gallen ein deutlich höheres Gewicht aufweisen (Abb. 20B u. C). Samen von verschiedenen Standorten unterscheiden sich hingegen nicht signifikant im mittleren Gewicht (Abb. 20A u. B).

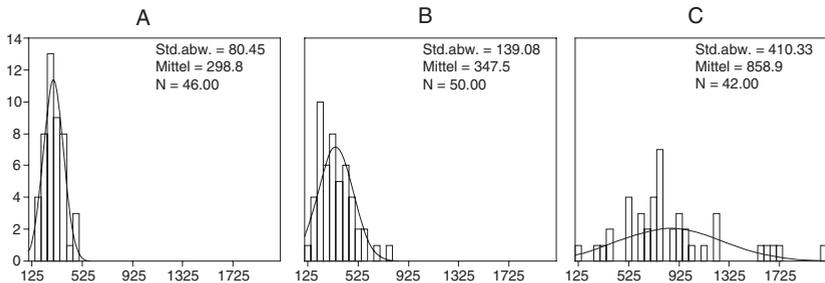
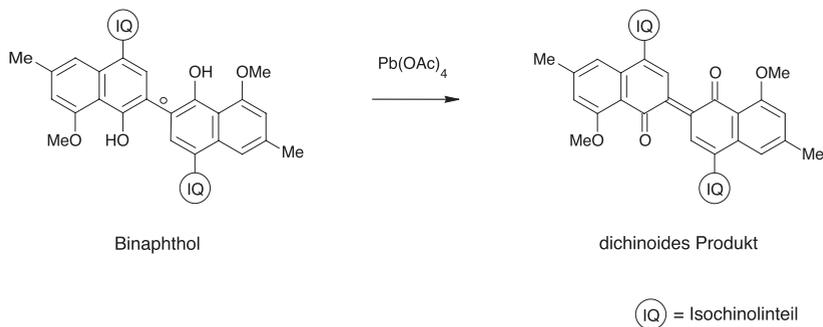


Abb. 20. Gewichtsklassen von Samen und Gallen von *A. congolensis*: Samen vom Standort Libongo (A); Samen vom Standort Ikuey (B); Gallen vom Standort Ikuey (C)

Es sollte erwähnt werden, daß bei keiner der südostasiatischen *Ancistrocladus*-Arten derartige Gallenbildungen beobachtet wurden. Die Gallbildner (Cecidozoa) sind unbekannt.

#### 4.5 Screening auf dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide

Dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide wie z.B. Michellamin B (**3**, Abb. 4) stellen aufgrund ihrer aussichtsreichen anti-HIV-Aktivitäten pharmakologische Zielmoleküle dar (vgl. Kap. 2.3). Die einzige natürliche Quelle für solche Quarteraryle war bisher *A. korupensis*. Ein von Schlauer entwickelter Schnelltest,<sup>[169]</sup> basierend sowohl auf biosynthetischen<sup>[171]</sup> als auch synthetischen<sup>[172]</sup> Beobachtungen, nutzt Bleitetraacetat zur Oxidation<sup>[173]</sup> der Dimere zu einem farbigen dichinoiden Produkt (Schema 4), das sich bei 525 nm photometrisch direkt im Rohextrakt nachweisen läßt.



Schema 4. Bildung von dichinoiden Produkten aus Binaphtholen durch Oxidation mit  $\text{Pb(OAc)}_4$

Mit der neuen Methode wurden alle zugänglichen Proben getestet. Unter allen durchsuchten *Ancistrocladus*-Proben fiel *A. korupensis* wie erwartet mit dem höchsten Wert auf. Die nahe verwandten zentralafrikanischen Arten *A. congolensis*, *A. cf. guineensis*, *A. cf. letestui* und *A. likoko* enthielten weit geringere, aber dennoch meßbare Konzentrationen (Tab. 28, S. 133).

Die Testung der asiatischen Proben (Tab. 29, S. 134) erbrachte überraschenderweise, daß *A. griffithii*, eine bislang nicht untersuchte Art aus Burma und Thailand, signifikante Mengen eines Dimers enthalten mußte.<sup>[169]</sup> Interessanterweise waren die Dimerkonzentrationen der Pflanzen aus dem nördlicheren Vorkommen generell höher. Nachfolgende on-line-Analysen und Isolierungsarbeiten von Wohlfarth erbrachten in der Tat ein neues Dimer, Ancistrogriffithin A (**42**), sowie neben den bekannten monomeren Naphthylisochinolin-Alkaloiden Ancistrocladin (**6**) und Hamatin (**23**) auch drei neue, die Ancistrogriffine A, B und C (**39**, **40** und **41**, Abb. 21).<sup>[170]</sup> Alle diese Alkaloide waren vom 'Ancistrocladaceen-Typ' (d.h. mit *S*-Konfiguration an C-3 und einer Sauerstofffunktion an C-6),<sup>[26]</sup> und sie wiesen interessante Bioaktivitäten auf. Das zugehörige Monomer von Ancistrogriffithin A (**34**) konnte nicht gefunden werden.

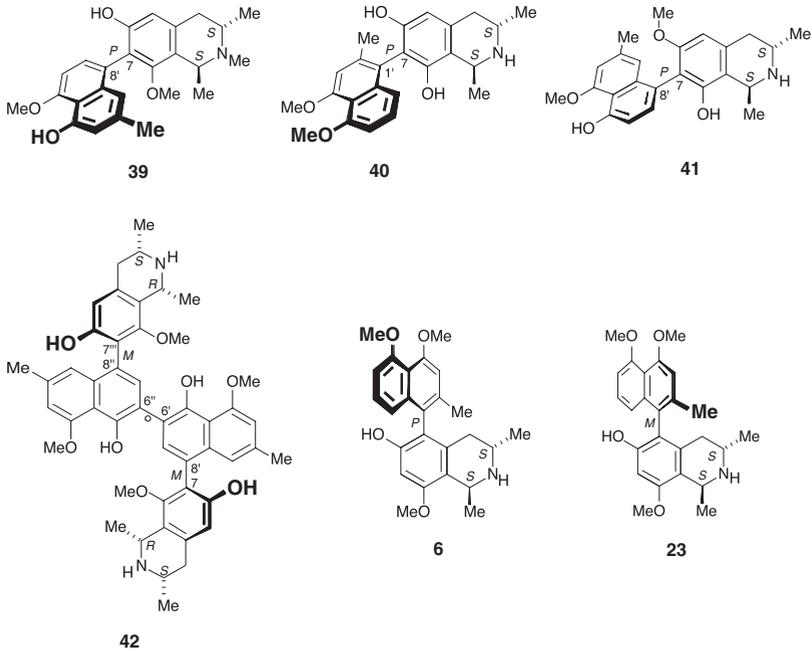


Abb. 21. Jüngst aus *Ancistrocladus griffithii* isolierte Naphthylisochinolin-Alkaloide

Unter dem umfangreichen übrigen Probenmaterial aus Asien wurde nur eine weitere durch erhöhte Dimerkonzentrationen auffällig. Diese Probe aus Zentralthailand (Khao Kitchakut) gruppiert im ITS-Sequenzvergleich (vgl. Kap. 4.3) mit anderen Pflanzen aus der Region, die keine signifikanten Dimerkonzentrationen aufweisen. Aufgrund fehlender Mengen für die Isolierung konnte die Untersuchung auf Metabolite dieser Probe noch nicht weitergeführt werden.

#### 4.6 *In-vitro*-Kultur ausgewählter *Ancistrocladus*-Arten

*Ancistrocladus*-Pflanzen kommen oft in schwer zugänglichen tropischen Gebieten vor, so daß eine ganzjährige Verfügbarkeit der Pflanzen für Experimente nicht gegeben ist. Besonders für Biosyntheseuntersuchungen sind kontrollierbare Bedingungen erwünscht. Speziell Sterilkulturen tragen dem Rechnung und bieten noch zusätzlich die Möglichkeit, das Wachstum der Pflanzen in beliebige Richtungen zu lenken. Ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit war es also, Protokolle für eine *in-vitro*-Kultur möglichst vieler dieser anspruchsvollen Arten zu entwickeln.

*Ancistrocladus abbreviatus*:

Für *A. abbreviatus* existierte bereits ein funktionierendes Protokoll zur klonalen Propagation *in vitro*.<sup>[174]</sup> Ca. 2 cm lange Nodienstücke konnten auf 1/5 MS Medium, entweder angereichert mit jeweils 0.01 mg/l TDZ und NAA oder mit 0.004 mg/l TDZ, 1.0 mg/l BAP und 0.01 mg/l NAA, dazu angeregt werden, z.T. mehrfach auszutreiben (Abb. 22A).

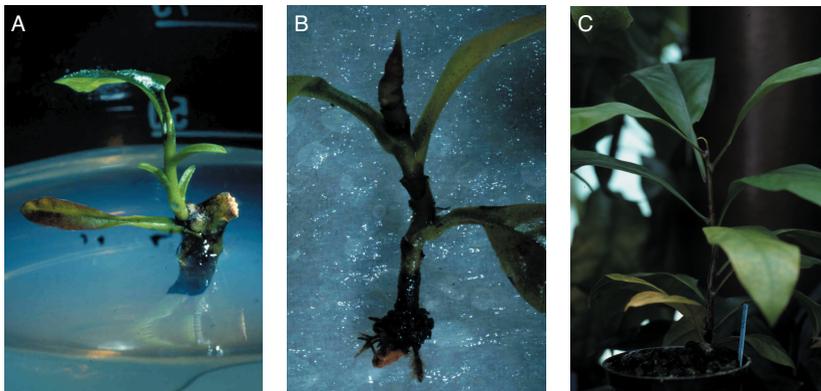


Abb. 22. *A. abbreviatus in vitro*: austreibendes Nodiensegment (A); bewurzelter Sproß (B); ausgepflanzt Exemplar (C)

Mit den vereinzelten Sprossen wurden sodann vergleichende Wachstumsstudien (je drei Sprosse verschiedener Klone) auf drei verschiedenen Medien (1/5 MS, abgewandeltes Anderson-Medium und WPM) durchgeführt. Es ergab sich, daß die Pflanzen nach drei Monaten, d.h. nach drei Subkulturpassagen auf abgewandeltem Anderson-Medium, die meisten Blätter bildeten und eine deutlich größere Frischgewichtszunahme aufwiesen (59% im Vergleich zu 10% auf 1/5 MS bzw. 44% auf WPM).<sup>[175]</sup> Abgewandeltes Anderson-Medium wurde daher standardmäßig für die Kultur von *A. abbreviatus* eingesetzt. Der nach dem beschriebenen Protokoll vermehrte Pflanzenbestand diente desweiteren als Ausgangsmaterial für Bewurzelungsversuche *in vitro*. Dauerhaftes Dunkelstellen der Kulturen für einen Zeitraum von sechs Wochen bewirkte die Bildung einzelner, bis zu 3 cm langer zerbrechlicher Wurzeln. Hingegen konnten innerhalb von zwei Monaten gut bewurzelte Pflanzen erhalten werden, indem die Sprosse in steriles Seramis<sup>®</sup>, das mit sterilem destilliertem Wasser befeuchtet war, überführt wurden (Abb. 22B). Die Zeit bis zur Bewurzelung konnte durch ein kurzes Eintauchen der Sprosse in eine Lösung von 1.0 mg/l IBA vor dem Überführen in Seramis<sup>®</sup> auf nur einen Monat verkürzt werden. 78% (7 von 9) der Sprosse bildeten nach Behandlung mit dieser Lösung Wurzeln, während eine Behandlung mit einer gleichkonzentrierten NAA-Lösung 0% (0 von 5) Wurzelbildung bewirkte. Gut bewurzelte

Pflanzen mit einer Höhe von *ca.* 5 cm wurden schließlich in 5 cm tiefe Töpfe mit Seramis® überführt und in das Gewächshaus gestellt. Zunächst hielt man die Töpfe noch unter 8 cm hohen transparenten Plastikhauben, um eine Luftfeuchtigkeit von annähernd 100% zu gewährleisten. Nach einer Woche wurden die Hauben entfernt, und die Pflanzen akklimatisierten sich an die Bedingungen in den Vermehrungskästen. Nach drei Monaten konnten die Pflanzen dann frei im Gewächshaus platziert werden, wo eine Luftfeuchtigkeit von *ca.* 80% herrschte (Abb. 22C).

*Ancistrocladus heyneanus*:

Auch von der indischen Art *A. heyneanus* konnte bereits auf vorhandene Sterilkulturen zurückgegriffen werden, die ursprünglich aus Samen erhalten worden waren.<sup>[174]</sup> Ausgehend von verschiedenen Explantaten wurde unter verschiedenen Bedingungen Kallus induziert und subkultiviert (Tab. 4). Unabdingbar war die Kultur unter Schwachlichtbedingungen, da die Kalli sonst im Wachstum gehemmt waren.

Tab. 4. Bonitur der Kallusinduktion an Explantaten von *A. heyneanus* nach drei Monaten

Phytohormone und Medienveränderung	Kotyledonen	Hypokotyl	Wurzel
0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l NAA, L-Glutamin	0/+	0/+	0/+
1.0 mg/l BAP, 5.0 mg/l NAA, L-Glutamin	+	+	+
0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l NAA	+	++	++
0.3 mg/l Kinetin, 4.0 mg/l NAA	0	+	+
2.0 mg/l IBA	0	0	+

0 = keine Kallusbildung; + = geringe Kallusbildung; ++ = starke Kallusbildung

Bei der Subkultur der gebildeten Kalli zeigten sich zunächst deutliche morphologische Unterschiede. Auf Medium mit 0.3 mg/l Kinetin und 4.0 mg/l NAA war durch den hohen Auxinanteil eine leichte Tendenz zur Differenzierung von Wurzeln erkennbar (Abb. 23A). Ein Zusatz von jeweils 0.5 mg/l BAP, 2.4-D und NAA regte den Kallus zu schnellem undifferenziertem Wachstum an (Abb. 23D). Die Zugabe von 2 mg/l BAP und 0.01 mg/l NAA zu Festmedium bewirkte die Organogenese von Sprossen (Abb. 23B). Setzte man hingegen diese Hormonkombination dem Flüssigmedium zu, so bildeten sich rot gefärbte durchscheinende Kalli (Abb. 23C).

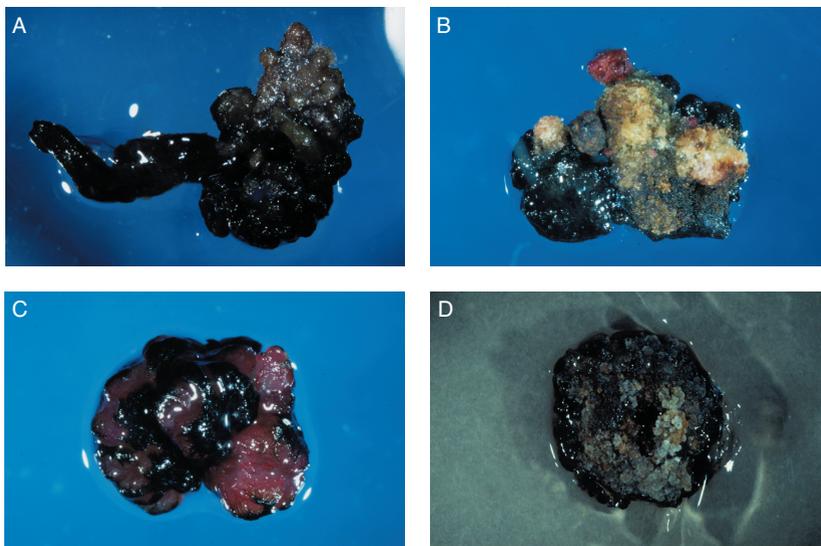


Abb. 23. Phytohormoneinfluß auf die Morphologie von Kalli auf 1/5 MS Medium: 0.3 mg/l Kinetin, 4.0 mg/l NAA, Festmedium (A); 2 mg/l BAP, 0.01 mg/l NAA, Festmedium (B); 2 mg/l BAP, 0.01 mg/l NAA, Flüssigmedium (B); 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l NAA, Festmedium (C)

Analog zu früheren Versuchen<sup>[42]</sup> wurden nun von Extrakten der Kalli HPLC-ESI-MS/MS-Untersuchungen durchgeführt, um das in Spuren vorkommende Ancistrocladinin (**35**) nachzuweisen. Anhand der Pseudomolekülionen und der spezifischen Retentionszeit von 18.8 min wurde dieses Naphthylisochinolin auch tatsächlich in allen Proben detektiert. Es zeigten sich sogar trotz der generell sehr niedrigen Konzentrationen quantitative Unterschiede. Am höchsten war die Konzentration in den regenerierenden Kalli auf Festmedium mit 2 mg/l BAP und 0.01 mg/l NAA (Abb. 24B). Hingegen war in den Kalli, die durch den Zusatz von 0.3 mg/l Kinetin und 4.0 mg/l NAA zur Wurzelbildung neigten, am wenigsten **35** vorhanden (Abb. 24A). Die beiden verbleibenden Ansätze mit 2 mg/l BAP und 0.01 mg/l NAA (Abb. 24C) bzw. jeweils 0.5 mg/l BAP, 2,4-D und NAA (Abb. 24D) unterschieden sich kaum. Dieses Ergebnis kann möglicherweise als Bestätigung des Pfropfversuchs (Kap. 6.3) angesehen werden, da es ebenfalls auf einen möglichen Bildungsort der Naphthylisochinolin-Alkaloide im Sproß und den Blättern hindeutet.

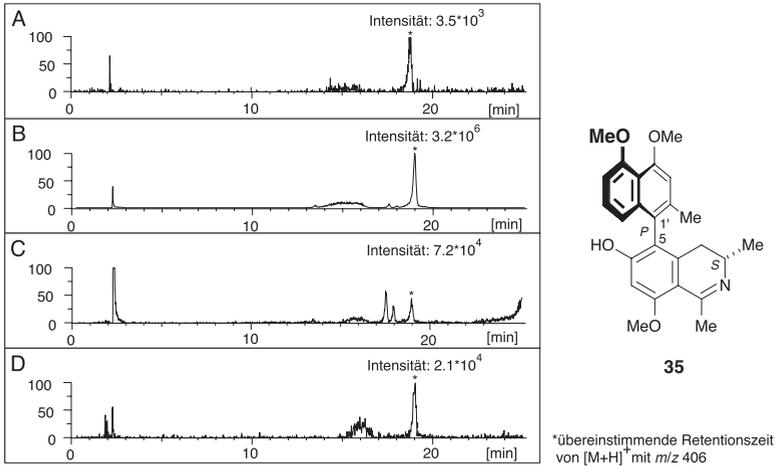


Abb. 24. Nachweis von Ancistrocladinin (**35**) mittels HPLC-ESI-MS/MS in Kalli von *A. heyneanus* unter dem Einfluß verschiedener Phytohormone

Wie bereits erwähnt, bildeten sich auf 1/5 MS-Festmedium mit 2 mg/l BAP und 0.01 mg/l NAA einen Monat nach dem Umsetzen auf dieses Medium knospenartige Meristeme von rötlicher Farbe (Abb. 25A).

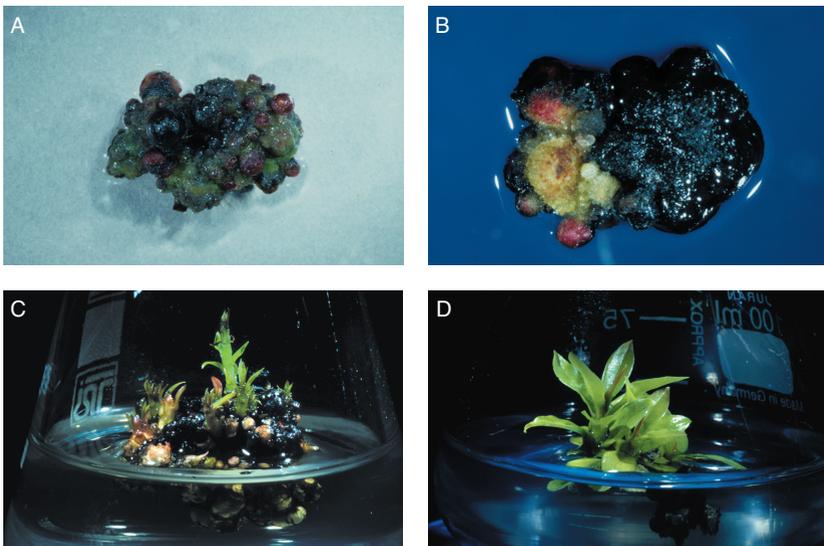


Abb. 25. Regeneration von *A. heyneanus*-Sprossen: Knospenbildung (A); Knospenentwicklung (B); Sproßbildung (C); Kultur abgetrennter Sprosse (D)

Bei monatlichem Umsetzen auf frisches Medium mit derselben Zusammensetzung vergrößerten sich die Knospen (Abb. 25B) und wuchsen schließlich nach sechs Monaten zu Sprossen aus (Abb. 25C). Einzelne Sprosse konnten abgetrennt und separat weiterkultiviert werden, allerdings nur wenn dem Medium Phytohormone (0.04 mg/l TDZ und 0.01 mg/l NAA) zugesetzt waren (Abb. 25D). Die Regenerationsfähigkeit der Kalli nahm mit deren Alter konstant ab. Nach dreijähriger Kultur mit monatlichen Passagen war sie fast auf Null abgesunken. Derzeit versucht Noll,<sup>[176]</sup> die Regenerationsfähigkeit der Kalli durch den Einsatz von Polyaminen, wie bei anderen Arten<sup>[177]</sup> beschrieben, zu beeinflussen.

*weitere Arten:*

Mit erprobten Protokollen konnten Samen von *A. congolensis* (Luchuadi und Ikuey) sterilisiert werden und *in vitro* zur Keimung gebracht werden. Dem Wunsch, auch Arten in Sterilkultur zu bringen, die zwar im Gewächshaus vorhanden waren, von denen aber keine Samen erhältlich waren, konnte mit einer neuen Prozedur entsprochen werden. Frisches Pflanzenmaterial reagiert normalerweise sehr empfindlich auf eine Behandlung mit Hypochloritlösung. *Ancistrocladus*-Pflanzen aus dem Gewächshaus waren meist stark kontaminiert und mußten daher entsprechend lange in der Lösung verbleiben, um steril zu werden. Die Pflanzen reagierten auf diese Behandlung trotz ausreichender Wässerung in der Folge mit übermäßiger Polyphenolabgabe ins Medium und starben schnell ab. Mit dem seit kurzem kommerziell erhältlichen PPM™ ('Plant Preservative Mixture' mit den aktiven Bestandteilen 5-Chlor-2-methyl-3-isothiazolon und 2-Methyl-3-isothiazolon) als Sterilisationsmittel konnten diese Folgen vermieden werden.<sup>[178]</sup> Ausreichend lange Anwendung (ein Jahr) vorausgesetzt, erhielt man letztlich sterile Pflanzen, die ein gutes Wachstum zeigen. Ein gelegentliches Problem sind Algen, die mit PPM™ nicht abgetötet werden, da dieses nur gegen Pilze und Bakterien aktiv ist. Mit dieser Methode konnten *Ancistrocladus korupensis* und *A. aff. tectorius* (Khao Yai und Gunung Benom) in axenische Kultur überführt werden.

## 5 Dioncophyllaceae

Die Familie Dioncophyllaceae umfaßt nur drei monotypische Gattungen mit folgenden Arten: *Triphyophyllum peltatum* (Hutch. & Dalz.) Airy Shaw, *Habropetalum dawei* (Hutch. & Dalz.) Airy Shaw und *Dioncophyllum thollonii* Baillon,<sup>[74]</sup> die in ihrer Verbreitung auf das tropische Westafrika beschränkt sind.<sup>[179]</sup> Es handelt sich um Lianen, deren Blätter im ausgewachsenen Zustand thigmonastische Doppelhaken an den Blattspitzen tragen, um damit emporzuranken (Abb. 26). Die namensgebende Gattung wurde daher von Baillon *Dioncophyllum*, also 'Zweihaakenblatt' genannt.<sup>[115]</sup> Außerdem bemerkenswert ist auch das Phänomen der sekundären Gymnospermie, das alle drei Arten zeigen und das sonst im Pflanzenreich nur sehr selten, z.B. bei *Anchietea* und *Decorsella* (Violaceae) oder *Cuphea* (Lythraceae),<sup>[180]</sup> vorkommt (vgl. Kap. 5.1).

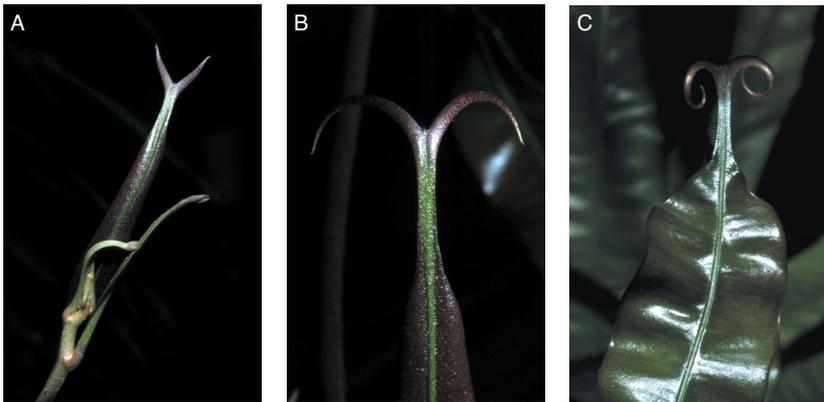


Abb. 26. Entwicklung der für die Dioncophyllaceen charakteristischen Doppelhaken am Beispiel von *Triphyophyllum peltatum*

### 5.1 *Triphyophyllum peltatum*

*Triphyophyllum peltatum* ist zweifellos die bestuntersuchte Art der Dioncophyllaceen. Ihr Name rührt von den drei Typen von Blättern her, die die Pflanze natürlicherweise während ihres Lebenszyklus ausbildet (Abb. 27): In der juvenilen Phase werden lanzettförmige Blätter in Rosetten angelegt. Während eines bestimmten Alters und wenn die Pflanzen eine Höhe von ca. 25–40 cm erreicht haben, erscheinen kurz vor der Regenzeit Drüsenblätter.<sup>[181]</sup> Sie erinnern sehr an *Drosophyllum*, mit der noch weitere morphologische Gemeinsamkeiten bestehen,<sup>[182]</sup> und haben auch wie diese eine carnivore Funktion.<sup>[183]</sup> Die carnivore Phase ist jedoch nur von

kurzer Dauer<sup>[64]</sup> und ist insofern einzigartig unter allen carnivoren Pflanzen.<sup>[65]</sup> Der Habitus der Pflanzen ändert sich dann abermals, und sie entwickeln sich zur Liane. Später bilden sich die charakteristischen Hakenblätter (vgl. Kap. 5).

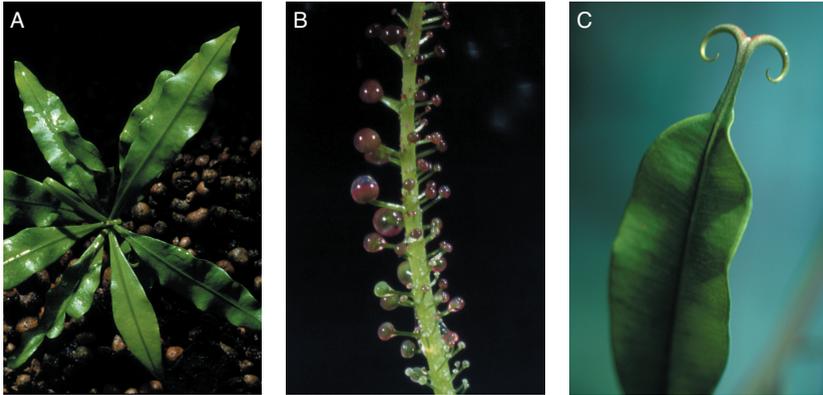


Abb. 27. Blattyphen von *T. peltatum*: lanzettförmige Jugendblätter (A); carnivores Drüsenblatt (B); adultes Hakenblatt (C)

## 5.2 Lebenszyklus unter Kulturbedingungen

Abweichend von diesem relativ starren Entwicklungsschema, das für *Triphyophyllum* entworfen worden war, konnte bei der Kultur der Pflanze im Gewächshaus eine größere Flexibilität hinsichtlich ihrer Entwicklung festgestellt werden.<sup>[184, 185]</sup> Aufgrund der Unzugänglichkeit des natürlichen Habitats fehlten bisher derartige Langzeitbeobachtungen. Eine zweieinhalb Jahre alte 35 cm hohe Pflanze, die zuvor nicht carnivor gewesen war, aber regelmäßig gedüngt worden war, begann im Oktober 1998, verlängerte Internodien zu bilden (Abb. 28A). Innerhalb weniger Wochen war der Sproß zwei Meter lang, und die Pflanze bildete die charakteristischen Hakenblätter. Der Sproß war bereits lignifiziert, als ein sekundäres Dickenwachstum einsetzte und die äußere Rinde aufplatzen ließ (Abb. 28B, C). Möglicherweise deutet das Auslassen der carnivoren Phase darauf hin, daß die Pflanze nur abhängig vom Ernährungszustand Drüsenblätter bildet. Erwachsene Individuen können nämlich, wie Feldbeobachtungen zeigten, erneut carnivor werden, wenn sie abgeschlagen werden.<sup>[183]</sup>



Abb. 28. Sproßelongation von *T. peltatum* (A); Sekundäres Dickenwachstum (B, C)

Im Juni 1999, als die Pflanze in einer Höhe von *ca.* 1.5 m bereits mehrere Meter an einem Draht entlangewachsen war, begann sie überraschend zu blühen, was noch nie zuvor in Kultur beobachtet worden war. Innerhalb von fünf Tagen öffneten sich insgesamt 47 Blüten an einer Infloreszenz, die 34 aufeinanderfolgende Knoten des apikalen Sprosses umfasste (Abb. 31A).

Die Blüten sind unbehaart. Der Blütenstiel ist 2.5–4 cm lang und *ca.* 2 mm breit, stielrund und leuchtend rot. Normalerweise befindet sich darunter eine 1–10 mm lange Braktee. Die Blüte ist aktinomorph. Die ausdauernden Sepalen bleiben kurz (*ca.* 2 mm lang, 1 mm dick), dreieckig, spitz, ausgebreitet, und formen einen sternförmigen Kelch. Die Petalen sind in der Knospe verdreht, ledrig, weißlich, *ca.* 20 mm lang und 5 mm breit, leicht eingerollt und schmal elliptisch. Sie duften (Poren auf der adaxialen Fläche), und der süßliche Duft hält sich nur, solange die Blüten geöffnet sind. Die zehn Staubblätter bestehen aus kurz gestauchten, weißen Filamenten und spitzen, dreieckigen Antheren, die *ca.* 2 mm lang sind (Abb. 29A). Sie stehen den Petalen gegenüber oder direkt vor ihnen und bilden gelben Pollen. Das Ovar ist kugelförmig, grün, 5-fächrig und mißt im Durchmesser *ca.* 3 mm. Die fünf weißen Griffel sind *ca.* 6 mm lang, an der Basis auseinanderstrebend und in der höckerigen Narbengegend wiederholt geteilt (Abb. 29B). Fünf wandständige Samenleisten tragen bis zu 25 kugelige Samenanlagen (Abb. 29C).

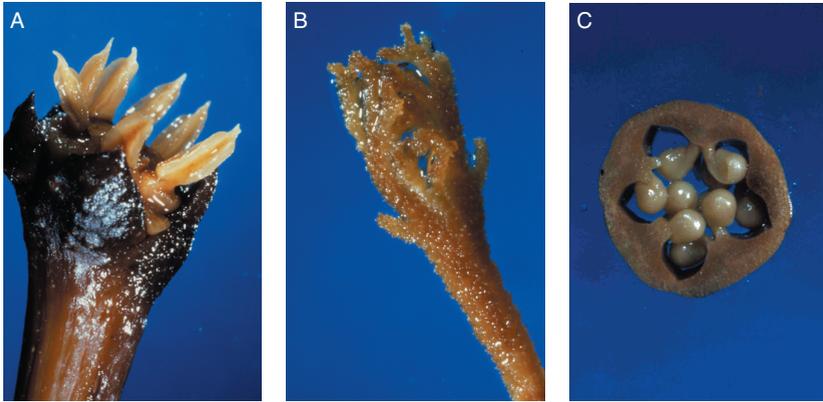


Abb. 29. *T. peltatum* Blütenfeinbau: Staubblätter (A); Griffel (B); Ovar (C)

Die Blüten öffneten sich bei Sonnenaufgang und begannen am Abend desselben Tages zu welken (Abb. 30A, B). Innerhalb von sieben Tagen wurden die Petalen, dann die Staubblätter und als letztes die Griffel braun und fielen ab.

Man bestäubte die Hälfte der Blüten mit Pollen von frisch geöffneten Blüten derselben Pflanze und einige mit Pollen von phylogenetisch verwandten Arten wie *Drosophyllum lusitanicum*, *Nepenthes x mixta* und *Ancistrocladus abbreviatus* (vgl. Kap. 3). Unabhängig von einer Bestäubung vergrößerten sich die Ovarien innerhalb von zehn Tagen nach der Anthese in eine verkehrt eiförmige Kapsel von 1.5–2.5 cm Länge und 6 mm Breite (Abb. 30C). Alle Früchte platzten zwei bis drei Wochen nach der Anthese auf (Abb. 30D), aber nur vier von ihnen bildeten insgesamt fünf Samen. Die Samenanlagen hatten die Form eines Nagels. Sie waren alle abgeflacht und 3 mm breit. Nur die befruchteten Samen zeigten ein schnelles Wachstum, sowohl des kreisförmigen Flügels, der den Embryo umgibt, als auch des Funiculus (Abb. 30E). Da von den kreuzbestäubten Blüten keine Samen gebildet wurden und die selbstbestäubten Blüten auch nur wenige Samen bildeten, kann davon ausgegangen werden, daß *T. peltatum* nur schwach selbstfertil ist, wenn überhaupt. Die Funiculi der sich entwickelnden Samen wurden ca. 4.5 cm lang und 2 mm dick und erinnerten, einschließlich der roten Färbung, an Blütenstiele, was sich aufgrund der frühen Öffnung der Kapsel (sekundäre Gymnospermie) ohne Manipulation hervorragend beobachten ließ. Nachdem die Samenflügel ca. acht Wochen nach der Anthese einen Durchmesser von 10 cm erreicht hatten und jeweils ca. 0.45 g wogen, begannen sie auszutrocknen und braun zu werden (Abb. 30F). Schließlich fielen sie ab und schwebten mit einer konstanten Geschwindigkeit von (0.9–) 1.5 (–2.3) m/s zu Boden, wobei der Ansatz des Funiculus nach unten zeigte. Keiner der Samen konnte zur Keimung gebracht werden.



Abb. 30. Blüten- und Fruchtentwicklung bei *T. peltatum*: Blütenknospe (A); Blüte (B); Frucht (C); Samenentwicklung außerhalb der Frucht (D-F)

Im August 1999 blühte die Pflanze erneut, während die Samen des ersten Blühereignisses noch reiften. Diesmal wurden 24 Blüten gebildet, die allerdings trotz Selbstbestäubung keine Samen bildeten (Abb. 31B). Im Jahr 2000 ereigneten sich weitere drei Blühperioden. Die erste und längste, die 125 Blüten hervorbrachte, war im Mai, die anderen im Juli und September. Offenbar hatte sich die Pflanze von diesen Massenblüten übermäßig verausgabt, denn im Sommer 2001 starb sie komplett ab.

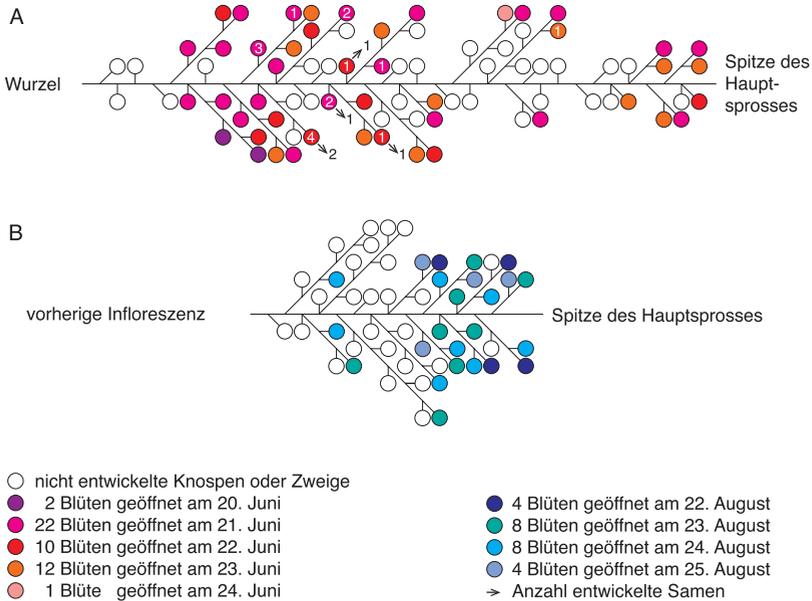


Abb. 31. Abfolge der Blütenöffnung bei *T. peltatum*: erste Blühperiode (A); zweite Blühperiode (B)

### 5.3 *In-vitro*-Kultur von *Triphyophyllum peltatum*

*Triphyophyllum peltatum* stellt ein interessantes Objekt für die Kultur *in vitro* dar. Zum einen schrumpft der natürliche Lebensraum der Pflanzen in Westafrika kontinuierlich, so daß unter axenischen Bedingungen vegetativ vermehrtes Material ein wichtiges *ex-situ*-Genreservoir<sup>[186]</sup> für eventuelle Wiederansiedlungsversuche darstellt, zumal konventionell im Gewächshaus gezogene Pflanzen nur sehr langsam wachsen und schwierig zu propagieren sind. Zum anderen sind Sterilkulturen dieser Art mit ihrer großen Palette an Sekundärmetaboliten ein unverzichtbares Instrument zur Aufklärung von Biosynthesewegen (vgl. Kap. 6) und stellen eine nachhaltige Quelle der bioaktiven Inhaltsstoffe dar.

Für die Erarbeitung von Protokollen zur klonalen Vermehrung, zur Bewurzelung und zum Auspflanzen ins Gewächshaus, sowie zur Induktion von carnivoren Drüsenblättern und von Kallusbildung an Blattexplantaten<sup>[187]</sup> konnte auf bereits *in vitro* gekeimte Pflanzen zurückgegriffen

werden.<sup>[174, 184]</sup> Ohne Zusatz von Phytohormonen zum Medium konnte keine Sproßentwicklung an Nodiensegmenten (ca. 0.5 cm lang mit drei Blättern) erreicht werden. Wurde aber Cytokinin eingesetzt, so schollen die Nodien innerhalb eines Monats stark an. Zum Austreiben mußten die Explantate danach aber einen weiteren Monat auf hormonfreiem Medium kultiviert werden. Die Anzahl der Sprosse pro Explantat und der Prozentsatz von Explantaten pro Gefäß mit Sprossen unterschied sich nicht signifikant beim Einsatz von BAP und TDZ (Tab. 5).

Tab. 5. Der Einfluß von Phytohormonkombinationen und -konzentrationen auf die klonale Vermehrung von *T. peltatum* nach einem Monat auf hormonhaltigem und einem weiteren Monat auf hormonfreiem Medium; Mittelwerte innerhalb einer Spalte, die mit dem gleichen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in Duncan's Test bei einer 5%-Schwelle

BAP	1/5 MS + Phytohormone [mg/l]		Explantate pro Gefäß mit Sprossen [%]*	Anzahl Sprosse pro Explantat <sup>#</sup>	Explantate pro Gefäß mit Kallus [%]*
	TDZ	NAA			
0	0	0	0.0 a	0.0 a	0.0 a
0	0.005	0.01	46.7 a, b	0.5 a, b	13.3 a, b, c
0	0.01	0.01	86.7 b	1.3 c	6.7 a, b
0	0.02	0.01	66.7 b	1.3 c	40.0 a, b, c
0	0.04	0.01	80.0 b	1.6 c	53.3 b, c, d
2.0	0	0.01	53.3 a, b	0.8 b, c	93.3 e
4.0	0	0.01	73.3 b	1.6 c	80.0 d, e
15.0	0	0.01	53.3 a, b	1.1 b, c <sup>+</sup>	60.0 c, d

\* Mittelwert von 15 Explantaten, fünf Explantate pro Gefäß; <sup>#</sup> Mittelwert von 15 Explantaten; <sup>+</sup> abnorm verdickte Sprosse

Die Verabreichung von BAP endete generell in stärkerer Kallusbildung an der Basis oder führte sogar zu mißgebildeten Pflanzen. Für eine spätere Bewurzelung war dieser Kallus störend. Aus diesem Grund wurde TDZ vorgezogen. Bei gleichzeitiger Gabe von 0.01 mg/l NAA und TDZ bildeten 86.7% der Explantate pro Gefäß Sprosse mit einem Mittelwert von 1.3 Sprossen pro Explantat, wobei nur 6.7% der Explantate pro Gefäß Kallus bildeten. Nach der Zeit der Datenaufnahme wurde noch weitere Spoßbildung beobachtet (Abb. 32A), weshalb diese Methode generell zur erfolgreichen Vermehrung von *T. peltatum* *in vitro* vorgeschlagen wird.

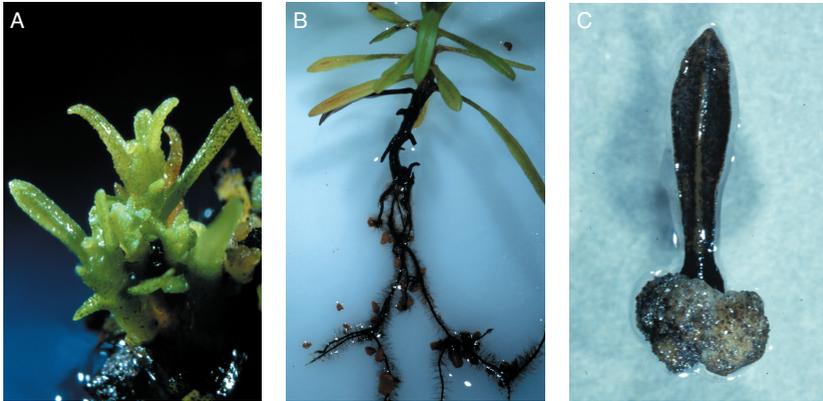


Abb. 32. *T. peltatum in vitro*: Sproßbildung (A); bewurzelter Exemplar zum Auspflanzen (B); Kallusbildung an Blattexplantat (C)

Die Bewurzelung war bei *T. peltatum* allgemein ein sehr langsamer Prozeß. Nach drei Monaten waren die Wurzeln selten länger als 1 cm. Auf Medium ohne Phytohormonen konnte überhaupt kein Wurzelwachstum an Sproßspitzen mit drei voll entwickelten Blättern festgestellt werden (Tab. 6).

Tab. 6. Einflußgrößen auf die Bewurzelung von *T. peltatum in vitro* nach zwei einmonatigen Passagen auf demselben Medium; Die Explantate wurden entweder in dem angegebenen Medium kultiviert (+) oder nicht kultiviert (-); Mittelwerte innerhalb einer Spalte, die mit dem gleichen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in Duncan's Test bei einer 5%-Schwelle

1/5 MS + IBA [mg/l]	H <sub>2</sub> O	Explantate pro Gefäß mit Wurzeln [%]*	Anzahl Wurzeln pro Explantat <sup>#</sup>	Explantat pro Gefäß mit Kallus [%]*
0.0	-	0.0 a	0.0 a	0.0 a
0.05	-	0.0 a	0.0 a	26.7 b, c, d
0.1	-	20.0 a	0.2 a	26.7 a, b, c
0.25	-	0.0 a	0.0 a	46.7 c, d
0.5	-	6.7 a	0.1 a	60.0 d
-	+	26.7 a	0.6 b	6.7 a, b

\* Mittelwert von 15 Explantaten, fünf Explantate pro Gefäß; <sup>#</sup> Mittelwert von 15 Explantaten

Es mußte eine zweistufige Methode<sup>[188]</sup> angewandt werden, da aus vorherigen Versuchen zur direkten Bewurzelung auf Medium mit IBA eine starke Kallusbildung an der Basis resultierte. Doch auch mit diesem Vorgehen konnte die übermäßige Kallusbildung nicht vollständig gestoppt werden. Eine optimale Bewurzelung wurde in sterilem destilliertem Wasser erreicht (Abb. 32B). Der Prozentsatz der Explantate mit Wurzeln pro Gefäß war hier mit 26.7% etwas höher im

Vergleich zu 20.0% bei der Behandlung mit 0.1 mg/l IBA. Zusätzlich hatten die Explantate signifikant mehr Wurzeln bei gleichzeitig geringerem Prozentsatz an Kallusbildung, nämlich 6.7% im Vergleich zu 26.7%, gebildet.

Außer einer Pflanze überlebten alle die Überführung ins Gewächshaus. Dabei zeigten zuvor *in vitro* bewurzelte Pflanzen einen signifikant größeren Durchmesser der Blattrosetten als unbewurzelte Exemplare. Jedoch ergab die Verwendung eines Mittels zum Transpirationsschutz (Envy<sup>®</sup>, Agro Best Australia, Nerang, Australia) weder größere Pflanzen noch eine höhere Überlebensrate (Tab. 7).

Tab. 7. Der Einfluß von vorheriger Bewurzelung und Transpirationsschutz auf das Auspflanzen von *T. peltatum*; Mittelwerte innerhalb einer Spalte, die mit dem gleichen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in Duncan's Test bei einer 5%-Schwelle

Wurzeln	Envy <sup>®</sup>	Mittlerer Durchmesser [cm]*	Überlebensrate [%]*
+	+	8.14 a	100
+	-	6.86 a	100
-	+	3.22 b	80
-	-	4.42 b	100

\*Mittelwert von fünf Pflanzen

Lediglich auf Medium ohne Phytohormonzusatz wurde keine Kallusbildung an Blattexplantaten (ca. 3 cm lange, voll entwickelte lanzettförmige Blätter) festgestellt. Alle anderen Behandlungen resultierten in Kalluswachstum (Abb. 32C), wobei der Prozentsatz der Explantate mit Kallus pro Gefäß mit abnehmender BAP-Konzentration zunahm. Diese Korrelation war auch für das mittlere Gewicht pro Gefäß gültig (Tab. 8).

Tab. 8. Der Einfluß der BAP-Konzentration auf die Kallusbildung von *T. peltatum* nach drei einmonatigen Passagen auf demselben Medium; Mittelwerte innerhalb einer Spalte, die mit dem gleichen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in Duncan's Test bei einer 5%-Schwelle

1/5 MS + Phytohormone [mg/l]		Explantate pro Gefäß mit Kallus [%]*	Mittleres Gewicht pro Gefäß [mg]*
BAP	NAA		
0.0	0.00	0.0 a	45.7 a
2.0	0.01	84.0 b	236.7 b
4.0	0.01	16.0 a	68.9 a
8.0	0.01	12.0 a	49.9 a

\* Mittelwert von 25 Explantaten, fünf Explantate pro Gefäß

Auf Medium angereichert mit 0.01 mg/l NAA und 2.0 mg/l BAP bildeten 84% der Explantate pro Gefäß Kallus. Auch das mittlere Gewicht der Explantate auf diesem Medium war signifikant erhöht.

Auf Medium, das mit 0.01 mg/l NAA und 2.0 mg/l BAP angereichert war, konnten wiederholt kleine (bis zu 5 cm lange) Drüsenblätter beobachtet werden (Abb. 33A, B), die an regenerierendem Kallus gebildet wurden. Trotz ihrer geringen Größe waren die Blätter voll funktionsfähig und produzierten Verdauungsenzyme, wie mit dem Filmtest<sup>[189, 190]</sup> nachgewiesen werden konnte (Abb. 33C). Mit diesem einfachen Test werden Proteasen dadurch nachgewiesen, daß sie die Gelatineschichten eines Filmstreifens abbauen können und so die einzelnen Farbschichten freigelegt werden.

Hingegen bildeten Pflanzen auf Anderson-Medium und auf Mangelmedien ausschließlich Blätter vom lanzettförmigen Jugendtyp. Die Pflanzen auf den Mangelmedien stellten nach *ca.* einem Jahr das Wachstum ein. Auf Medium ohne Stickstoff starben die Pflanzen dann schnell ab, während diejenigen auf Medium ohne Kalium weitere sechs Monate überlebten.

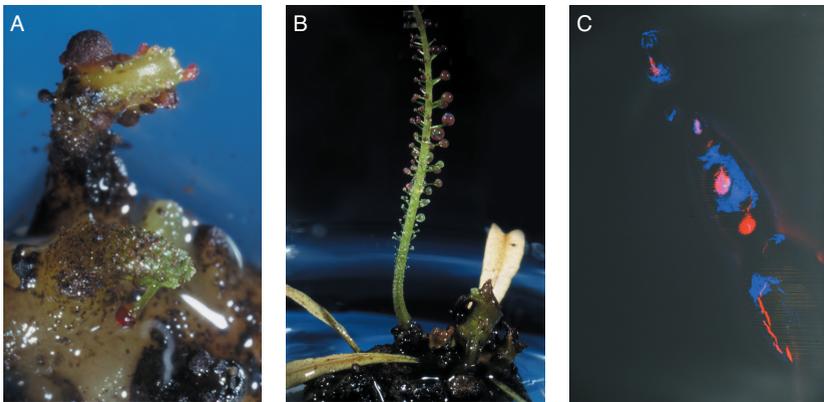


Abb. 33. *T. pellatum in vitro*: Entwicklung gestielter Drüsen (A); carnivores Blatt (B); Filmtest zur Visualisierung von Protease-Aktivität (C)

## 6 Untersuchungen zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten aus Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen

### 6.1 Biosynthese von Droseron (43) und Dioncophyllin A (4) in Kalluskulturen von *Triphyophyllum peltatum*

Mit der im Kapitel 5.3 beschriebenen Etablierung der Kalluskulturen von *Triphyophyllum peltatum* war nun erstmals eine Pflanzenart *in vitro* vorhanden, die als vielseitigster Produzent von Naphthylisochinolin-Alkaloiden gilt.<sup>[29, 25]</sup>

Zunächst wurde mit Kalluskulturen in Flüssigmedium gearbeitet.<sup>[191]</sup> Diese dreiwöchigen batch-Kulturen zeigten nach einer siebentägigen lag-Phase ein exponentielles Wachstum für Kallus, der von Festmedium in Flüssigmedium überführt worden war. Nach zwei Wochen nahm das Frischgewicht bei 52 mg/ml nicht mehr weiter zu. Das Frischgewicht hatte demnach in sieben Tagen um 25% zugenommen (Abb. 34).

Als Hauptmetabolit im Medium (1/5 MS mit 2 mg/l BAP und 0.01 mg/l NAA) konnte das Naphthochinon Droseron (43) detektiert werden, das bisher aus *Triphyophyllum* nicht bekannt war, aber in einer Reihe anderer Pflanzen gefunden wurde. Sein Vorkommen und das des ebenfalls nachgewiesenen Plumbagins (13) und Isoshinanolons (14) in anderen Arten der Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae, Nepenthaceae, Droseraceae und Plumbaginaceae steht im Einklang mit der engen Verwandtschaft dieser Familien.<sup>[117]</sup> Zusätzlich wurden diese Metabolite aber z.B. auch aus den weniger verwandten Ebenaceen bekannt (Tab. 9).

Tab. 9. Pflanzenarten, in denen bisher die Metabolite Plumbagin (13), Droseron (43) und Isoshinanolon (14) nachgewiesen wurden (ausgenommen *in vitro* Kulturen)

Familie	13	43	14
Ancistrocladaceae	<i>Ancistrocladus abbreviatus</i> , <sup>[26]</sup> <i>A. barteri</i> , <sup>[34]</sup> <i>A. cochinchinensis</i> , <sup>[37, 164]</sup> <i>A. heyneanus</i> <sup>[35]</sup>	<i>Ancistrocladus heyneanus</i> , <sup>[192]</sup> <i>A. robertsoniorum</i> <sup>[36]</sup>	<i>Ancistrocladus barteri</i> , <sup>[34]</sup> <i>A. cochinchinensis</i> , <sup>[37, 164]</sup> <i>A. heyneanus</i> <sup>[26]</sup>
Dioncophyllaceae	<i>Dioncophyllum thollonii</i> , <sup>[41]</sup> <i>Triphyophyllum peltatum</i> <sup>[30]</sup>	<i>Dioncophyllum thollonii</i> , <i>Habropetalum dawei</i> <sup>[25]</sup>	<i>Dioncophyllum thollonii</i> , <sup>[41]</sup> <i>Habropetalum dawei</i> <sup>[81]</sup>
Nepenthaceae	<i>Nepenthes rafflesiana</i> , <sup>[193]</sup> <i>N. thorelii</i> <sup>[194]</sup>	<i>Nepenthes rafflesiana</i> , <sup>[193]</sup> <i>N. thorelii</i> <sup>[194]</sup>	<i>N. thorelii</i> <sup>[194]</sup>
Drosophyllaceae	<i>Drosophyllum lusitanicum</i> <sup>[195]</sup>	-	-

Droseraceae	<i>Aldrovanda vesiculosa</i> , <sup>[195]</sup> <i>Dionaea muscipula</i> , <sup>[381]</sup> <i>Drosera</i> -Arten <sup>[196, 197, 198, 199, 200, 195, 201, 202]</sup>	<i>Dionaea muscipula</i> , <sup>[203]</sup> <i>Drosera peltata</i> , <sup>[204]</sup> <i>D. rotundifolia</i> , <sup>[196]</sup> <i>D. whittakeri</i> <sup>[205]</sup>	-
Plumbaginaceae	<i>Ceratostigma plumbaginoides</i> , <sup>[206]</sup> <i>C. willmottianum</i> , <sup>[207]</sup> <i>Dyerophytum africanum</i> , <sup>[208]</sup> <i>Plumbagella micrantha</i> , <sup>[206]</sup> <i>Plumbago auriculata</i> (syn. <i>P. capensis</i> ), <sup>[208]</sup> <i>P. europaea</i> , <i>P. indica</i> (syn. <i>P. rosea</i> ), <sup>[209]</sup> <i>P. pearsonii</i> , <sup>[208]</sup> <i>P. pulchella</i> , <i>P. scandens</i> , <sup>[210]</sup> <i>P. zeylanica</i> <sup>[209]</sup>	<i>Plumbago indica</i> (syn. <i>P. rosea</i> ), <sup>[211]</sup> <i>P. zeylanica</i> <sup>[212]</sup>	<i>Ceratostigma willmottianum</i> , <sup>[207]</sup> <i>Plumbago scandens</i> , <sup>[210]</sup> <i>P. zeylanica</i> <sup>[213]</sup>
Ebenaceae	<i>Diospyros canaliculata</i> , <i>D. ebenum</i> , <i>D. elliptifolia</i> , <i>D. gracilipes</i> , <i>D. hebecarpa</i> , <i>D. kaki</i> , <i>D. maritima</i> , <i>D. siamang</i> , <i>D. siderophora</i> , <i>D. walkeri</i> , <i>D. wallichii</i> , <sup>[214]</sup> <i>Aristea ecklonii</i> , <sup>[221]</sup> <i>A. alata</i> , <i>A. compressa</i> , <i>A. ensifolia</i> , <i>A. lugens</i> , <i>A. platycaulis</i> , <i>A. singularis</i> , <i>Phaiophleps acaule</i> , <i>Sisyrrinchium brachypus</i> , <i>S. californicum</i> , <i>Sparaxis tricolor</i> <sup>[222]</sup>	<i>Diospyros melanoxyton</i> , <sup>[215]</sup> <i>D. maritima</i> <sup>[216]</sup>	<i>Diospyros canaliculata</i> , <sup>[217]</sup> <i>D. maritima</i> , <sup>[218]</sup> <i>D. samoensis</i> , <sup>[219]</sup> <i>D. siamang</i> , <i>D. wallichii</i> <sup>[220]</sup>
Iridaceae		-	<i>Aristea ecklonii</i> <sup>[221]</sup>

Die verstärkte Abgabe von **43** ins Medium nach dem Überführen der Kalli in das Flüssigmedium ist als Streßantwort zu interpretieren (vgl. Kap. 6.2). In Vorversuchen verfolgte man zunächst den Verlauf des Droserongehaltes im Medium, um dann optimale Ergebnisse bei Fütterungsversuchen zu erhalten. Während der lag-Phase im Kalluswachstum stieg die Droseronkonzentration auf 2.1 mg/g Frischgewicht an und fiel dann innerhalb von sieben Tagen auf 1.8 mg/g, ohne sich im weiteren Verlauf noch signifikant zu ändern (Abb. 34).

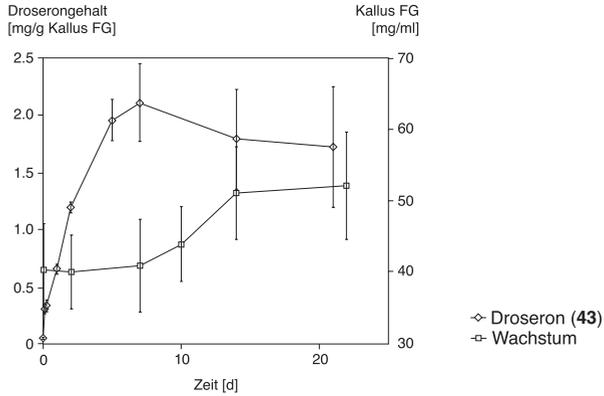
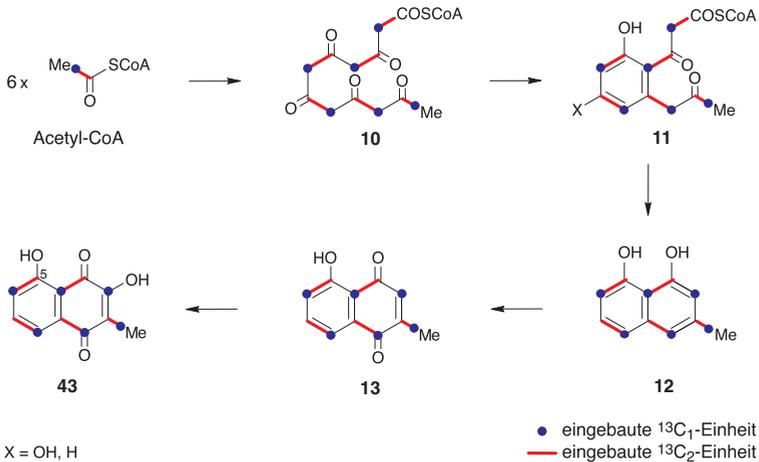


Abb. 34. Wachstumskurve und Droseronkonzentration im Flüssigmedium; die Balken zeigen die Standardabweichung (n = 3)

Nach achttägiger Inkubation der Kulturen mit [ $^{13}\text{C}_2$ ]-Natriumacetat konnten 0.7 mg **43** aus dem Medium isoliert und durch RP-MPLC gereinigt werden. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum waren Kopplungsmuster, wie sie für den Einbau von ganzen  $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten typisch sind, zu erkennen. Durch die genauere Analyse der  $^1J(\text{C}, \text{C})$ -Kopplungskonstanten (2- $\text{CH}_3/\text{C}-2$ , C-1/C-9, C-8/C-7, C-6/C-5, C-10/C-4 und C-3 isoliert) konnte die Faltung der ursprünglichen Polyketidkette zweifelsfrei festgelegt werden (Schema 5).



Schema 5. Biosynthese von Droseron (**43**) abgeleitet aus den Fütterungsversuchen mit [ $^{13}\text{C}_2$ ]-Natriumacetat und [ $2\text{-}^{13}\text{C}_1$ ]-Natriumacetat

Sie bestätigte die Bildung von **43** aus Essigsäurebausteinen, entsprechend Plumbagin (**13**) und Isoshinanolon (**14**) (vgl. Kap. 2.2). Auch findet offenbar eine *de-novo*-Synthese des Droserons statt. Dieses entstammt nicht möglichen vorgeformten Depotformen, wie z.B. einem Leucoglycosid,<sup>[203]</sup> 5-*O*-Glucosyl-Droseron,<sup>[196]</sup> oder gar Naphthylisochinolin, da es dann in unmarkierter Form vorliegen müßte.

Die Ganzpflanze von *Triphyphyllum* produziert das Naphthylisochinolin Dioncophyllin A (**4**) als Hauptmetabolit. Weder im Kallus noch im Medium der Flüssigkulturen war dies jedoch der Fall – Dioncophyllin A (**4**) wurde nur in Spuren detektiert. Wie durch HPLC-UV- und DC-Analyse herausgefunden wurde, sind die Verhältnisse in Kalli, die auf Festmedium kultiviert werden, den Ganzpflanzen ähnlicher, und Dioncophyllin A (**4**) ist tatsächlich das Hauptalkaloid. Oben beschriebener Versuch wurde nun also in modifizierter Form mit Kulturen auf Festmedien durchgeführt. Insgesamt 250 mg [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-Natriumacetat wurden portionsweise direkt als wäßrige Lösung auf die Kalli aufgetropft. In einer hervorragenden Kooperation mit Wohlfarth wurden nach zwei Monaten die Kalli extrahiert, und nach mehreren chromatographischen Reinigungsschritten konnten 1.7 mg Dioncophyllin A (**4**) erhalten werden. Erste <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchungen ergaben, daß zwar noch Verunreinigungen in der Probe waren, daß aber auch <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Einheiten intakt eingebaut worden waren.

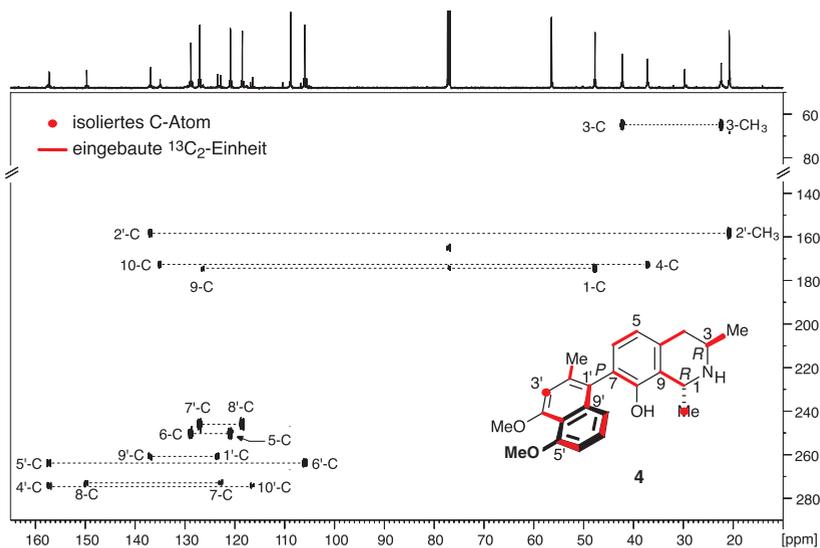
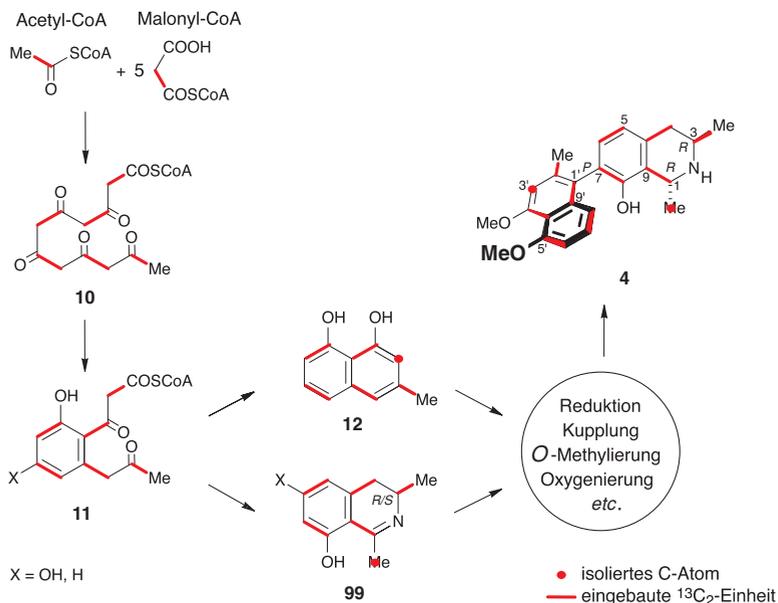


Abb. 35. 2D-INADEQUATE-Spektrum von **4** nach der Verfütterung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-Natriumacetat (Spektrenaufnahme durch Dr. M. Grüne und Auswertung durch M. Wohlfarth, Abb. mit freundlicher Genehmigung)

Um eine nochmalige Reinigung zu ermöglichen, mischte Wohlfarth der Probe 2.5 mg unmarkiertes Dioncophyllin A (**4**) zu und erhielt nach der Chromatographie 4 mg reines Dioncophyllin A (**4**). Da die Empfindlichkeit des hauseigenen DMX-600-NMR-Gerätes nicht ausreichte, wurde die Probe von Dr. M. Grüne bei der Firma Bruker Spektrospin mit einem DRX-500-Gerät, ausgestattet mit dem Prototyp eines  $^{13}\text{C}$ -sensitiven Dual-Kryoprobenkopfes, vermessen. Bei diesem Spektrometer wird das Störrauschen durch Kühlung der elektronischen Bauteile vermindert, was in diesem Fall eine ungefähre Verdoppelung der Meßempfindlichkeit bewirkte. Im 2D-INADEQUATE-Spektrum (Abb. 35) zeigten sich paarweise C-C-Korrelationen (3-CH<sub>3</sub>/C-3, C-4/C-10, C-5/C-6, C-7/C-8, C-9/C-1, 2'-CH<sub>3</sub>/C-2', C-4'/C-10', C-5'/C-6', C-7'/C-8', C-1'/C-9'). 1-CH<sub>3</sub> und C-3' besaßen keinen Kopplungspartner.

Die postulierte Biogenese der beiden Hälften der Naphthylisochinolin-Alkaloide (vgl. Kap. 2.2) wird durch den erzielten Einbau der Acetateinheiten erstmals nachgewiesen, die Hypothese damit voll bestätigt. Damit kann die Bildung von **4** als Beispiel für alle anderen Naphthylisochinolin-Alkaloide angesehen werden (Schema 6).<sup>[223]</sup>



Schema 6. Aus dem Verfütterungsversuch mit  $^{13}\text{C}_2$ -Natriumacetat abgeleitetes Biosyntheschema für Dioncophyllin A (**4**) stellvertretend für Naphthylisochinolin-Alkaloide

Weder aus dem Einbauexperiment in Droseron (**43**) noch in Dioncophyllin A (**4**) geht die Herkunft der isolierten C-Atome C-3 bzw. 1-CH<sub>3</sub> und C-3' zweifelsfrei hervor. Obgleich die Wahrscheinlichkeit äußerst gering ist, könnten diese aus anderen als den postulierten Quellen stammen. Um diese Atome im Verlauf der Biosynthese der genannten Metabolite verfolgen zu können, wurde wieder in Kooperation mit Wohlfarth [<sup>2-13</sup>C<sub>1</sub>]-Natriumacetat an Kalli auf Festmedium appliziert. Alle Versuchsparameter wurden entsprechend dem vorherigen Experiment beibehalten. Überraschenderweise zeigten 2.2 mg isoliertes Dioncophyllin A (**4**) keinerlei Einbau. Die Kalli hatten außerdem mehr Droseron (**43**) gebildet, das hingegen einen deutlichen Einbau an den zu erwartenden Positionen 2-CH<sub>3</sub>, C-3, C-6, C-8 und C-10 (Schema 5) zeigte. Offenbar sorgte ein unbekannter Einfluß auf die Kulturen im Verlauf dieses Fütterungsversuchs für eine Streßreaktion, die eine verstärkte Bildung des Naphthochinons Droseron (**43**) bewirkte, so daß während des gesamten Versuchszeitraumes aller Wahrscheinlichkeit nach überhaupt kein Dioncophyllin A (**4**) gebildet werden konnte. Dennoch darf dieses Resultat als ein weiterer Hinweis für die abgeleitete Biosynthese auch von Dioncophyllin A (**4**) gewertet werden, da die Einbaupositionen exakt in dieses Schema passen.

## 6.2 Elicitierungsversuche

Im Kapitel 6.1 wurde bereits angedeutet, daß Kalluskulturen von *Triphyophyllum* äußerst sensitiv auf Streß reagieren, indem sie verstärkt Naphthochinone bilden. In Flüssigkulturen lassen sich die Gehalte an Sekundärmetaboliten nach einer Elicitierung besonders gut verfolgen. Die Metabolite **13**, **14** und **43** werden auch ins Medium abgegeben, wo sie leicht detektierbar sind. Es muß jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß bei der Analyse aller Elicitierungsversuche die Diastereomere bzw. Enantiomere von Isoshinanolon (**14**, Abb. 36) nur in ihrer Gesamtheit erfaßt wurden, da zur Trennung aller vier Stereoisomere Säulen mit chiraler Festphase benötigt werden.<sup>[224, 225]</sup> Nach einer Untersuchung von Messer kommen im Flüssigmedium von *Triphyophyllum*-Kallus nur *cis*-3*R*,4*R*- (**14a**), *trans*-3*R*,4*S*- (**14b**) und *trans*-3*S*,4*R*-konfiguriertes (**14d**) Isoshinanolon vor.<sup>[226]</sup> Im Kallus findet man die genannten Metabolite zusammen mit Dioncophyllin A (**4**), welches nicht ins Medium abgegeben wird.

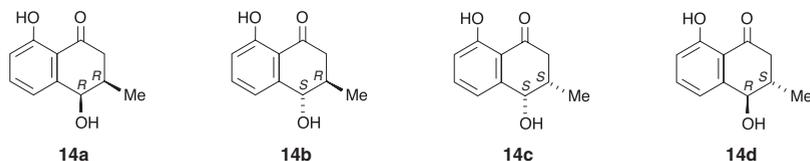


Abb. 36. Die vier stereoisomeren Formen von Isoshinanolon (**14**)

In Abbildung 37 sind die Gehalte der zwei genannten Naphthochinone (**13**, **43**) und des Tetralons Isoshinanolon (**14**) nach dem Überführen von Kalli in frisches Medium nach verschiedenen Zeitintervallen aufgetragen. Es wurden die Reaktionen von Kalli, die zuvor auf Festmedien kultiviert worden waren (neu überführter Kallus), mit Kalli verglichen, die sich bereits vorher in Flüssigkultur befunden hatten (adaptierter Kallus). Tendenziell war der Kurvenverlauf für Droseron (**43**) und Plumbagin (**13**) sehr ähnlich, allerdings übertraf die Konzentration von **43** die von **13** bis zu sechsfach. Die neu überführten Kalli begannen einen Tag nach dem Umsetzen, beide Metabolite verstärkt ins Medium abzugeben. Eine maximale Konzentration wurde nach sieben Tagen erreicht. Danach begannen die Gehalte wieder abzusinken. Für Isoshinanolon (**14**) wurde fast kein Unterschied zwischen neu umgesetzten und adaptierten Kalli festgestellt (Abb. 37). Offenbar reagierten die Zellen der adaptierten Kalli sehr viel heterogener als die der neu überführten Kalli mit der Abgabe von **13** und **43**. Wie ein Vergleich der Standardabweichungen zeigt, regte der Streß der ungewohnten Bedingungen bei letzteren die Zellen einheitlicher zur Abgabe an.

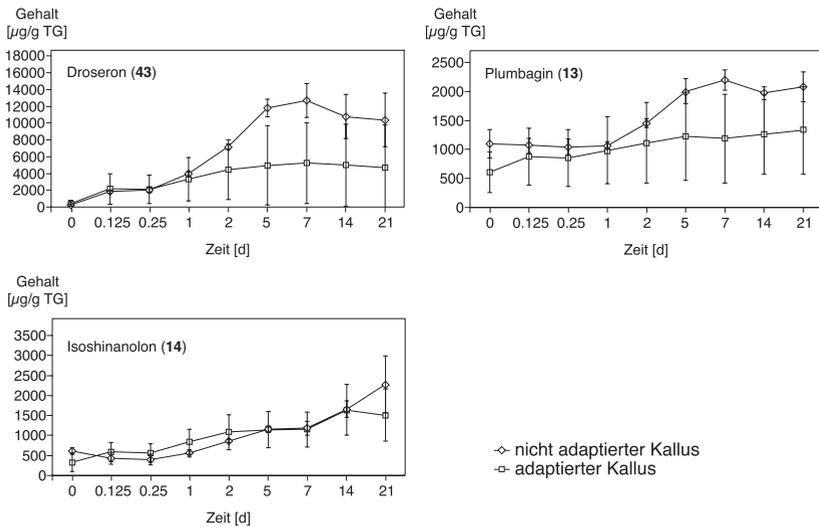


Abb. 37. Gehalte an extrazellulären Naphthochinonen nach dem Überführen von adaptierten und nicht adaptierten Kalli in Flüssigmedium

In weiteren Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob die Konzentrationen der Sekundärmetabolite, die im Sinne des Elicitor-Phytoalexin-Konzepts als Phytoalexine anzusprechen sind, durch Elicitierung mit Methyl-(±)-Jasmonat zu beeinflussen sind. Phytoalexine (griech. *Phyton* = Pflanze, *Alexis* = Abwehr) sind als niedermolekulare, antibiotisch wirksame Verbindungen definiert, die von Pflanzen als Antwort auf eine Infektion synthetisiert und akkumuliert werden.<sup>[227]</sup> Unter Elicitoren (lat. *elicere* = hervorlocken) versteht man im weitesten Sinne endogen oder exogen gebildete oder abiotische Substanzen, die eine physiologische Abwehrreaktion von Pflanzen gegen Streß oder Infektionen hervorufen.<sup>[228]</sup> Das phytopathologische Elicitor-Phytoalexin-Modell bezeichnet also neben dem hypersensitiven Zelltod eine weitere Möglichkeit der Pathogenabwehr bei Pflanzen. Methyljasmonat ist als systemisches Signal in der Streßtransduktionskette bekannt<sup>[229]</sup> und wirkt auf die Biosynthese des sekundären Messengers Ethylen,<sup>[230]</sup> das vielfältige regulierende Funktionen auf die Entwicklung und Seneszenz von Pflanzen hat. In früheren Arbeiten mit *Ancistrocladus heyneanus* konnte seine elicitierende Wirkung in Zellkulturen festgestellt werden.<sup>[174]</sup>

Zunächst sollte untersucht werden, ob verschiedene Konzentrationen von Methyljasmonat einen signifikanten Einfluß auf die Metabolitengehalte im Medium und im Kallus haben. Dazu wurden die Kulturen am siebten Tag nach dem Umsetzen mit unterschiedlichen Mengen Methyljasmonat versetzt und nach weiteren sieben Tagen die jeweiligen Gehalte der Sekundärmetabolite ermittelt. Nur im Falle von Plumbagin (**13**) zeigten sich signifikante Steigerungen der Konzentration im Medium für 50 oder 100 µM Methyljasmonat (Abb. 38A) und im Kallus für 100 oder 200 µM Methyljasmonat (Abb. 38B) im Vergleich zur Kontrolle. Die Plumbagin-Konzentration in den Kalli der Kontrolle entsprach ungefähr dem in der Literatur beschriebenen Wert von *in vitro* kultivierten Pflanzen von *Drosera madagascariensis*.<sup>[231]</sup> Für die weiteren Experimente zum zeitlichen Verlauf wurde deshalb eine Konzentration von 100 µM Methyljasmonat gewählt.

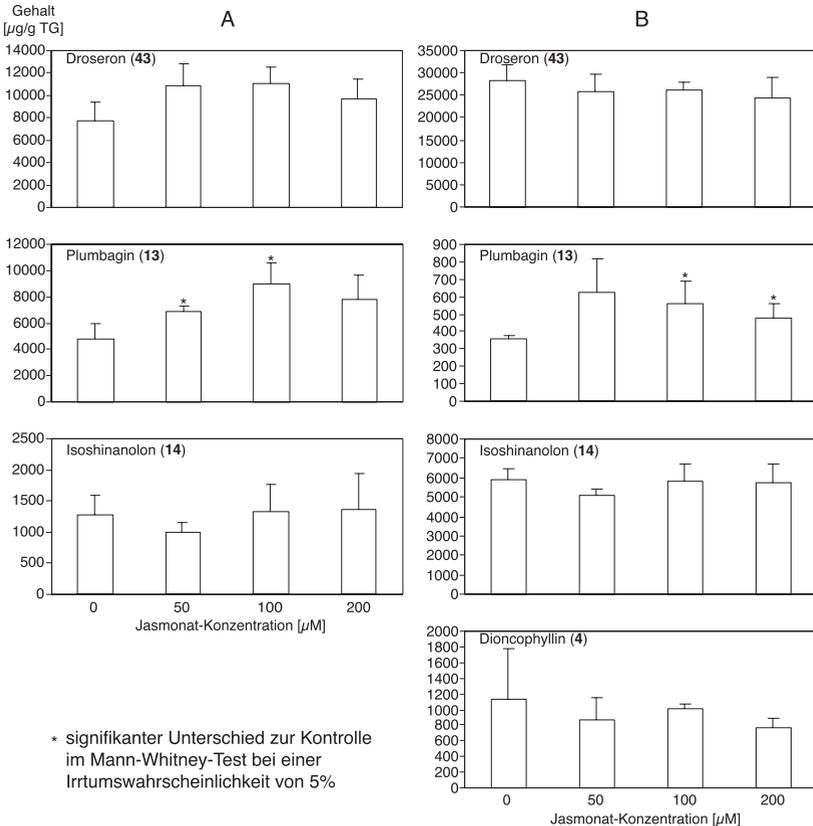


Abb. 38. Spezifische Gehalte von Droseron (**43**), Plumbagin (**13**) und Isoshinanolon (**14**) im Medium (A) und von **43**, **13**, **14** und Dioncophyllin A (**4**) im Kallus (B) nach Elicitierung mit verschiedenen Konzentrationen von Methyljasmonat; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung ( $n = 3$ )

In weiteren Versuchen wurde der Einfluß des Zeitpunktes der Zugabe des Elicitors untersucht. Jeweils im Vergleich zur Kontrolle wurde entweder sieben Tage oder 14 Tage nach dem Umsetzen Methyljasmonat zugegeben. Bei den elicitierten Kulturen konnte fast immer eine nahezu kontinuierliche Gehaltszunahme festgestellt werden. Im Medium konnte bei einer Zugabe sieben Tage nach dem Umsetzen für Droseron (**43**) und Plumbagin (**13**) eine unmittelbare Konzentrationssteigerung beobachtet werden, die sich nach zwei Tagen noch erhöhte (Abb. 39A). Bei einer Zugabe 14 Tage nach dem Umsetzen war die Droseronkonzentration im

Medium erst nach zwei Tagen höher als bei der Kontrolle, während bereits nach sechs Stunden in der elicitierten Probe mehr Plumbagin (**13**) im Medium war als bei der Kontrolle (Abb. 39B). Der Gehalt an Isoshinanolon (**14**) zeigte bei beiden Versuchen nur unwesentliche Abweichungen gegenüber der Kontrolle.

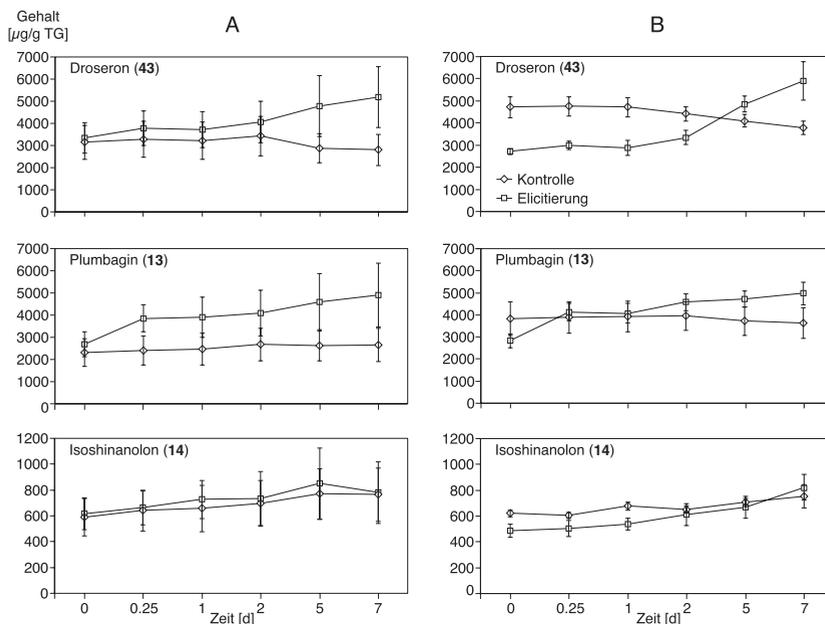


Abb. 39. Spezifische Gehalte von Droseron (**43**), Plumbagin (**13**) und Isoshinanolon (**14**) im Medium nach Elicitierung mit 100 µM Methyljasmonat sieben Tage (A) und 14 Tage (B) nach dem Umsetzen; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n = 3)

Im Kallus wurden generell höhere Konzentrationen von Droseron (**43**) und Isoshinanolon (**14**) gefunden als im Medium, während der Gehalt an Plumbagin (**13**) im Kallus geringer war als im Medium. Dioncophyllin A (**4**) wurde nur im Kallus gefunden. Die Kinetiken der im Kallus gefundenen Metabolitkonzentrationen (Abb. 40) unterschieden sich klar von denen im Medium.

Der Droserongehalt der elicitierten Kulturen lag in beiden Fällen zunächst unter dem der Kontrolle. Bei der Kultur, die nach sieben Tagen elicitiert wurde, überschritt die Droseronkonzentration bereits nach einem Tag den der Kontrolle, während der Kontrollwert bei der später elicitierten Kultur erst am siebten Tag erreicht wurde. Plumbagin (**13**) war im ersten Versuch schon nach sechs Stunden stärker akkumuliert als in der Kontrolle. Auch hier war die Kultur, die nach 14 Tagen

eliciert wurde, langsamer und konnte den Kontrollwert an Plumbagin (**13**) erst nach zwei Tagen überschreiten. Die Isoshinanolongehalte der elicierten Kulturen unterschieden sich im Kallus, wie bereits schon für das Medium gezeigt, nicht deutlich von dem der Kontrollen, allerdings lagen auch hier die Ausgangswerte unter denen der Kontrollen. Für Dioncophyllin A (**4**) war die Situation anders. Zum Meßbeginn lagen die Konzentrationen in den elicierten Kalli weit über denen der Kontrollen. Nach sechs Stunden fiel die Konzentration in beiden Versuchen ab, um aber nach zwei Tagen wieder stark anzusteigen.

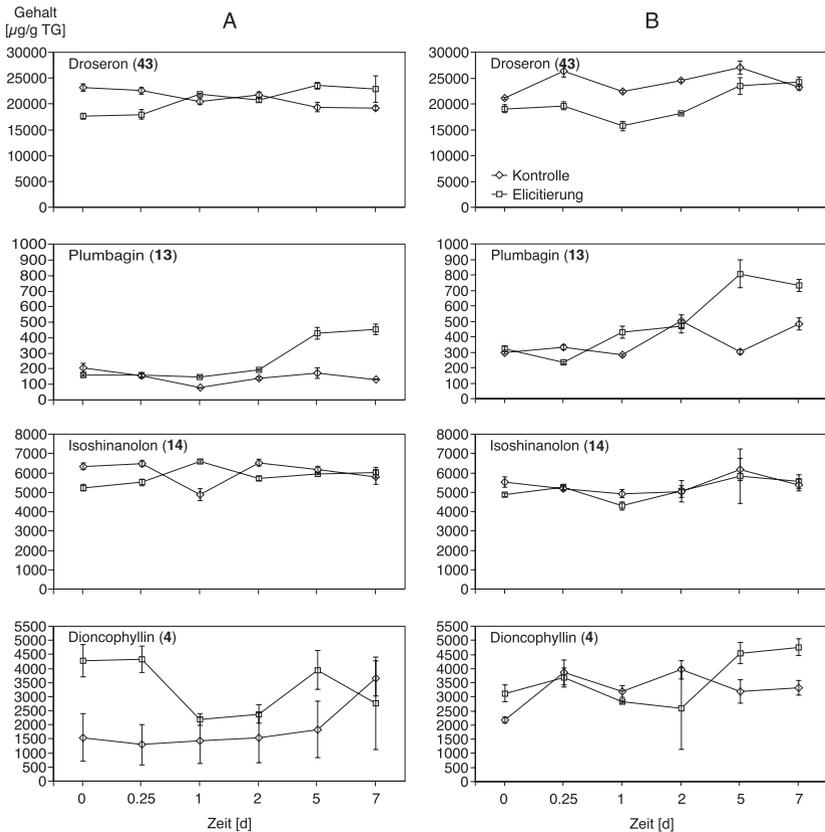


Abb. 40. Spezifische Gehalte von Droseron (**43**), Plumbagin (**13**), Isoshinanolon (**14**) und Dioncophyllin A (**4**) im Kallus nach Elicitation mit 100 µM Methyljasmonat sieben Tage (A) und 14 Tage (B) nach dem Umsetzen; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n = 3)

Offenbar war die Bildung von Dioncophyllin A (**4**) kurzfristiger als die der Naphthochinone. Während letztere nach sechs Stunden verstärkt gebildet werden, geht die Konzentration von Dioncophyllin A (**4**) dann sogar stark zurück. Was in dieser Zeit mit dem Dioncophyllin A (**4**) geschieht, kann zwar aus den Versuchen nicht abgeleitet werden, doch liegt die Vermutung nahe, daß es auf irgendeine Art und Weise abgebaut wird. Verfütterungsversuche (vgl. Kap. 6.1) haben jedoch gezeigt, daß z.B. Droseron (**43**) *de novo* und nicht aus Abbauprodukten von Naphthylisochinolinalkaloiden synthetisiert werden. Der allgemeine Anstieg aller Metabolitkonzentrationen nach zwei Tagen deutet möglicherweise auf eine vorangegangene lag-Phase in der Enzymsynthese hin.

Die Versuche zeigen deutlich, daß die untersuchten Metabolite Droseron (**43**), Plumbagin (**13**), Isoshinanolon (**14**) und Dioncophyllin A (**4**) Phytoalexine darstellen, deren Gehalte durch Elicitierung mit Methyljasmonat beeinflussbar sind. Außer bei **4** handelt es sich um Streßmetabolite, die bereits bei einem Wechsel der Kulturbedingungen verstärkt gebildet werden. Speziell Plumbagin (**13**) und Droseron (**43**) werden dabei auch aus den Zellen ausgeschleust. Die signifikant verstärkte Bildung von Dioncophyllin A (**4**) konnte leider auch in diesem *Triphyophyllum-peltatum*-System, entsprechend den früheren Versuchen mit *Ancistrocladus heyneanus*,<sup>[174]</sup> nicht durch Elicitierung angeregt werden.

### 6.3 Physiologische Untersuchungen mittels künstlicher Chimären

Unter Chimären (griech. *Chimaira* = Ungeheuer) versteht man Individuen oder Organe, die erblich aus verschiedenen Geweben aufgebaut sind. Dies kann durch Mutationen, Zellfusionen, Störungen der Mitose oder Pfropfungen verursacht sein.

#### *Klassische Pfropfung:*

Bei vielen verholzenden Nutzpflanzen, wie z.B. *Citrus* oder *Vitis*, dient die Veredlung durch Pfropfung standardmäßig der Abwehr von Viren oder Schädlingen. Eine Pfropfung kann aber auch der Aufklärung histologischer oder physiologischer Fragen dienen.<sup>[232]</sup>

Bislang konnte trotz einiger Untersuchungen mit modernen Methoden wie HPLC-MS/MS<sup>[42]</sup> oder *in-vivo*-NMR<sup>[233]</sup> weder der Bildungsort der Naphthylisochinolin-Alkaloide in *Ancistrocladus*-Pflanzen festgestellt noch deren Transport zwischen verschiedenen Organen beobachtet werden. Ein Pfropfexperiment, das die natürliche Diversität der Naphthylisochinolin-Typen nutzt, sollte zur Klärung dieser Fragen beitragen. Dabei wurde versucht, atypische Alkaloide im jeweils 'fremden' Pflanzenteil zu suchen. Als Untersuchungsobjekte boten sich die afrikanische Art *A. abbreviatus* und die indische Art *A. heyneanus* an, die beide im Gewächshaus zur Verfügung standen.

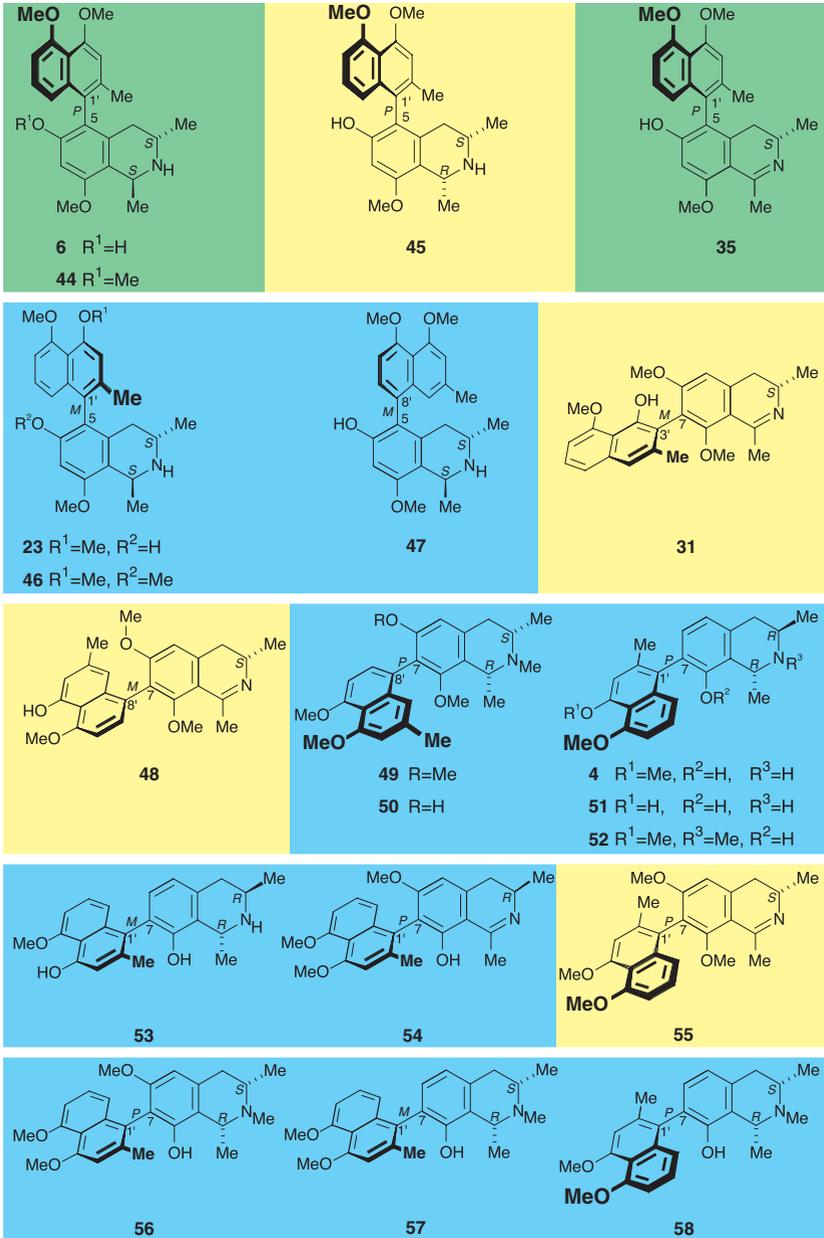


Abb. 41. Aus *A. abbreviatus* (■) und *A. heyneanus* (■) bekannte Naphthylisochinolin-Alkaloide; Vorkommen in beiden Arten (■)

*A. abbreviatus* beinhaltet zusätzlich zu Naphthylisochinolinen mit 3*S*-Konfiguration ('Ancistrocladaceae-Typ' und 'Inverser Hybrid-Typ') als Hauptalkaloide solche mit 3*R*-Konfiguration ('Dioncophyllaceae Typ' und 'Hybrid Typ') und unterscheidet sich damit generell von *A. heyneanus*, von dem nur Alkaloide mit 3*S*-Konfiguration bekannt sind (Abb. 41).

In einem Pfropfversuch wurden die Sproßoberteile der beiden als Jungpflanzen im Gewächshaus vorhandenen Arten auf eine Unterlage der jeweils anderen Art gepfropft. Vermutlich aufgrund des stärkeren Wachstums überlebte nur die Kombination mit der *A.-abbreviatus*-Unterlage (Abb. 42). Mittlerweile hat sich die Pflanze sehr gut entwickelt und bereits die charakteristischen Hakenäste gebildet.

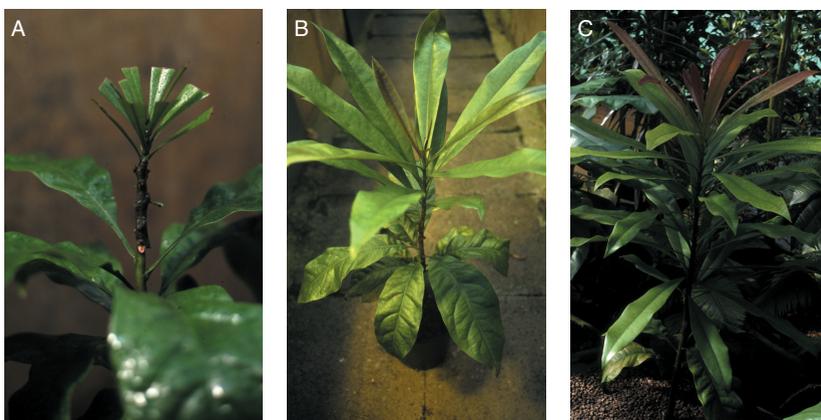


Abb. 42. Pfropfreis von *A. heyneanus* auf der Unterlage *A. abbreviatus* kurz nach der Pfropfung im August 1998 (A), Januar 1999 (B) und November 1999 (C)

Extrakte der neu entwickelten Blätter des Pfropfreises (*A. heyneanus*) wurden zunächst von Michel oxidativ abgebaut<sup>[234, 235, 236]</sup> und anschließend auf Abbauprodukte von 3*R*- oder 3*S*-konfigurierten Naphthylisochinolinen mittels GC-MS-Analyse untersucht. Da sich kein Unterschied zwischen Pfropfreis und Originalpflanze zeigte, führte Wohlfarth<sup>[168]</sup> daraufhin hochsensitive HPLC-MS/MS-Analysen durch, mit denen auch Alkaloide vom inversen Hybridtyp detektierbar sind. Neben den potentiell aus *A. abbreviatus* stammenden Metaboliten sollte dabei auch nach evtl. neugebildeten Alkaloiden gesucht werden. Ein unbekanntes, zunächst nur im Reis gefundenes, allerdings 3*S*-konfiguriertes, Naphthylisochinolin-Alkaloid schien einen solchen neugebildeten Metaboliten darzustellen. In weiteren Untersuchungen durch Dreyer<sup>[166]</sup> auch von *A. heyneanus* stellte sich jedoch heraus, daß es sich bei diesem tatsächlich neuen Alkaloid um 3-*epi*-Ancistrobrevin C (3*S*-Epimer von **54**) handelt, das bereits in der ungepfropften Pflanze vorkommt aber

zuvor nicht entdeckt worden war. In früheren Arbeiten gab es zusätzlich Hinweise auf ein Vorkommen dieses Alkaloids sogar in *A. abbreviatus*, obwohl es damals nicht zu isolieren war.<sup>[237]</sup>

Der fehlende Nachweis eines Transportes von Naphthylisochinolin-Alkaloiden von der Basis der Pflanze nach oben mit den geschilderten Experimenten als auch in früheren Ansätzen könnte bedeuten, daß diese Metabolite in den Blättern selbst gebildet werden, da ein einfaches Versagen der Nachweismethoden eher unwahrscheinlich ist. Die Untersuchung anderer Pfropfkombinationen könnte weitere Aufschlüsse liefern.

#### *Mikropfropfung in vitro:*

Die Durchführung möglichst vieler verschiedener Pfropfkombinationen wird in der Praxis durch ein Fehlen ähnlich großer Pflanzen verschiedener Arten behindert. Bedingt durch die unterschiedlich lange Kulturdauer der Pflanzen im Gewächshaus sind die Individuen der einzelnen Arten meist nur jeweils einer bestimmten Größenklasse zuzuordnen und daher miteinander in punkto Sproßdurchmesser nicht kompatibel. Abhilfe schafft die Nutzung von *in vitro* gezogenen Pflanzen, die durch regelmäßiges Umsetzen und Zurückschneiden kleingehalten werden und dadurch auch einen ähnlichen Sproßdurchmesser besitzen.<sup>[238]</sup> Wenn die Pfropfung selbst unter sterilen Bedingungen durchgeführt wird<sup>[239, 240]</sup> und die Pflanzen axenisch weiterkultiviert werden, ist auch das Verwachsen der Schnittstelle problemloser, und es sind weniger Ausfälle zu erwarten. Dies bestätigte sich experimentell tatsächlich, denn alle Kombinationen überlebten (Abb. 43). Wie Abb. 43C zeigt, sind sogar interfamiliäre Kombinationen möglich, was durch den ähnlichen Holzaufbau von Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen erklärbar ist.<sup>[102]</sup>

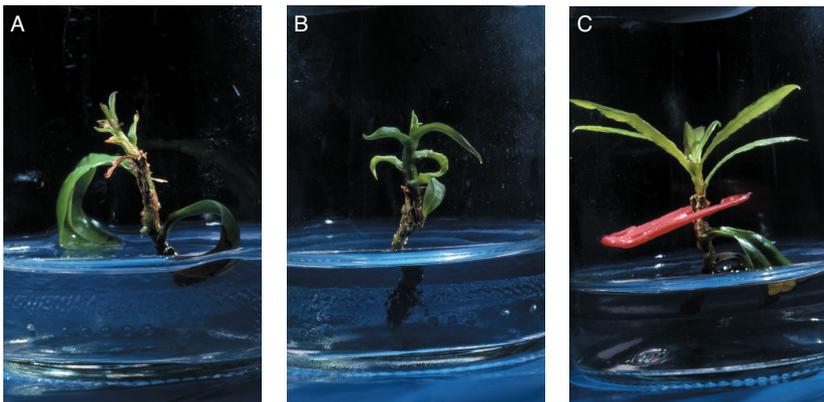


Abb. 43. Experimentell durchgeführte Pfropfkombinationen *in vitro* (jeweils Reis / Unterlage): *A. heyneanus* / *A. abbreviatus* (A), *A. barteri* / *A. abbreviatus* (B) und *T. peltatum* / *A. abbreviatus* (C)

Die vorgestellten *in-vitro*-Mikropfropfungen können nur Vorversuche darstellen. Für eine phytochemische Untersuchung der Pflanzen, müßten diese zunächst nach beschriebenen Protokollen *in vitro* bewurzelt<sup>[175, 187]</sup> und nach dem Auspflanzen im Gewächshaus großgezogen werden. Dies erscheint praktikabel und aussichtsreich für weitere Untersuchungen zum Stofftransport, wird aber noch Zeit benötigen.

## 7 Systeme für die Untersuchung der Bioaktivität von Sekundärmetaboliten

### 7.1 Etablierung eines Tests auf allelopathische Aktivität

Im Kapitel 6.2 wurde beschrieben, wie pflanzliche Zellen auf verschiedene Reize hin chemisch reagieren. Diese Reaktionen wurden im Sinne des Elicitor-Phytoalexin-Modells als physiologische Abwehrmaßnahmen gegen Phytopathogene gedeutet. Jedoch können Pflanzen auch chemisch das Wachstum, die Gesundheit oder das Verhalten von konkurrierenden Arten beeinflussen. Diesen chemoökologischen Spezialfall nennt man Allelopathie (griech. *Allélon* = gegenseitig, *Pathé* = Einwirkung) und versteht darunter allgemein die wechselseitige biochemische Beeinflussung von Pflanzen mittels chemischer Substanzen.<sup>[241]</sup> Als klassisches Beispiel gilt die phytotoxische Beeinflussung von Tomaten (*Lycopersicon esculentum*) durch Walnußbäume (*Juglans regia*).<sup>[242]</sup> Mittlerweile sind 1,4-Naphthochinone, die in *Juglans* als Glycosid vorliegen,<sup>[243]</sup> als aktives Prinzip identifiziert worden, und es lag daher nahe, Plumbagin (**13**) als allelopathische Testsubstanz auszuwählen, zumal bereits von seiner keimungshemmenden Wirkung berichtet worden war.<sup>[244]</sup> Aus der Klasse der Naphthylisochinolin-Alkaloide wurde Dioncophyllin A (**4**) als mengenmäßig gut verfügbare Substanz herangezogen. Der Testorganismus war Gartenkresse (*Lepidium sativum*), dessen Keimungsrate und Wachstum unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle untersucht wurden.

Plumbagin (**13**) hemmte in Konzentrationen von 250 und 500 ppm die Keimung der Samen fast völlig. Für Dioncophyllin A (**4**) war dies bei keiner Konzentration zu beobachten. Beide Substanzen beeinflussten deutlich das Wachstum der Kresse. Im Falle von Plumbagin (**13**) zeigte sich eine klare Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 44).



Abb. 44. Typische *Lepidium*-Sämlinge bei verschiedenen Plumbaginkonzentrationen; Skala in [cm]

Ab einer Konzentration von 63 ppm wurde sowohl das Hypokotyl- als auch das Wurzelwachstum durch Plumbagin (**13**) signifikant gehemmt. Die Wirkung von Dioncophyllin A (**4**) war weit uneinheitlicher. Das Hypokotylwachstum wurde nur bei 125 ppm und das Wurzelwachstum bei 500 ppm signifikant gehemmt. Bei niedrigen Konzentrationen von 31 und 63 ppm erschien das Wurzelwachstum sogar verstärkt, obgleich dieses Verhalten statistisch nicht signifikant war (Abb. 45).

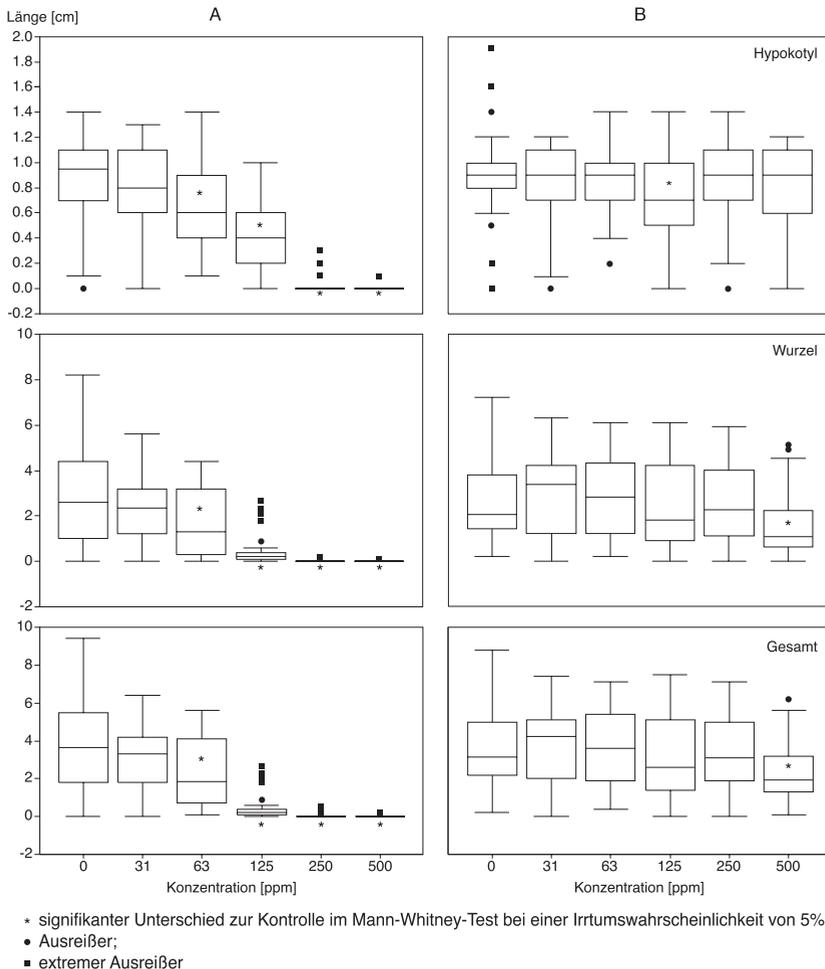


Abb. 45. Boxplots der Hypokotyl-, Wurzel- und Gesamtlänge von *Lepidium sativum* unter dem Einfluß von verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen Plumbagin (**13**) (A) und Dioncophyllin A (**4**) (B); die Balken zeigen die Extremwerte an (n = 50)

Für Plumbagin (**13**) konnte durch den beschriebenen Versuch eindeutig eine allelopathische Aktivität abhängig von der Konzentration bestätigt werden. Dioncophyllin A (**4**) fungierte in dem getesteten Konzentrationsbereich nicht als allelopathisch wirksame Substanz. Möglicherweise spielt seine geringere Wasserlöslichkeit und vor allem seine weit schwächere Reaktivität hierfür eine entscheidende Rolle. Außerdem wird Dioncophyllin A (**4**) im Gegensatz zu Plumbagin (**13**) von Pflanzenzellen zumindest unter *in-vitro*-Bedingungen nicht nach außen abgegeben (vgl. Kap. 6.2).

## 7.2 Hemmhoftest zur Untersuchung der antibakteriellen Aktivität

Analog zum Versuch, der in Kapitel 9.5 für *Antidesma* beschrieben ist, versuchte man, Blätter von *Ancistrocladus abbreviatus* und *Triphyophyllum peltatum* mit Wildtypstämmen von *Agrobacterium rhizogenes* zu transformieren, um Wurzelkulturen zu erhalten. Trotz der Variation der Cokulturdauer und weiterer Parameter konnten in keinem Fall Kulturen erhalten werden, die auf eine Transformation zurückzuführen waren. Die Explantate starben nach und nach ab, ohne Wurzeln oder Kallus an den Verwundungstellen der Infektion gebildet zu haben. Diese Beobachtungen deckten sich mit Versuchen von Pokorny.<sup>[245]</sup> Somit lag die Vermutung nahe, daß von den Pflanzen antibakterielle Substanzen gebildet worden waren, die eine Infektion vereitelten. Diese Hypothese sollte mit dem Streßmetabolit Plumbagin (**13**) und dem Hauptalkaloid Dioncophyllin A (**4**) getestet werden. Tatsächlich zeigten sich im Hemmhoftest für beide Agrobacterienstämme deutliche Inhibitionszonen um die Testscheiben (Abb. 46).

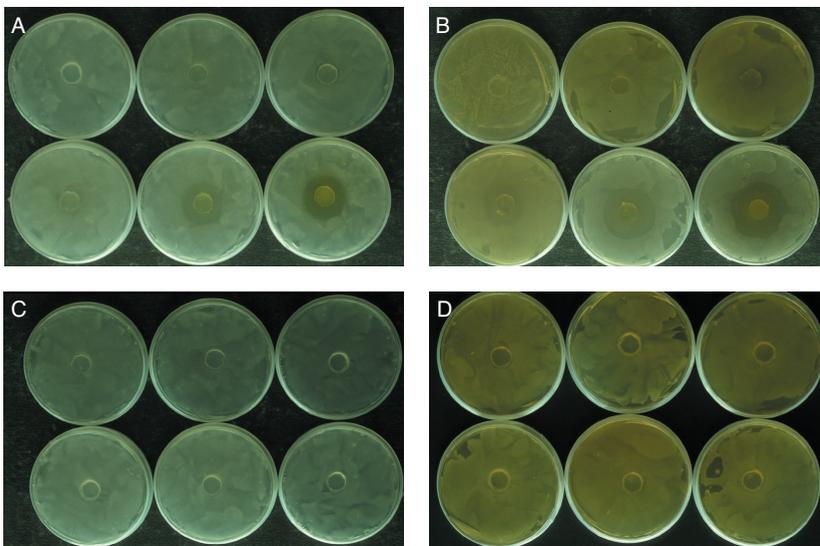


Abb. 46. Hemmhoftest mit *Agrobacterium rhizogenes*: DSMZ 30200 mit 0–500 ppm Plumbagin (**13**) (A); ATCC 15834 mit 0–500 ppm **13** (B); DSMZ 30200 mit 0–500 ppm Dioncophyllin A (**4**) (C); ATCC 15834 mit 0–500 ppm **4** (D)

Der Effekt war klar konzentrationsabhängig (Tab. 10). Plumbagin (**13**), das auch gegen andere grampositive und -negative Bakterien aktiv ist,<sup>[246]</sup> wirkt in dem untersuchten Konzentrationsbereich stärker gegen beide Stämme als Dioncophyllin A (**4**). Der Stamm DSMZ 30200 ist widerstandsfähiger gegen beide Substanzen als ATCC 15834.

Tab. 10. Aktivität von Plumbagin (**13**) und Dioncophyllin A (**4**) gegen *Agrobacterium rhizogenes*

Substanz	<i>Agrobacterium</i> -Stamm	Konzentration [ppm] / Hemmhof [mm]					
		0	31	63	125	250	500
<b>13</b>	DSMZ 30200*	0	1	2	4	8	10
<b>13</b>	ATCC 15834*	0	1	3	8	12	14
<b>4</b>	DSMZ 30200*	0	0	0	0	0	1
<b>4</b>	ATCC 15834*	0	0	0	0	1	1

\*Testscheibe außer bei der Kontrolle nie überwachsen

## 8 Nepenthaceae

Die Familie der Nepenthaceae umfaßt nur die Gattung *Nepenthes* mit ca. 82 Arten,<sup>[247]</sup> die schwerpunktmäßig in Südostasien verbreitet sind, aber auch von Madagaskar bis Neukaledonien und Nordindien vorkommen. Im Jugendstadium handelt es sich um niedrige Rosettenpflanzen. Später bilden die meisten Arten Langtriebe (Abb. 47B), die bis zu 20 m hoch als Lianen in die Bäume ranken. Alle Arten sind carnivor.<sup>[65]</sup> Die Pflanzen nutzen ihre zu Fallgruben umgestalteten Blätter, sog. Ascidien, zum Tierfang (Abb. 47A).

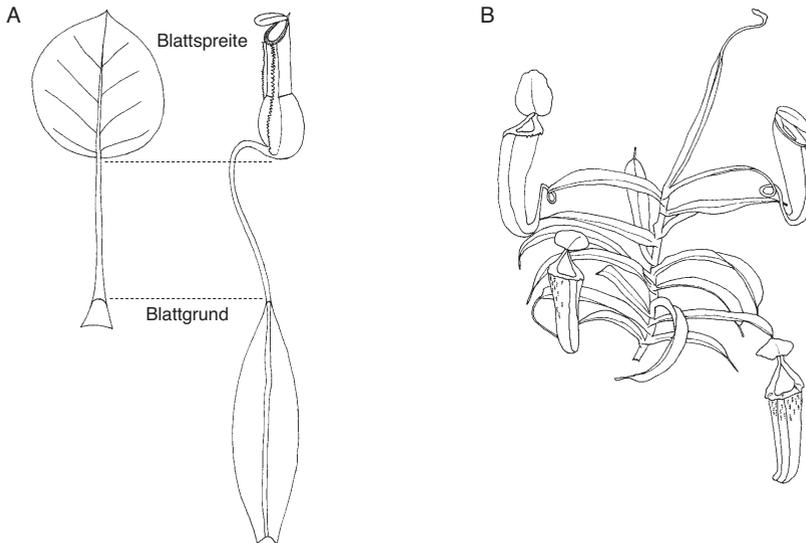


Abb. 47. Architektur eines *Nepenthes*-Blattes im Vergleich zu einem typischen Laubblatt (A); Habitus einer Pflanze (B)

Die Beute, meist Arthropoden, wird durch Nektar, der von Drüsen um das Peristom und am Operculum abgeschieden wird, angelockt. Beim Fressen verlieren die Insekten auf dem glatten Kragen den Halt und fallen in die Kanne, deren oberer Teil innen mit dachziegelartig angeordneten Wachsplättchen ausgekleidet ist, die ein Entkommen unmöglich machen. Am Boden der Kanne befindet sich ein wäßriges Sekret, in dem die Beute schnell ertrinkt. Enzyme, die von der Pflanze in die Flüssigkeit abgegeben werden, zersetzen die Opfer<sup>[248]</sup> – in der Natur unterstützt durch die Infauna, d.h. Organismen, die speziell an die Bedingungen in diesem Lebensraum angepaßt sind und z.T. obligat hier leben.<sup>[249]</sup> In einer zweiten Funktion<sup>[250]</sup> der Sekretionsdrüsen absorbieren die Pflanzen die zu kleinen Molekülen abgebauten Nährstoffe wie Aminosäuren und Ionen.<sup>[251]</sup>

## 8.1 Phytochemie von *Nepenthes*

Phytochemisch sind *Nepenthes* durch Naphthochinone charakterisiert. Das Vorkommen dieser Substanzen stützt die taxonomische Eingruppierung nahe den Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen (vgl. Kap. 3). Obwohl bisher nur zwei Arten hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe ausführlich untersucht worden sind, ließen sich doch bereits neun Metabolite isolieren. Dies sind Plumbagin (**13**), Droseron (**43**), Hydroxydroseron (**59**), Nepenthon A (**61**), C (**62**), D (**63**) und E (**64**) aus Wurzeln von *Nepenthes rafflesiana* (Abb. 48).<sup>[193, 252]</sup> Eine weitere Substanz – Nepenthon B genannt – die als gelbe Nadeln anfiel, konnte nicht aufgeklärt werden. Aus den Wurzeln von *N. thorelii* sind Isoshinanolon (**14a**), Plumbagin (**13**), Droseron (**43**) und 2-Methylnaphptazarin (**60**) bekannt geworden (Abb. 48), Naphthochinonderivate, die z.T. gegen Malaria aktiv sind.<sup>[194]</sup>

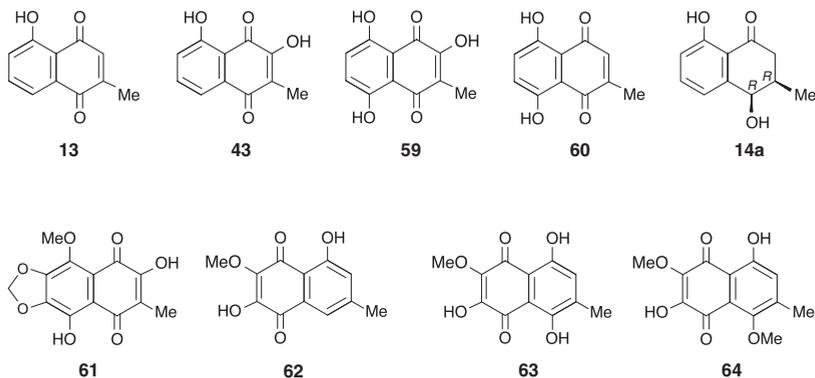


Abb. 48. Beschriebene Sekundärmetabolite aus *N. rafflesiana* und *N. thorelii*

Weitere chemische Isolierungsarbeiten an anderen Arten konzentrierten sich auf relativ ubiquitäre Substanzen. In *N. x mixta* fand man Carotenoide,<sup>[253]</sup> in *N. albomarginata* und *N. sanguinea* freie und veresterte Steroide sowie Wachsalkohole<sup>[254]</sup> und in *N. distillatoria*, *N. x chelsonii* und *N. x morganiana* konnte man Leucocyandin und Flavonole nachweisen.<sup>[255]</sup>

## 8.2 Metabolite aus *in-vitro*-Kulturen von *Nepenthes insignis*

Aus steril kultivierten Pflanzen von *N. insignis* konnten in eigenen Arbeiten drei Sekundärmetabolite isoliert und strukturell aufgeklärt werden.<sup>[256]</sup> Die jeweiligen Ausbeuten sind in Tabelle 33 aufgeführt. Neben Plumbagin (**13**), das bereits aus anderen *Nepenthes* bekannt ist (vgl. Kap. 8.1) und das in den verwandten Ancistrocladaceen, Dioncophyllaceen (vgl. Kap. 3), Droseraceen und Plumbaginaceen, aber auch in Ebenaceen und Monokotyledonen wie den Iridaceen vorkommt,<sup>[209, 257]</sup> konnten erstmals zwei Naphthochinon-Glucoside in *Nepenthes* nachgewiesen werden. Rossolisid (**65**) (Abb. 49) ist aus mehreren Arten von Droseraceen bekannt. Es wurde in *Drosera rotundifolia*,<sup>[258]</sup> *D. spathulata*<sup>[259]</sup> und *D. intermedia*<sup>[260]</sup> gefunden. Plumbasid A (**66**) (Abb. 49) ist aus *Ceratostigma minus* (Plumbaginaceae)<sup>[207]</sup> sowie aus den Droseraceen *Dionaea muscipula*,<sup>[261, 203]</sup> *Drosera rotundifolia*,<sup>[262]</sup> *D. intermedia*<sup>[260]</sup> und *D. gigantea*<sup>[263]</sup> bekannt. Das Vorkommen der beiden Glucoside ist ein weiterer Hinweis für die enge phylogenetische Verwandtschaft mit den genannten Familien.

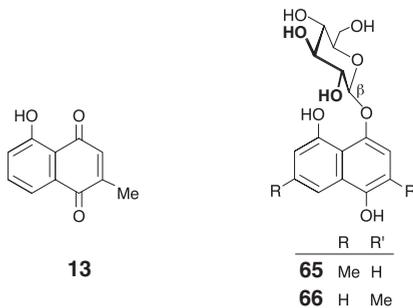


Abb. 49. Plumbagin (**13**), Rossolisid (**65**) und Plumbasid A (**66**) aus steril kultivierten *N. insignis*

## 8.3 Vorstufenverfütterung *in vitro* unter Ausnutzung der Carnivorie

Fleischfressende Pflanzen besitzen neben weiteren Aspekten des Carnivorie-Syndroms die Fähigkeit, über ihre Fangorgane Nährsubstanzen aus ihrer Beute aufzunehmen.<sup>[65]</sup> Da insbesondere Aminosäuren resorbiert werden, kann dies für eine äußerst schonende Einschleusung von markierten Biosynthesestufen ausgenutzt werden. Wenzel versuchte mit diesem Konzept, während der kurzen carnivoren Phase (vgl. Kap. 5.1) L-Alanin als 'maskierte' Vorstufe von Acetyl-CoA in *Triphyophyllum peltatum* einzubringen.<sup>[66]</sup> Aufgrund der begrenzten Zugänglichkeit der Pflanzen im Freiland und der relativ empfindlichen Blätter von *T. peltatum* war dem Versuch ein enger Rahmen gesteckt und eindeutig markierte Sekundärmetabolite konnten nicht

isoliert werden. Bei *Nepenthes* sind die morphologischen Verhältnisse günstiger einzuschätzen: Die Fallen sind urnenförmig und lassen eine Applikation von größeren Volumina über eine längere Zeit zu. Um jegliche Wechselwirkungen mit mikrobiellen Aktivitäten auszuschließen, wurden in zwei Versuchsreihen potentielle Abbauprodukte tierischer Beute, L-Alanin und Acetat, in stabilisotopen-markierter Form direkt in die Fangorgane steril kultivierter *Nepenthes insignis* appliziert. Nach ausreichender Kulturdauer wurden jeweils die in Kapitel 8.2 beschriebenen Metabolite aus den Pflanzen isoliert und spektroskopisch auf einen Einbau hin untersucht. Die Fütterungsversuche zeigten eindeutig, daß Plumbagin (**13**) aus  $C_2$ -Einheiten des Kohlenstoffskeletts von L-Alanin aufgebaut wird. Aus dem  $^{13}C$ -NMR-Spektrum ergab sich eine Einbaurrate von ca. 40% (berechnet aus dem Vergleich der Intensitäten der Satellitenpeaks mit dem Zentralpeak). Das Kopplungsmuster war typisch für den Einbau von intakten  $^{13}C_2$ -Einheiten außer an der Position C-3.

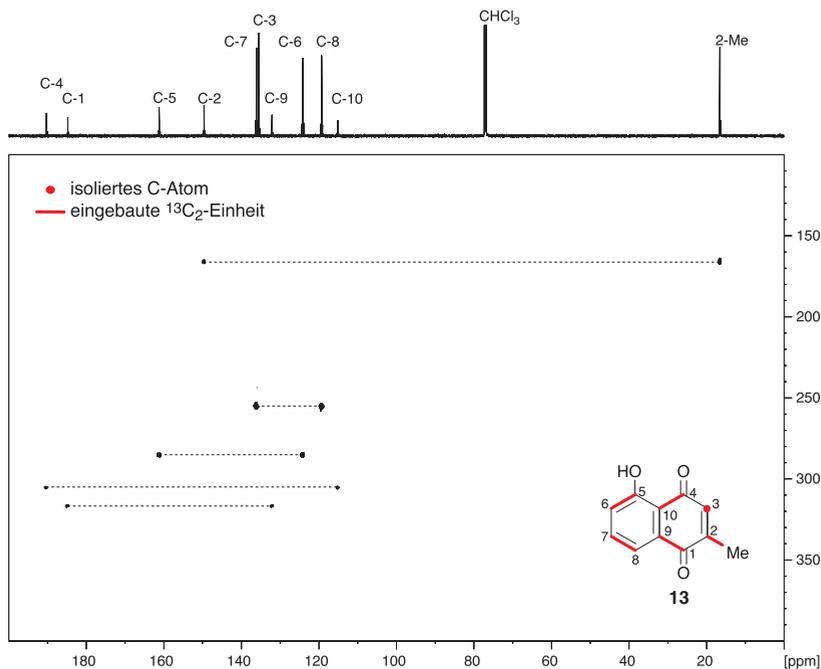
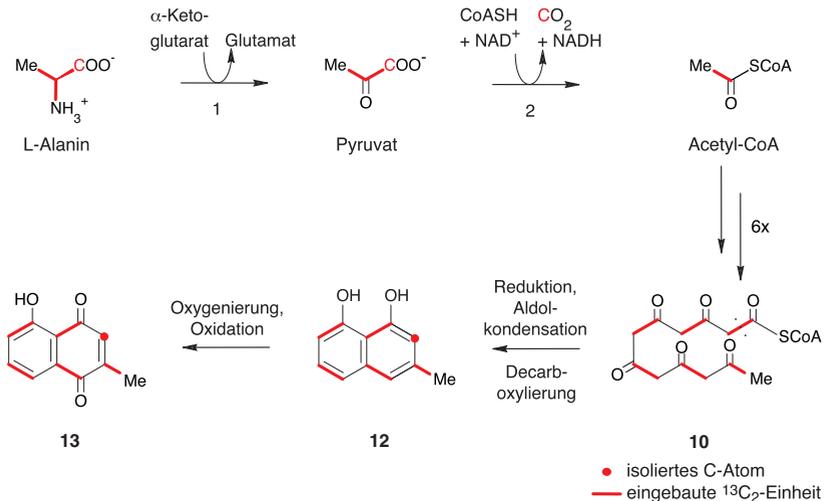


Abb. 50. 2D-INADEQUATE-NMR-Spektrum von markiertem Plumbagin (**13**) aus dem Alanin-Fütterungsversuch; die paarweisen  $^{13}C$ - $^{13}C$ -Korrelationen zeigen einen Einbau intakter  $^{13}C_2$ -Einheiten (Spektrenauswertung durch A. Hamm)

Die Kopplungskonstanten und -muster, die in einem 2D-INADEQUATE-Experiment erhalten wurden (Abb. 50), zeigten eine paarweise Kopplung der C-Atome 2-CH<sub>3</sub>/2, 1/9, 8/7, 6/5 und 10/4. C-3 blieb isoliert und bestätigte somit das angenommene Polyketidfaltungsmuster und die Decarboxylierung an C-3.

Die hohe Resorptionsrate von L-Alanin durch die überdachten Drüsen am Kannenboden wurde bereits früher beschrieben.<sup>[251]</sup> Wahrscheinlich wird die Alaninaufnahme über einen energieabhängigen Mechanismus bewerkstelligt,<sup>[264]</sup> der dem für *Dionaea muscipula* vorgeschlagenen Cotransport von H<sup>+</sup>-Ionen und Aminosäuren entspricht.<sup>[265]</sup> Sobald das Alanin von der Pflanze aufgenommen wurde, sind die weiteren biosynthetischen Schritte leicht vorstellbar (Schema 7). Nach der erwarteten Überführung von L-Alanin in Acetyl-CoA über Pyruvat durch oxidative Deaminierung und Decarboxylierung ist die Route offenbar dieselbe wie bei *Ancistrocladus heyneanus*<sup>[70]</sup> und *Triphyophyllum peltatum* (vgl. Kap. 6.1).<sup>[191]</sup>



Schema 7. Vorgeschlagene Biosyntheseroute von verfüttertem L-Alanin zu Plumbagin (13); die daran beteiligten Enzyme sind 1. Alanin-Aminotransferase und 2. Pyruvat-Dehydrogenase

Bei der Verfütterung von [U-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-Natriumacetat hingegen konnte kein Einbau in Plumbagin (13) festgestellt werden. Eine denkbare Erklärung dafür ist, daß das Acetat nicht zu Acetyl-CoA aktiviert werden konnte. Dies ist bei der thiolierenden Decarboxylierung von Pyruvat nicht nötig. Ebenfalls möglich ist, daß das Acetat von der Pflanze gar nicht aufgenommen wurde, weil entweder ein Aufnahmemechanismus fehlt oder aber wegen der hohen Pufferkapazität der

verabreichten Lösung. Für Alanin ist zumindest bei *Dionaea* eine Erhöhung der Aufnahme­raten mit einer pH-Absenkung auf 4.4 verbunden.<sup>[266]</sup> In *Nepenthes*-Kannen ist dies der pH-Bereich für die optimale Proteaseaktivität,<sup>[267]</sup> auch wenn diese Werte in Wirklichkeit nur sehr lokal nahe den Drüsen erreicht werden. Andererseits weisen die veränderten Metabolitkonzentrationen nach der Fütterung im Vergleich zur Kontrolle auf eine Aufnahme hin.

Weder nach der Alanin- noch nach der Acetatverfütterung konnte ein Einbau in eines der beiden Glucoside **65** oder **66** festgestellt werden. Vermutlich sind diese Metabolite Speicherformen, deren Umsatz selbst 90 Tage nach der Applikation zu langsam für ein positives Resultat ist.

#### **8.4 Praktische, physiologische und ökologische Bedeutung der Verfütterungsergebnisse**

Die Ergebnisse der Verfütterungsversuche zeigen, daß das Konzept der Vorstufenverfütterung über natürliche Aufnahmemechanismen carnivor­er Pflanzen, wie es mit nur geringem Erfolg bereits bei *T. peltatum* angewendet wurde,<sup>[67]</sup> bei *Nepenthes* ideal durchzuführen ist. L-Alanin, als 'maskierter' Vorläufer von Acetyl-CoA, wird von den Pflanzen aktiv aufgenommen und ist damit ein nützliches Werkzeug für die Aufklärung der Biosynthese von acetogenen Sekundärmetaboliten. Die konkave Geometrie der zudem robusteren Blätter erlaubt deutlich längere Applikationszeiten als die konvexen und empfindlicheren Drüsenblätter von *T. peltatum*. Daraus wiederum ergeben sich bessere Einbauraten.

In der Vergangenheit wurde der Nutzen der Carnivorie ausschließlich auf die Aufnahme von Stickstoff zurückgeführt.<sup>[65]</sup> Völlig heterotrophe carnivore Pflanzen sind unbekannt, und daher ist die Verfügbarkeit von Stickstoff in den meisten der beschränkten Habitate zweifellos ein limitierender Faktor. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Verfütterungsversuche, daß intakte C<sub>2</sub>-Einheiten aus den aufgenommenen Alaninmolekülen direkt in den Sekundärmetabolismus eingeschleust werden, um eine Abwehrsubstanz *de novo* aufzubauen. Der Nutzen dieser Kohlenstoffquelle ist daher offensichtlich nicht in einem Beitrag zu besserem Wachstum *per se* zu suchen, sondern ist möglicherweise ein erstes Beispiel für eine Steigerung der chemischen Verteidigungsfähigkeit gegen feindliche Organismen.

Selbst wenn man den direkten Einbau der aus Alanin entstandenen Acetateinheiten in das Kohlenstoffskelett von Plumbagin (**13**) als schlichte Abfallverwertung interpretiert, so kann das Ergebnis – eine *de-novo*-Synthese und daraus resultierend eine zumindest im Vergleich zu der Speicherform (**66**) erhöhte Konzentration von Plumbagin (**13**) – sehr wohl von ökologischer Wichtigkeit für die Stärkung der Konkurrenzfähigkeit sein. 1,4-Naphthochinone, und speziell

Plumbagin (**13**), sind Phytochemikalien mit hoher biologischer Potenz. Neben den Effekten von **13** auf Vertebraten, die von Unfruchtbarkeit<sup>[268]</sup> bis Cytotoxizität<sup>[269]</sup> reichen, gibt es viele Berichte von allelochemischen Wirkungen auf andere Organismen, die in diesem Zusammenhang von größerem Interesse sind. So wirkt **13** beispielsweise fraßhemmend auf herbivore Insekten. Es ist selbst gegen angepasste Lepidopteren<sup>[270]</sup> ein konzentrationsabhängiges Abwehrmittel. Insekten, die Pflanzen mit einer kritischen Dosis von **13** fressen, sterben entweder unmittelbar oder während der nächsten Häutung, da die Bildung von Ecdysteroid<sup>[271]</sup> und Chitinsynthetase<sup>[272]</sup> gehemmt werden. Außerdem zeigt Plumbagin (**13**) sowohl microbizide<sup>[246]</sup> als auch fungizide Aktivitäten, sogar gegen phytopathogene Arten.<sup>[380]</sup>

Feldstudien über *Nepenthes* berichten nur sehr selten von Pflanzenschäden durch herbivore Insekten. Gelegentlich wurden Raupen von Lepidopteren gesichtet, die in den Blättern minieren<sup>[273]</sup> oder sich von den entwickelnden Früchten ernähren.<sup>[274]</sup> Da diese Insekten vermutlich hochspezialisiert sind, unterstützen die Ergebnisse die Abwehrfunktion von Plumbagin (**13**) bei *N. insignis*.

## 9 Euphorbiaceae

Wolfsmilchgewächse (Euphorbiaceae) sind – die Arktis ausgenommen – kosmopolitisch, jedoch überwiegend tropisch verbreitet. Es handelt sich mit *ca.* 8000 Arten in *ca.* 300 Gattungen um eine sehr große Familie. Entsprechend vielfältig sind die auftretenden Wuchsformen von Holzpflanzen über krautige Pflanzen mit Laubblättern, die gewöhnlich Nebenblätter aufweisen bis zu sukkulenten Pflanzen mit rückgebildeten Blättern.<sup>[275]</sup> Wenn Blätter vorhanden sind, sind diese gegenständig oder alternierend, selten wirtelig angeordnet. Die Blüten sind in Blütenständen organisiert und fast immer eingeschlechtlich, dabei monözisch oder diözisch verteilt. Viele Arten führen Milchsaft und sind daher oder aufgrund anderer Inhaltsstoffe von großem wirtschaftlichem Interesse (vgl. Kap. 1).<sup>[276, 277]</sup> Innerfamiliär wird systematisch in fünf Unterfamilien gegliedert: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae und Euphorbioideae.<sup>[278]</sup>

### 9.1 Die Gattung *Antidesma*: Systematik, Verbreitung und Morphologie

Die Gattung *Antidesma* Burman ex L. wird zusammen mit den Gattungen *Celianella* Jablonski, *Hieronyma* Allemão, *Leptonema* A. Jussieu, *Phyllanoo* Croizat und *Thecacoris* A. Jussieu taxonomisch innerhalb der Euphorbiaceae in der Unterfamilie Phyllanthoideae, Tribus Antidesmae, Subtribus Antidesminae eingruppiert.<sup>[278]</sup> Die monotypischen Gattungen *Celianella* und *Phyllanoo*, sowie *Hieronyma* (die Schreibweise wird gegenüber *Hyeronima* bevorzugt<sup>[279]</sup>) sind mit *ca.* 40 Arten<sup>[280]</sup> neotropisch verbreitet. Während *Leptonema* mit zwei endemischen Arten ausschließlich auf Madagaskar vorkommt, ist *Thecacoris* mit *ca.* 20 Arten auch auf dem afrikanischen Kontinent vertreten. *Antidesma* stellt mit bis zu 160 Arten<sup>[281]</sup> die größte Gattung dar. Die Arten sind in der Paläotropis mit Schwerpunkt Südostasien bis auf die pazifischen Inseln und nach Nordaustralien verbreitet. Nur sieben Arten, darunter *A. membranaceum* Müll. Arg. und *A. venosum* E. Mey. ex Tul. kommen in Afrika vor.<sup>[282]</sup> Beide Arten verlassen das Festland nicht, sind dort aber in Savannen, am Rand von Galeriewäldern und erstere auch in offenen Regenwäldern weitverbreitet. Die strauch- bis baumförmigen Pflanzen sind zweihäusig und zumindest im Jugendstadium kaum voneinander zu unterscheiden, da die wechselständigen, unterseits behaarten Blätter (Abb. 51A) sehr ähnlich sind. Sind die Pflanzen größer, kann zur Unterscheidung<sup>[283]</sup> die Blattlänge (*A. m.*: bis 20 cm, *A. v.*: bis 10 cm), die Infloreszenzlänge (*A. m.*: bis 18 cm, *A. v.*: bis 7 cm) oder die Größe der Früchte (*A. m.*: 3 mm lang, *A. v.*: 8 mm lang) herangezogen werden (Abb. 51B).

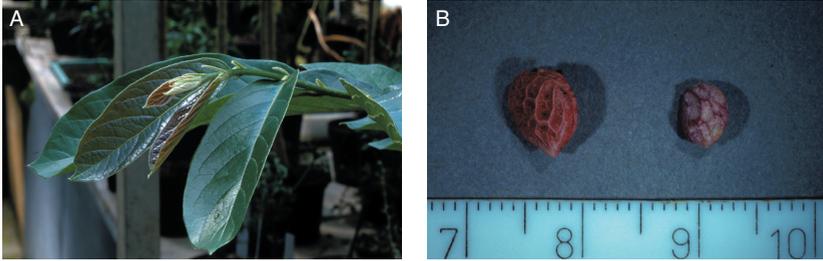


Abb. 51. Seitenzweig einer juvenilen Pflanze von *A. membranaceum* im Gewächshaus (A); Größenvergleich der Samen: *A. venosum* links und *A. membranaceum* rechts (B); Skala in [cm]

## 9.2 Phytochemie von *Antidesma*

Erste chemische Untersuchungen von *Antidesma* waren zunächst widersprüchlich. Bei einem phytochemischen Screening im Jahr 1953 wird *A. ghaesembilla* nicht durch positive Ergebnisse in Tests auf Alkaloide, Triterpene, Steroide, Cyanogene und Saponine auffällig.<sup>[284]</sup> 20 Jahre später wurde dieselbe Art erneut untersucht, und es wurde Sitosterol isoliert.<sup>[285]</sup> Mittlerweile sind mit modernen Methoden viele weitere Arten chemisch untersucht worden, und eine stattliche Anzahl von Naturstoffen konnte isoliert werden (Tab. 11). In der Hauptsache gehören die gefundenen Substanzen zu den Klassen Triterpene, Phytosterole und Flavonoide. Aber auch Cyclopeptidalkaloide<sup>[286]</sup> wurden gefunden, wie sie häufig auch in Rhamnaceen vorkommen.

Tab. 11. Aus *Antidesma* isolierte Naturstoffe

Verbindungs- klasse	Verbindung	Art	Literatur	
Triterpene	Dammara-20,24-dien-3 $\beta$ -ol, Friedelin	<i>A. bunius</i>	<sup>[287]</sup>	
	Antidesmanol	<i>A. menasu</i>	<sup>[288]</sup>	
	16 $\alpha$ -Hydroxy-3-ketoisomultifloren, 3 $\beta$ -Hydroxy-16-ketoisomultifloren	<i>A. menasu</i>	<sup>[289]</sup>	
	Lupeolacton	<i>A. pentandrum</i>	<sup>[290]</sup>	
	Squalen	<i>A. venosum</i>	<sup>[291]</sup>	
	Dammaradienol, Friedelanol, Lupeol, Betulin, Friedelin, Lupeneon, $\beta$ -Amyron, Betulinsäure	<i>A. membranaceum</i> , <i>A. venosum</i>	<sup>[292]</sup>	
	Phytosterole	Sitosterol	<i>A. diandrum</i>	<sup>[293]</sup>
		Sitosterol	<i>A. ghesaembilla</i>	<sup>[285]</sup>
		6 $\alpha$ -Hydroxycampestanol, 6 $\alpha$ -Hydroxysitostanol, 6 $\alpha$ -Hydroxystigmastanol,	<i>A. membranaceum</i>	<sup>[294]</sup>
		Stigmast-4-en-3-on, Stigmast-4,22-dien-3-on		
Cholesterol, 24-Methylcholesterol, Stigmasterol, Sitosterol, Sitostanol		<i>A. membranaceum</i> , <i>A. venosum</i>	<sup>[292]</sup>	

Megastiman- glucoside	3-Oxo- $\alpha$ -ionol- $\beta$ -D-glucopyranosid, Blumenol-A- $\beta$ -D-glucopyranosid Blumenol-B- $\beta$ -D-glucopyranosid, Blumenol-C- $\beta$ -D-glucopyranosid,	<i>A. membranaceum</i> [292]
Phenolsäuren	Kaffesäure, Chlorogensäure, <i>p</i> -Methylzimtsäure, <i>o</i> -Methylzimtsäure, <i>o</i> -Coumarsäure, <i>p</i> -Coumarsäure, Ferulasäure, <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure, Ellagsäure, Syringasäure	<i>A. acuminatum</i> [295]
Tannine	Antidesmin A, Geraniin, Carpusin	<i>A. pentandrum</i> [296], [297] var. <i>barbatum</i>
Lignane	<i>trans</i> - <i>N</i> -Feruloyltyramin, <i>trans</i> - <i>N</i> -Feruloyloctopamin, <i>cis</i> - <i>N</i> -Feruloyloctopamin, Secoisolariciresinol-9,9'-diferulat (-)-Syringaresinol, (+)-Lyoni-resinol-4- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid, (+)-4'-Methoxylyoni-resinol-4- <i>O</i> - $\beta$ -D- glucopyranosid, Secoisolariciresinol-4- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid	<i>A. membranaceum</i> [294]  <i>A. membranaceum</i> [292]
Flavonoide	Vitexin, Isovitexin, Luteolin-7- <i>O</i> -glucosid, Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid, Apigenin-7- <i>O</i> -glucosid, Kaempferol-3- <i>O</i> -glucosid Amentoflavon	<i>A. venosum</i> [292]  <i>A. membranaceum</i> , [292] <i>A. venosum</i>
Benzo- pyranone	5,7-Dihydroxy-2-nonadecylchromon, 5,7-Dihydroxy-2-eicosylchromon, 5,7-Dihydroxy-2-heneicosylchromon, 2-Nonadecyl-2,5,7-trihydroxychromanon, 2-Eicosyl-2,5,7-trihydroxychromanon, 2-Heneicosyl-2,5,7-trihydroxychromanon	<i>A. membranaceum</i> [298]
Cyclopeptid- alkaloide	Discarin A	<i>A. fructiferum</i> [299]
	AM-1 (Myrianthin / Adouetin Y' ?), AM-2 (Aralionin B ?)	<i>A. montana</i> [300], [301]
	Scutianin B	<i>A. fructiferum</i> [302]
Sonstige	$\alpha$ -Tocopherol	<i>A. membranaceum</i> , [292]
	$\beta$ -Tocopherol	<i>A. venosum</i> [292] <i>A. venosum</i>

In *Antidesma nigricans* wurde Phorbolster-Bioaktivität nachgewiesen,<sup>[303]</sup> und in *A. ripicola* wurde aufgrund ihrer Giftigkeit auf das Vorhandensein von Cucurbitacinen, wie sie aus anderen Euphorbiaceen bekannt sind, geschlossen.<sup>[304, 305]</sup> Ohne die Isolierung oder den sicheren analytischen Nachweis der entsprechenden Substanzen bleibt dies jedoch Spekulation.

### 9.3 Zur Struktur von Antidesmon

Bereits seit 1927 sind in der Literatur immer wieder Berichte über einen mutmaßlichen Alkaloidgehalt von *Antidesma* zu finden (*A. bunius*,<sup>[306]</sup> *A. venosum*,<sup>[307]</sup> *A. ghesaembilla*<sup>[285]</sup>). In keinem Fall gelang es den jeweiligen Autoren jedoch, genug Substanz zu isolieren, um die Struktur aufzuklären. Aus diesem Grund ist es unklar, ob es sich bei den Substanzen um Cyclopeptidalkaloide handelte, die ebenfalls in *Antidesma* vorkommen, oder ob es Antidesmon (**5**), das in geringen Mengen in *Antidesma membranaceum*<sup>[308]</sup> gefunden wurde, oder eines seiner Derivate war. Noch im Jahr der Erstisolierung von **5** wurden aus *Hieronyma oblonga* zwei Alkaloide, Hyeronin A (**68**) und B (**69**), mit unterschiedlicher Struktur beschrieben, obwohl die spektroskopischen Daten des ersteren mit denen von Antidesmon übereinstimmten.<sup>[309]</sup> Eigene Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Schlauer und Wohlfarth zur Biosynthese von Antidesmon (Kap. 9.7) ließen Zweifel an der Richtigkeit der publizierten Tetrahydroisochinolinstruktur aufkommen und führten zu deren Revision<sup>[310]</sup> (Kap. 9.6). Die neue Struktur (**5**) wurde zusätzlich plausibel durch die bereits früher aufgeklärten Naturstoffe Hyeronimon (**70**) und dessen Monoacetat (**71**), die aus *Hieronyma alchorneoides* isoliert worden waren (Abb. 52).<sup>[311]</sup> Mittlerweile sind aus *A. membranaceum* und *A. venosum* 26 Antidesmon-Alkaloide bekannt, die sich durch Veränderungen am Bicyclus und an der Seitenkette unterscheiden.<sup>[292, 382]</sup>

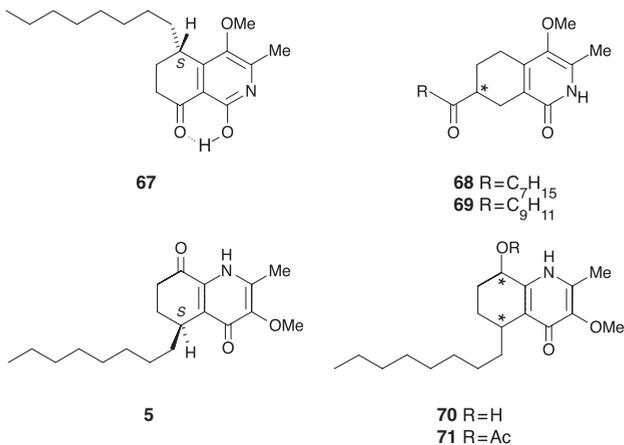


Abb. 52. Ursprünglicher Strukturvorschlag **67** für Antidesmon, publizierte Strukturen **68** und **69** für Hyeronin A und B, revidierte Struktur **5** für Antidesmon und Strukturen **70** für Hyeronimon und **71** für dessen Monoacetat

#### 9.4 Kultur von *Antidesma membranaceum* und *A. venosum* für Biosyntheseuntersuchungen

Biosyntheseuntersuchungen an Pflanzen setzen deren ganzjährige Verfügbarkeit voraus. Da es sich bei beiden bearbeiteten Arten um tropische Pflanzen handelt, konnten diese sehr gut im Gewächshaus des Botanischen Gartens Würzburg zusammen mit *Ancistrocladus* und *Triphyphyllum* kultiviert werden. Aus Samen, die von Bringmann aus Kenia mitgebracht worden waren, keimten auf einem Lecaton®/Sand-Gemisch leider nur wenige Pflanzen. Diese entwickelten sich aber sehr gut, so daß in der Folge von diesen Mutterpflanzen Stecklinge abgenommen werden konnten, die sich im Vermehrungsbeet innerhalb eines Monats bewurzeln. Der momentane Gewächshausbestand besteht aus sieben *A. membranaceum* und drei *A. venosum*, obgleich bereits Pflanzen für die Nachextraktion von Antidesmon zu Testzwecken gernetzt wurden.

Von beiden *Antidesma*-Arten konnten auch erfolgreich axenische Kulturen, ausgehend von Samen angelegt werden, nachdem Verfahren zur optimierten Sterilisation und Samenvorbehandlung erarbeitet worden waren.<sup>[174]</sup> Die steril erhaltenen Pflanzen (Abb. 53A) wurden auf einem abgewandelten Anderson-Medium weiterkultiviert. Bereits ohne Zusatz von Hormonen zum Medium trieben Nodienexplantate aus. In einer erweiterten Testreihe wurde der Einfluß verschiedener Phytohormonkombinationen und -konzentrationen auf Einzelknotenexplantate zur klonalen Vermehrung getestet (Tab. 12).

Tab. 12. Der Einfluß verschiedener Phytohormon-Kombinationen und -Konzentrationen auf die klonale Vermehrung von *Antidesma membranaceum*. Die Werte, die in einer Spalte mit demselben Buchstaben markiert sind, unterscheiden sich nicht signifikant im Duncan's Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%

BAP	1/5 MS + Phytohormone [mg/l]		Explantate pro Gefäß mit Trieben [%]*	Anzahl Triebe pro Explantat <sup>#</sup>	Explantate pro Gefäß mit Kallus [%]*
	TDZ	NAA			
0	0.01	0.01	0.0a	0.0a	86.7d
0	0.02	0.01	0.0a	0.0a	33.3a,b
0	0	0.01	73.3c	0.7b	73.3c,d
0.5	0	0.01	46.7b	0.6b	46.7b,c
2.0	0	0.01	0.0a	0.0a	0.0a
5.0	0	0.01	0.0a	0.0a	0.0c

\* Mittelwert von 15 Explantaten, 5 Explantate pro Gefäß; <sup>#</sup> Mittelwert von 15 Explantaten

Die Kombination von TDZ und NAA bewirkte nach zwei Monaten ausschließlich Kallusbildung. Höhere Konzentrationen von BAP im Kombination mit 0.01 mg/l NAA hatten weder auf die Ausbildung von Trieben noch auf die Kallusbildung einen anregenden Einfluß. Zur Triebbildung

fürte nur die Verwendung von 0.01 mg/l NAA allein oder in Kombination mit 0.5 mg/l BAP. Letztere Kombination ist trotz der geringeren Anzahl von Trieben pro Explantat zu bevorzugen, da ein geringerer Prozentsatz störender Kalli gebildet wird.

Neben der Kultur von Ganzpflanzen *in vitro* für Erhaltungszwecke (Abb. 53B) und als stetige Quelle für Explantate war die Etablierung von alkaloidbildenden Kalluskulturen für Biosyntheseuntersuchungen unabdingbar. Kalluskulturen werden Organkulturen deshalb vorgezogen, weil in kurzer Zeit viel Biomasse und damit meist auch größere Mengen an Sekundärmetaboliten gebildet werden, die Applikation von Vorstufen einfach und deren Aufnahme durch die Zellen eher gewährleistet ist.

Versuche zur Induktion von Kallus wurden zum Vergleich mit apikalen und basalen Blatthälften durchgeführt. Zum Einsatz kamen verschiedene Kombinationen der Cytokinine BAP und TDZ mit den Auxinen 2,4-D und NAA (Tab. 13). Die Explantatwahl hatte keinen wesentlichen Einfluß auf das Resultat. Alle Explantate eines Gefäßes bildeten Kallus an den Blatträndern (Abb. 53C) auf Medium mit 0.5 mg/l BAP und 0.01 mg/l NAA oder mit je 0.5 mg/l BAP, 2,4-D und NAA. Die Ausfallquote betrug hier 0%. Die Kalli beider Versuche bildeten Antidesmon (5), deshalb wurde die erstere Kombination bevorzugt genutzt, da für 2,4-D bei längerer Anwendung mutagene Wirkungen bekannt sind.

Tab. 13. Der Einfluß verschiedener Phytohormonkombinationen und -konzentrationen auf die Kallusbildung von *Antidesma membranaceum*. Die Werte, die in einer Spalte mit demselben Buchstaben markiert sind, unterscheiden sich nicht signifikant im Duncan's Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%

1/5 MS + Phytohormone [mg/l]				Explantate pro Gefäß mit Kallus [%]*	Abgestorbene Explantate [%]*	Explantate pro Gefäß mit Kallus [%] <sup>#</sup>	Abgestorbene Explantate [%] <sup>#</sup>
Cytokinin		Auxin					
BAP	TDZ	2,4-D	NAA				
0.0	0.00	0.0	0.01	0.0a	56.0c	0.0a	52.0c
0.5	0.00	0.0	0.01	100.0c	0.0a	100.0c	0.0a
2.0	0.00	0.0	0.01	4.0a	100.0d	8.0a	100.0d
5.0	0.00	0.0	0.01	0.0a	100.0d	0.0a	100.0d
0.5	0.00	0.5	0.5	100.0c	0.0a	100.0c	0.0a
0.0	0.01	0.0	0.01	88.0b	12.0b	84.0b	16.0b

\* apikale Blatthälfte (Mittelwert von 25 Explantaten, 5 Explantate pro Gefäß);

<sup>#</sup> basale Blatthälfte (Mittelwert von 25 Explantaten, 5 Explantate pro Gefäß)

Zur Subkultur konnten die an den Blatträndern gebildeten Kalli abgetrennt werden und separat auf demselben Medium weiterkultiviert werden (Abb. 53D).

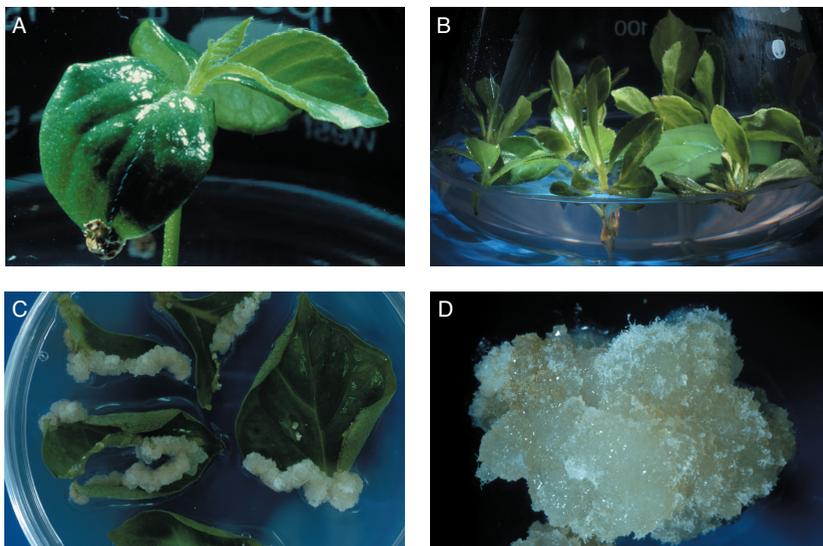


Abb. 53. *In-vitro*-Kultur von *Antidesma membranaceum*. Sämling (A); klonal vermehrte Pflanzen (B); Kallusbildung an Blatträndern (C); subkultivierter Kallus für Biosyntheseexperimente (D)

Ein optimales Wachstum konnte auf Festmedium in Petrischalen bei zweiwöchigem Transfer auf frisches Medium erreicht werden (Abb. 54). In Flüssigkultur ergab sich ein ähnlicher Verlauf (Abb. 57). Das Wachstum in flotierenden 'Rafts' auf demselben Medium ohne Gelierzusatz war deutlich geringer, selbst bei doppelt so häufigem Umsetzen.

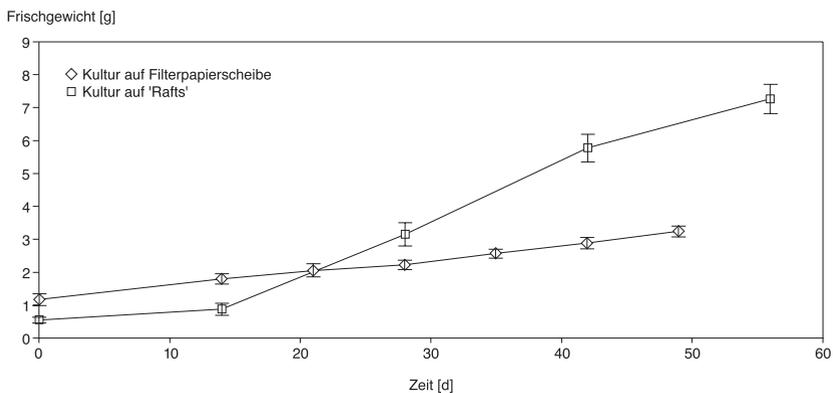


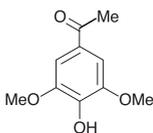
Abb. 54. Kalluswachstum von *Antidesma membranaceum* bei unterschiedlicher Kulturführung auf demselben Medium (1/5 MS, 0,5 mg/l BAP, 0,01 mg/l NAA)

## 9.5 Transformationsversuche von *Antidesma membranaceum* mit *Agrobacterium rhizogenes*

In der Natur kommen Agrobakterien (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. radiobacter*, *A. rubi*, *A. vitis*) als phytopathogene Bodenmikroorganismen aus der Gruppe der Alpha-Purpurbakterien vor. Diese transformieren auf natürliche Weise ihre Wirtspflanzen, um sie als Nährstoffquelle für sich Opine produzieren zu lassen, die die Pflanzen sonst nicht produzieren.<sup>[312]</sup> Der Vorgang der Transformation ist bis heute nicht vollständig verstanden, läuft aber in mehreren Phasen ab. Die Agrobakterien werden über phenolische Substanzen oder Zucker, ausgeschieden von verletzten Pflanzen, angelockt. Nach einem Anheftungsvorgang wird ein Teil des Ti- bzw. Ri-Plasmids,<sup>[313]</sup> die sog. T-DNA,<sup>[314]</sup> in die Wirtszelle und schließlich in deren Zellkern transferiert und dort in die Wirts-DNA integriert.<sup>[315]</sup> Auf der T-DNA befinden sich Gene für die Phytohormon- und Opinsynthese. Befallene Pflanzen bilden charakteristische 'Wurzelhalsgallen' oder nach Transformation mit einigen *A. rhizogenes* sog. 'Hairy Roots' aus.<sup>[317]</sup>

Heute ist der direkte Gentransfer mittels Agrobakterien aufgrund des großen Wirtsspektrums immer noch eine der wichtigsten Methoden der Gentechnologie, um mit diesem Vektor<sup>[316]</sup> veränderte Gene in Pflanzen einzubringen. 'Hairy Roots' werden hauptsächlich für die biotechnologische Produktion von Sekundärmetaboliten eingesetzt, da sie schnell wachsen und biochemisch stabil sind,<sup>[317-319]</sup> d.h. die gewünschten Metabolite dauerhaft bilden.

Es wurde versucht, *Antidesma membranaceum* mittels zweier Wildtyp-Agrobakterienstämme (DSMZ 30200 und ATCC 15834) zu transformieren. Dazu verletzte man mit einer Injektionskanüle Explantate der Versuchspflanzen und brachte die entsprechende Bakteriensuspension hinein. Häufig beobachtete man eine Schwellung an der Einstichstelle, jedoch kann diese auch eine normale Wundreaktion darstellen, da kein weiteres Wachstum registriert wurde (Abb. 56A). Einige Male bildeten sich Wurzeln an der Blattbasis (Abb. 56B), aber nicht an den Verwundungsstellen. Auch diese Wurzeln entwickelten sich nicht weiter. Bei *Nicotiana tabaccum* SR I, die zur Kontrolle ebenfalls infiziert worden war, bildeten sich hingegen an der Einstichstelle schon nach ca. vier Wochen feine weiße Wurzeln, die sich abgetrennt subkultivieren ließen. Nur in einem Fall, nach einer Vorinkubation der Agrobakterien mit Acetosyringon (Abb. 55) zur Virulenzsteigerung,<sup>[320]</sup> wurde nach drei Monaten gut wachsender Kallus von *Antidesma* erhalten (Abb. 56C), der nach Decontamination auf hormonfreiem Medium wachsen konnte.



Acetosyringon

Abb. 55. Zur Virulenzsteigerung eingesetztes Acetosyringon



Abb. 56. Transformation von *Antidesma membranaceum* mit *Agrobacterium rhizogenes*. Wundreaktion nach Agroinfektion (A); Wurzelbildung an der Blattbasis (B); Kallusbildung an den Einstichstellen nach Infektion mit DSMZ 30200 (C)

Die einzelnen Resultate mit unterschiedlichen pflanzlichen Explantaten und den verwendeten Stämmen sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tab. 14. Versuche zur Agroinfektion verschiedener Explantate von *Antidesma membranaceum* mittels *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobakterienstamm	Pflanzenorgan	Medium	Reaktion
DSMZ 30200	Blatt (3x, vorher Acetosyringon)	Anderson verändert	1x Kallusbildung
DSMZ 30200	Blatt (3x)	Anderson verändert	1x Schwellung um Einstichstelle, später abgestorben
DSMZ 30200	Sproß (2x)	1/5 MS verändert	Wurzelbildung an Basis, kein Wachstum
DSMZ 30200	Kallus (2x)	1/5 MS verändert, 2 mg/l BAP, 0.01 mg/l NAA	keine
ATCC 15834	Blatt (5x, vorher Acetosyringon)	1/5 MS verändert	3x Schwellung um Einstichstelle, kein Wachstum
ATCC 15834	Blatt (2x, Einstiche Oberseite)	1/5 MS verändert	keine
ATCC 15834	Blatt (3x, Einstiche Unterseite)	1/5 MS verändert	1x Schwellung um Einstichstelle, kein Wachstum
ATCC 15834	Blattscheibe (3x)	1/5 MS verändert	2x beginnendes Wurzelwachstum, Explantate nicht sterilisierbar

In hormonfreies Flüssigmedium (1/5 MS) überführt, neigte der transformierte Kallus stark zur Aggregatbildung und zeigte ein deutlich geringeres Wachstum als untransformierter Kallus, der in Medium mit 2 mg/l BAP und 0.01 mg/l NAA eine sehr feine Suspension bildete (Abb. 57).

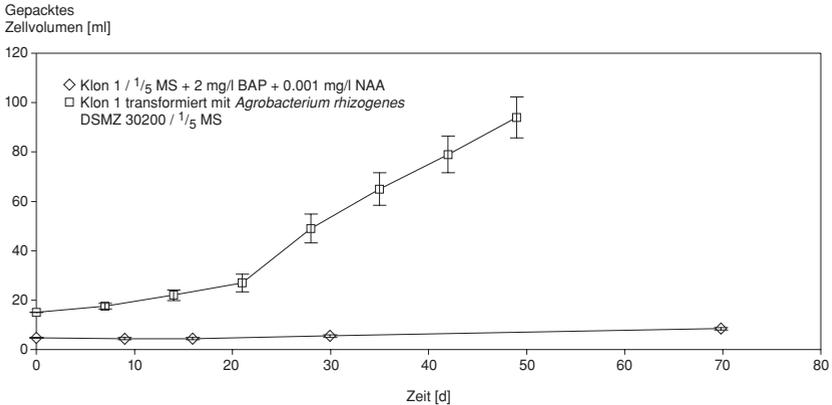


Abb. 57. Wachstumsverlauf von *Antidesma-membranaceum*-Kallus in Flüssigmedium

Offenbar gehört *Antidesma membranaceum* nicht zum Wirtsbereich des verwendeten wurzel-induzierenden Agrobakterienstammes ATCC 15834, da sich die Kontrollpflanze Tabak unter gleichen Bedingungen transformieren ließ. Der kallusinduzierende Stamm DSMZ 30200 vermag hingegen *Antidesma* zu transformieren, wenn zuvor die Virulenz der Agrobakterien gesteigert wird. In derart transformierten Kalli wurden mittels LC-MS sowohl Antidesmon als auch Derivate nachgewiesen, was diese zu einem aussichtsreichen Objekt für weitere Biosyntheseuntersuchungen macht.

## 9.6 Strukturrevision von Antidesmon

Bereits frühzeitig nach der Publikation der ursprünglichen Struktur **67**<sup>[308]</sup> für Antidesmon wurden Zweifel an deren Richtigkeit gehegt. Die C<sub>8</sub>-Seitenkette legte eine Biosynthese aus Acetateinheiten nahe, jedoch paßte die Konstitution und das Substitutionsmuster nicht zu einem einfachen Polyketidfaltungsmuster ohne Verzweigung. Klärung brachte ein Verfütterungsexperiment, das hier Kapitel 9.7 vorweggenommen werden soll, bei dem Nitrat und Ammonium im Medium durch ihre <sup>15</sup>N-markierten Analoge ersetzt worden waren. Für die Verfütterung war eine Flüssigkultur gewählt worden, so daß in einem semikontinuierlichen Verfahren alle neun Tage, über einen Zeitraum von insgesamt 63 Tagen, Medium abgezogen bzw. durch frisches ersetzt und daraus insgesamt über 2 mg bis zu 70% <sup>15</sup>N-angereichertes Antidesmon isoliert wurde (vgl. Tab. 35). Eine umfangreiche NMR-Analyse dieses Materials durch Wohlfarth belegte eindeutig Struktur **5** für Antidesmon. Das <sup>15</sup>N-markierte Material zeigte drei wichtige <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC-Korrelationen (Abb. 58A): eine sehr starke <sup>3</sup>J-Korrelation von einem Singulett

der drei Methylprotonen der sehr nahen aromatischen C-2 Methylgruppe, eine wesentlich schwächere  $^5J$ -Korrelation von der entfernteren *O*-Methylgruppe an C-3, und einer schwachen, aber deutlichen Wechselwirkung von H-7eq ( $\delta_{\text{H}}$  2.59 ppm), d.h. einer von zwei diastereotopen Protonen an C-7, benachbart der Carbonylfunktion an C-8. Letztere war für die Strukturaufklärung besonders wertvoll und machte eine größere Nähe des Stickstoffs zu H-7 wahrscheinlich, d.h. dieser befindet sich in Position eins und nicht in zwei. Die chemische Verschiebung des Stickstoffs ( $\delta_{\text{N}}$  -252 ppm) zeigte, daß der Heterocyclus als Pyridon und nicht als Hydroxypyridin-Tautomer vorliegt. Letzte Belege für eine Strukturrevision wurden durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie erbracht. Im Spektrum wiesen zwei quarternäre Kohlenstoffatome Stickstoffsatelliten auf: C-9 ist benachbart mit der Carbonylfunktion an C-8 und C-2 mit der Methylgruppe (Abb. 58B). Die Größen der Kopplungskonstanten waren mit 16.2 und 14.6 Hz typisch für eine  $^1J$ -Kopplung. Daraus folgte, daß C-9 und C-2 direkt an den Stickstoff gebunden sind, d.h. daß **5** ein 4-Pyridon und kein 2-Pyridon darstellt.<sup>[321]</sup>

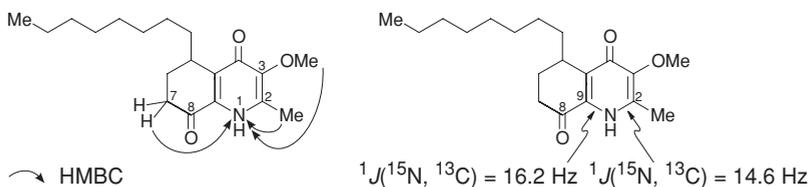


Abb. 58. HMBC-Korrelationen von **5** (A);  $^1J(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Kopplungskonstanten aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -markiertem **5** (B)

Auch an von Buske<sup>[292]</sup> nachisolierten 9 mg Antidesmon (**5**) aus Blattmaterial konnten schließlich in einem Langzeit-HMBC-Experiment unter Einsatz eines Mikroprobenkopfes schwache, aber signifikante Korrelationen zwischen 5-H (bei  $\delta$  3.27 ppm) und C-4 (bei  $\delta$  172.8 ppm) festgestellt werden. Unabhängig davon zeigten auch NMR-Untersuchungen an *O*- und *N*-Methylderivaten von **5** eine übereinstimmende Konstitution. Die absolute Konfiguration von **5** bestimmte Mühlbacher durch quantenchemische CD-Rechnungen, basierend auf 'molecular dynamics' (MD), anhand des *N*-Methylderivats, anschließend als *S*.<sup>[310]</sup>

## 9.7 Biosynthese von Antidesmon

In enger interdisziplinärer Zusammenarbeit mit Schlauer, der in den meisten Fällen **5** isolierte, und Wohlfarth, der mittels NMR-Analytik die Einbaumuster ermittelte, wurden Verfütterungsversuche mit stabilisotopenmarkierten Vorstufen an den Kalluskulturen durchgeführt. Ein

Experiment, das durch die Gabe von anorganischen  $^{15}\text{N}$ -markierten Salzen zur Isolierung von  $^{15}\text{N}$ -markiertem **5** führte, mit dem dann die ursprüngliche Struktur revidiert werden konnte, wurde bereits in Kapitel 9.6 erläutert.

Zunächst vermutete man eine vollständig polyketidische Herkunft von **5** entsprechend dem Coniin. [322, 323] Besonderes Indiz hierfür war die aliphatische Seitenkette. Um diese Hypothese zu belegen, verfütterte man  $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ -Acetat an die Kalli. In der Tat zeigten sich im 2D-INADEQUATE-Spektrum (Abb. 59) C-C-Korrelationen für C-11/C-12, C-13/C-14, C-15/C-16 und C-17/C-18, die eine Bildung der Seitenkette aus Acetatbausteinen bestätigten. Weitere Signale bewiesen, daß auch der Isocyclus (C-5/C-6 und C-7/C-8), einschließlich der beiden Brückenkopfátome (C-9/C-10), sowie eine Bindung (C-3/C-4) im Heterocyclus aus Acetat stammen. Lediglich ein Kohlenstoffatom im Heterocyclus (C-2) und der damit verbundene exocyclische Kohlenstoff (2- $\text{CH}_3$ ) wurden nicht markiert und entstammen daher nicht einer gemeinsamen intakten Acetateinheit.

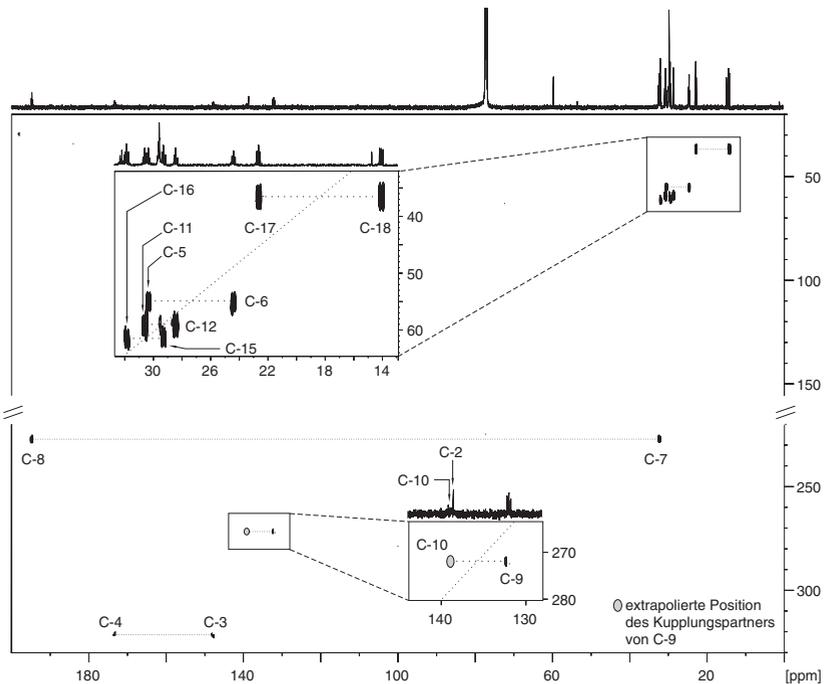


Abb. 59. 2D-INADEQUATE-Spektrum von **5** nach der Verfütterung von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ -Acetat (Spektrenaufnahme und Auswertung durch M. Wohlfarth, Abb. mit freundlicher Genehmigung)

Bei der Applikation von  $[U-^{13}C_6]$ -Glucose ergab sich das gleiche Einbaumuster wie bei der Acetatverfütterung, nur zeigte sich zusätzlich ein schwaches  $^{13}C$ -Signal für die Methylgruppe am Heterocyclus (2- $CH_3$ ). Trotz der schwachen Intensität kann dies als Beleg dafür dienen, daß dieser Kohlenstoff zusammen mit dem benachbarten Ringkohlenstoff aus einer einzigen gemeinsamen Vorstufe hervorging, der von Glucose abstammte.

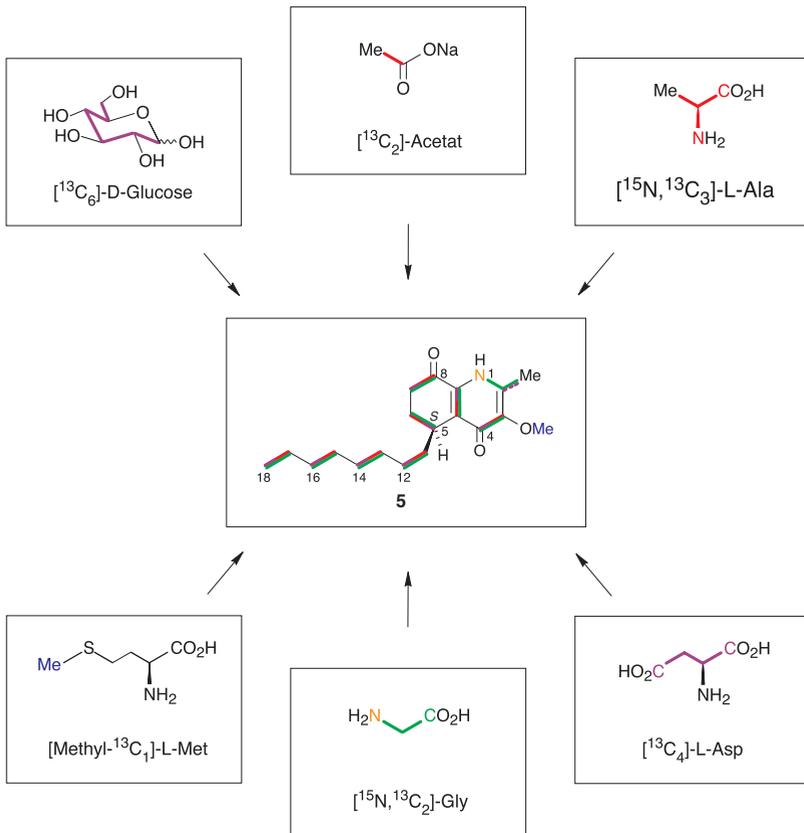
Das beobachtete Fehlen eines Einbaus von  $[U-^{13}C_2]$ -Acetat in die  $C_2N$ -Domäne legte den Schluß nahe, daß diese nach einer Decarboxylierung aus Alanin als intakter Baustein hervorgehen könnte. Wie jedoch die Verfütterung von (L)- $[U-^{13}C_3, ^{15}N]$ -Alanin zeigte, wurde dabei wiederum **5** gebildet, das ein identisches Einbaumuster wie bei der Acetatverfütterung aufwies. Zwar wurde im  $^1H-^{15}N$ -HMBC eine  $^{15}N$ -Anreicherung beobachtet, aber diese war schwächer als bei der Applikation von anorganischen  $^{15}N$ -Quellen (vgl. Kap. 9.6). Offenbar wird Alanin in den Zellkulturen durch Deaminierung und Decarboxylierung in Acetat umgewandelt und erst dieses in **5** eingebaut.

$[U-^{13}C_4]$ -Asparaginsäure wurde ursprünglich für ein zusätzlich carboxyliertes Alanin-Analog gehalten und deshalb zum Vergleich verfüttert. Die  $^{13}C$ -Spektren des isolierten **5** zeigten allerdings die bislang deutlichsten Satellitensignale für die 2- $CH_3$ -Gruppe. Alle anderen analog der Acetatverfütterung markierten Positionen waren sehr viel schwächer markiert. Hieraus ließ sich ableiten, daß Asparaginsäure ein spezifischer Vorläufer der beiden im Acetatversuch nicht markierten Kohlenstoffatome des Antidesmonrückgrates ist.

Endgültige Klärung der Frage nach der Herkunft des  $C_2N$ -Fragmentes brachte die Verfütterung von  $[U-^{13}C_2, ^{15}N]$ -Glycin. Im Vergleich zu allen anderen Verfütterungsversuchen lieferte Glycin die höchsten Markierungsgrade (25%  $^{13}C$ -Markierung der 2- $CH_3$ -Gruppe, berechnet durch Integration der  $^1H$ -NMR-Peaks). Die  $^{13}C$ -NMR-Signale der 2- $CH_3$ -Gruppe wiesen eine starke Kopplung ( $^1J_{C-C} = 46.5$  Hz) und eine schwächere Kopplung ( $^2J = 1.5$  Hz) auf. Das C-2-Signal zeigte sich als Dublett eines Dubletts ( $^1J_{C-C} = 46.4$  Hz) mit  $^1J_{C-N} = 14.9$  Hz. Die Zuordnung der C-N-Kopplungen konnte durch  $^1H, ^{15}N$ -entkoppeltes  $^{13}C$ -NMR bestätigt werden, bei dem alle vom Stickstoff herrührenden Dubletts zu Singulets reduziert wurden. Hiermit war der intakte Einbau von Glycin als  $C_2N$ -Fragment nachgewiesen. Zusätzlich wurde aber Glycin auch als Kohlenstoffquelle für die *O*-Methylgruppe genutzt. Dies zeigte sich im  $^1H$ -NMR-Spektrum durch  $^{13}C$ -Satelliten ( $^1J_{C-H} = 144.5$  Hz) mit ca. 18%  $^{13}C$ -Markierungsgrad. Die restlichen Polyketidpositionen waren wie im Acetatversuch markiert, wiesen aber schwächere Satelliten-Intensitäten auf.

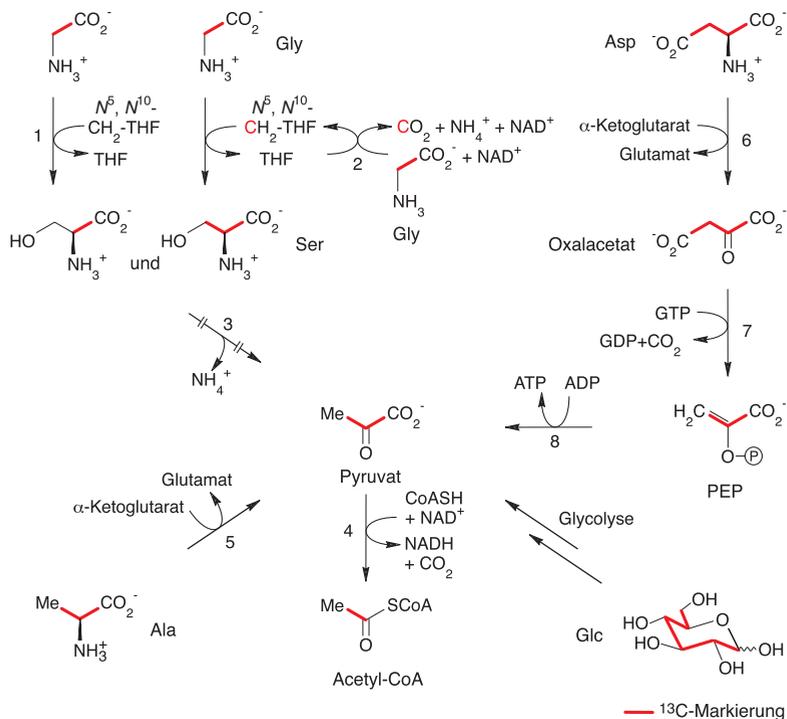
Die prinzipielle Herkunft der *O*-Methylgruppe an C-3 wurde durch die Verfütterung von  $[Methyl-^{13}C_1]$ -Methionin ermittelt. Aus dem  $^1H$ -NMR-Spektrum konnte eine Einbaurate von

15.2% ermittelt werden. Methionin fungiert also höchstwahrscheinlich in bekannter Weise in Form von SAM als Methyl-Donor.



Schema 8. Ermittelte Einbaumuster in Antidesmon (5) nach der Verfütterung Stabilisotopenmarkierter Vorstufen an Kalluskulturen von *Antidesma membranaceum*

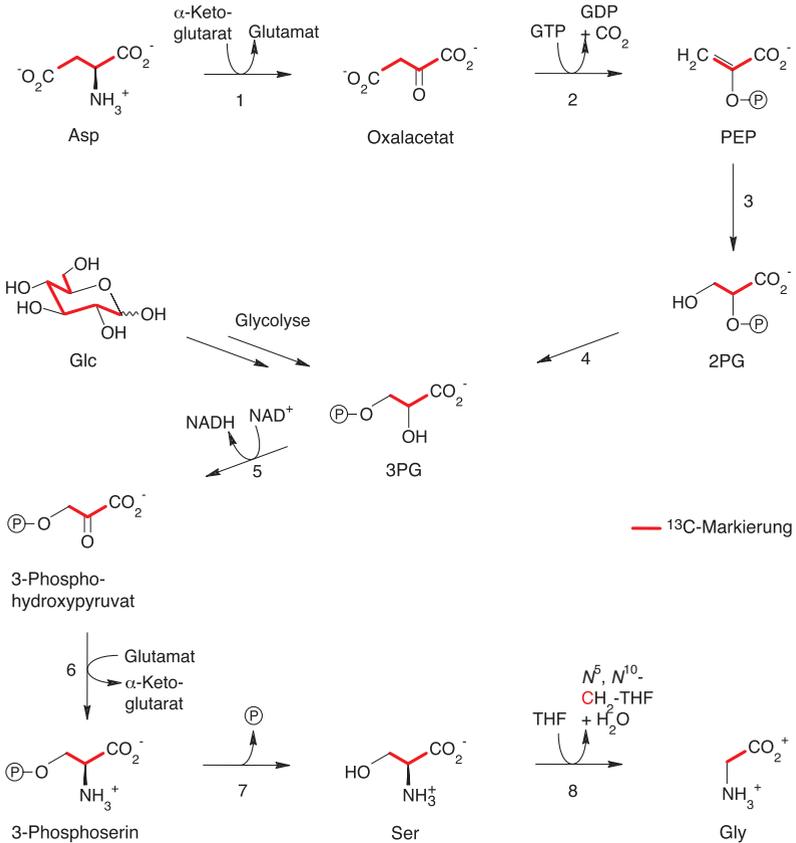
Alle Ergebnisse der Fütterungsversuche zusammenfassend (Schema 8) lässt sich die generelle Biosynthese von 5 ableiten. Der größte Teil des Moleküls, bis auf das C<sub>2</sub>N-Fragment, ist polyketidischen Ursprungs, wie anfänglich bereits vermutet worden war. Wie die Experimente zeigen, können Glucose, Glycin, Alanin und Asparaginsäure von den Zellkulturen in jeweils intakte C<sub>2</sub>-Einheiten umgewandelt werden, da alle diese Vorstufen mindestens an den typischen Polyketidpositionen in 5 eingebaut werden. Für Glucose, Alanin und Asparaginsäure ist die Überführung in Acetyl-CoA mit bekannten Reaktionen gut zu beschreiben (Schema 9).<sup>[324]</sup>



Schema 9. Mutmaßliche Bildung von Acetyl-CoA aus D-Glucose, Glycin, L-Alanin und L-Asparaginsäure. Die daran beteiligten Enzyme sind 1. Serin-Hydroxymethyltransferase, 2. Glycin abbauender Enzymkomplex o. Glycin-Decarboxylase Komplex, 3. Serin-Dehydratase, 4. Pyruvat-Dehydrogenase, 5. Alanin-Aminotransferase, 6. Aspartat-Aminotransferase, 7. Pyruvat-Kinase / Pyruvat-Carboxylase (PEPK) und 8. Pyruvat-Kinase

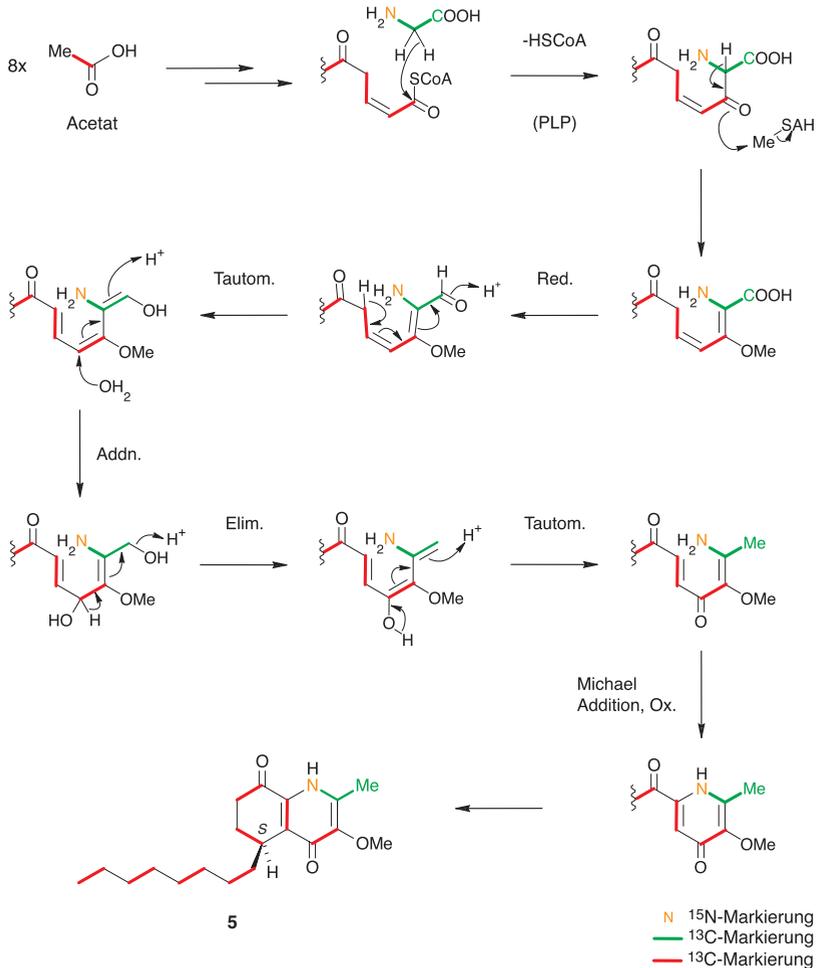
Ebenso ist der Katabolismus von Glycin zu Acetat bekannt. Dieser Abbau verläuft über Serin, d.h. zunächst kommt eine  $\text{CH}_2\text{OH}$ -Einheit dazu und erst im übernächsten Schritt, bei der Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat, wird ein Kohlenstoffatom in Form von  $\text{CO}_2$  abgespalten. Es wäre also beim Einsatz von  $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Glycin nur einfach markiertes Acetyl-CoA zu erwarten, welches nicht für das beobachtete Einbaumuster im **5** verantwortlich sein kann. Jedoch gilt es zu beachten, daß die zusätzliche  $\text{CH}_2\text{OH}$ -Einheit ebenfalls aus Glycin stammen kann<sup>[32,5]</sup> und vom Glycin-Decarboxylase Komplex auf THF überführt wird. Beim Vorliegen eines großen Überschusses von markiertem Glycin, wie es bei den Verfütterungsversuchen der Fall war, ist

also auch damit zu rechnen, daß das komplette Kohlenstoffgerüst des intermediär gebildeten Serins  $^{13}\text{C}$ -markiert vorliegen kann und somit letztendlich doppelt markiertes Acetyl-CoA entsteht, welches in der beschriebenen Weise ebenfalls zum Aufbau von **5** dient. Eine ausschließliche Bildung von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Serin ist aber sehr unwahrscheinlich. Das gefundene Einbaumuster kann daher mit den bekannten metabolischen Routen nicht schlüssig erklärt werden. Leider verlief die zur Überprüfung durchgeführte Verfütterung von  $[1-^{13}\text{C}]$ -Glycin erfolglos, da der vermutlich zu alte Kallus kein Glycin mehr in **5** einbaute.



Schema 10. Mögliche Entstehung von Glycin aus D-Glucose und L-Asparaginsäure. Die daran beteiligten Enzyme sind 1. Aspartat-Aminotransferase, 2. Pyruvat-Kinase / Pyruvat-Carboxylase (PEPK), 3. Enolase, 4. Phosphoglycerat-Mutase (PGM), 5. 3PG-Dehydrogenase, 6. PLP abhängige Aminotransferase, 7. Phosphoserin-Phosphatase und 8. Serinhydroxymethyl-Transferase

Die C-2-CH<sub>3</sub>-Einheit von **5** entstammt wie beschrieben offenbar Glycin, wird aber auch bei der Verfüterung von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Glucose und [U-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]-Asparaginsäure markiert, so daß diese Vorstufen von den Kalli zunächst in Glycin überführt worden sein müssen. Glycin wird in Pflanzen hauptsächlich über die glycolytische Route gebildet, eine Reaktionsfolge, die sowohl in Plastiden wie auch im Cytosol abläuft (Schema 10).<sup>[326]</sup> L-Asparaginsäure kann nach Überführung in 3PG ebenfalls in diesen Weg münden.



Schema 11. Hypothetische Biosyntheseschritte zur Bildung des Heterocyclus von **5**

Als ein Schlüsselschritt in der hypothetischen Biosynthese von **5** ist die Kondensation des aus acht Acetateinheiten entstandenen Polyketids (vermutlich in Form seines freien CoA-Thioesters oder entsprechend der Fettsäurebiosynthese an ACP gekoppelt) mit der C-2-Position des Glycins (vermutlich in Form seines PLP-Derivates) anzusehen (Schema 11).

Mit Serin anstatt Glycin ist diese Reaktionsfolge von der Biosynthese der Sphingolipide, die unter anderen auch in Euphorbiaceen vorkommen, bekannt.<sup>[327]</sup> Bis zum Ringschluß des Heterocyclus durch eine Michael-Addition müssen vermutlich die *O*-Methylierung an C-3 sowie die ungewöhnliche Überführung der Carboxylgruppe an C-2 in eine Methylgruppe abgeschlossen sein. Der Isocyclus wird offenbar erst danach im Sinne einer Robinson-Annelierung geschlossen,<sup>[328]</sup> wie dies durch das Vorkommen von Vorstufenanaloga in anderen Pflanzen, z.B. von Melochininon in *Melochia pyramidata* (vgl. Kap. 9.8), nahegelegt wird.

## 9.8 Biosynthetisch dem Antidesmon verwandte Naturstoffe

Ohne tatsächlich entsprechende Markierungsexperimente durchgeführt zu haben, ist die Vorhersage des Biogeneseweges bei Alkaloiden schwierig. Zahllose Beispiele aus der Literatur zeigen, daß retrosynthetische Überlegungen oft nicht die tatsächlichen Verhältnisse in der Natur beschreiben. So wird z.B. Coniin nicht wie früher angenommen aus Lysin gebildet,<sup>[329]</sup> sondern ist rein polyketidischer Herkunft.<sup>[322, 323]</sup>

Dennoch ist man versucht, mit bekannten Biosynthesewegen die Bildung von noch nicht untersuchten Alkaloiden zu erklären. In Pflanzen kommen eine Reihe von Alkaloiden vor, die charakteristische Strukturmerkmale von **5** teilen und die vermutlich auf ähnliche Weise gebildet werden. Die größte Strukturübereinstimmung weisen die Pyridone Melochinin (**73**)<sup>[330, 331]</sup> und dessen Glucosid (**74**)<sup>[332]</sup> sowie Melochininon (**72**)<sup>[332, 333]</sup> aus *Melochia pyramidata* (Sterculiaceae) auf (Abb. 60). Die Kette ist nicht zum Isocyclus geschlossen, und die C-8 Keto-funktion fehlt. Jedoch weist die Seitenkette dieselbe Länge und ein Substitutionsmuster auf, wie es auch bei **5** bzw. dessen natürlichen Derivaten vorkommt. Faßt man diese Substanzen als Vorstufenanaloga von **5** auf, so ist dies ein Hinweis darauf, daß der Heterocyclus vor dem Isocyclus geschlossen wird. Melochinon (**76**)<sup>[334]</sup> und Melovinon (**75**)<sup>[335]</sup> aus *Melochia tomentosa* sind ebenfalls sehr ähnlich zu **5**. Der Heterocyclus stimmt auch hier exakt mit dem von **5** überein, und der Isocyclus ist geschlossen. Jedoch scheint es sich bei den Startermolekülen für die Polyketidkette eher um die CoA-Ester von Zimt- oder Benzoesäure gehandelt zu haben. Bemerkenswert ist auch, daß die Sterculiaceen als weitere phytochemische Parallele zu *Antidesma* ebenfalls Cyclopeptidalkaloide<sup>[336-339]</sup> (vgl. Kap. 9.2) enthalten.

Ein weiterer in Pflanzen vorkommender Naturstoff mit einem Heterocyclus wie **5** und möglicherweise analoger Biosynthese ist Innovanamin (**77**)<sup>[340]</sup> aus *Evodiopanax innovans* (Araliaceae). Eine Seitenkette fehlt hier allerdings völlig.

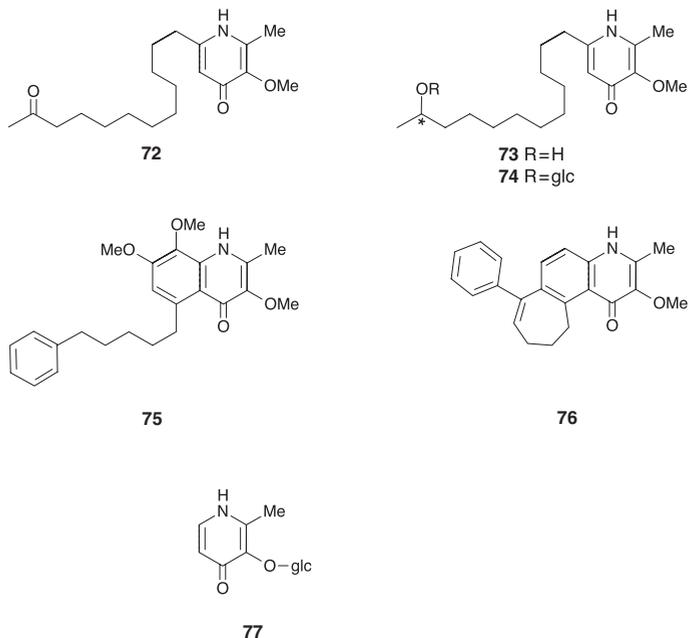


Abb. 60. Pyridone aus *Melochia* und *Evodiopanax* mit antidesmonähnlicher Struktur

Von den Piperidinalkaloiden ist bekannt, daß sie aus mindestens drei unterschiedlichen Grundbausteinen nämlich Essigsäure, Mevalonsäure oder Lysin aufgebaut werden können.<sup>[341]</sup> Einige Piperidinalkaloide aus Rhamnaceen und Leguminosen (Tab. 15) tragen mit Ausnahme der Keto-funktion das gleiche Substitutionsmuster im Heterocyclus wie **5**. Ein geschlossener Isocyclus kommt nicht vor, aber auch hier treten dieselben Kettenlängen (C<sub>8</sub>: Prosophyllin (**86**),<sup>[342]</sup> Prosopinin (**87**),<sup>[343]</sup> Prosafrinin (**88**), Isoprosopin A (**89**) und B (**90**),<sup>[342]</sup> Spicigerin (**91**);<sup>[344]</sup> C<sub>7</sub>: Leptophyllin B (**79**);<sup>[345]</sup> C<sub>6</sub>: Cryptophorin (**78**), Cryptophorinin (**97**)<sup>[346]</sup> auf, und zum Teil ist sogar deren Substitutionsmuster (C<sub>8</sub>: Prosopin (**80**),<sup>[346]</sup> Cassin (**81**),<sup>[347-349]</sup> (-)-Iso-6-Cassin (**82**),<sup>[350]</sup> Prosopinin (**83**),<sup>[351]</sup> Carnavalin auch Prosafrin genannt (**84**),<sup>[352]</sup> (-)-Iso-6-Carnavalin (**85**),<sup>[353]</sup> Leptophyllin A (**92**), 3-Acetylleptophyllin A (**93**)<sup>[345]</sup> gleich dem von Antidesmonderivaten. Bei Cassinin (**94**),<sup>[354]</sup> (+)-Spectalin (**95**)<sup>[350]</sup> und (-)-Spectalin (**96**)<sup>[345]</sup> ist die Kette um eine C<sub>2</sub>-Einheit, beim 'Alkaloid D' (**98**)<sup>[351]</sup> um zwei C<sub>2</sub>-Einheiten verlängert.

Tab. 15. Piperidinalkaloide mit antidesmonähnlichen Strukturmerkmale; **78** und **97** wurden aus *Bathiorhannus cryptophorus* (Rhamnaceae), alle anderen aus *Cassia* oder *Prosopis* (Leguminosae) isoliert.

b		$R^1=CH_3, R^2=CH_3$ (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> : <b>78</b> )	
b		$R^1=CH_3, R^2=CH_3$ ( <b>97</b> )	
b		$R^1=CH_3, R^2=H$ (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> : <b>79</b> )	
a		$R^1=CH_2OH, R^2=H$ (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 11' <i>S</i> : <b>80</b> )	
a		$R^1=CH_3, R^2=H$ (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>S</i> : <b>81</b> ) (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> : <b>82</b> ) $R^1=CH_2OH, R^2=H$ ( <b>83</b> )	
a		$R^1=CH_3, R^2=H$ (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>S</i> : <b>84</b> ) (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> : <b>85</b> )	
b		$R^1=CH_2OH, R^2=H$ ( <b>86</b> ) (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> : <b>87</b> ) (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>S</i> : <b>88</b> )	
b		$R^1=CH_2OH, R^2=H$ (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> : <b>89</b> )	
b		$R^1=CH_2OH, R^2=H$ (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> : <b>90</b> )	
b		$R^1=CH_3, R^2=H$ (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>S</i> : <b>91</b> )	
a		$R^1=CH_3, R^2=H$ (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> : <b>92</b> ) $R^1=COCH_3, R^2=H$ (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> : <b>93</b> )	
		$R^1=CH_3, R^2=H$ ( <b>94</b> ) (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> : <b>95</b> ) (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 6 <i>S</i> : <b>96</b> )	
		$R^1=CH_3$ ( <b>98</b> )	

a Substitutionsmuster und Länge der Seitenkette von natürlichen Antidesmonderivaten bekannt;

b Länge der Seitenkette von natürlichen Antidesmonderivaten bekannt;

\* Stereozentrum der angegebenen Konfiguration

In der Literatur sind bisher zu keinem der Alkaloide Untersuchungen zur Biosynthese veröffentlicht worden, obgleich deren strukturelle Ähnlichkeiten zur Aufklärung der absoluten Stereostruktur von unbekanntem Substanzen genutzt wurden.<sup>[355]</sup> Besondere Beachtung im Hinblick auf die Biosynthese dieser Alkaloide verdient die Tatsache, daß Rhamnaceen und Leguminosen, insbesondere die hier besprochenen Caesalpiniaceen und Mimosaceen, einen reichen Polyketidstoffwechsel aufweisen.<sup>[354]</sup> Möglicherweise ist die Syntheserichtung der Polyketidvorläufer jener des Antidesmons entgegengesetzt, d.h. der Alkylsubstituent stellt das Carboxylende des Polyketids dar.

### 9.9 Volkmedizinischer Nutzen von *Antidesma* und Aktivität von Antidesmon in Biotests

Neben der Nutzung des Holzes für Bauzwecke<sup>[282]</sup> und der bei vielen Arten eßbaren Früchte, die auch zu Marmelade und Wein<sup>[356]</sup> verarbeitet werden, sind sowohl aus Asien wie aus Afrika eine Reihe von volksmedizinischen Anwendungen von *Antidesma* bekannt (Tab. 16). Die genutzten Arten oder deren Pflanzenteile und die Anwendungsgebiete sind divers.

Tab. 16. Volkmedizinisch genutzte *Antidesma* aus Asien und Afrika

Region	Arten	Literatur
Asien	<i>A. alexiteria</i> , <i>A. bunius</i> , <i>A. menasu</i>	[281]
	<i>A. montana</i>	[357]
	<i>A. bunius</i>	[358]
	<i>A. menasu</i>	[359]
	<i>A. bunius</i> , <i>A. ghaesembilla</i>	[360]
	<i>A. diandrum</i> , <i>A. henryi</i> , <i>A. montanum</i> , <i>A. phanerophlebium</i> , <i>A. platyphyllum</i> , <i>A. praegrandidifolium</i> , <i>A. pulvinatum</i>	[361]
	<i>A. venosum</i>	[281]
Afrika	<i>A. laciniatum</i> , <i>A. vogelianum</i>	[282]
	<i>A. madagascariense</i> var. <i>madagascariense</i>	[362]

Auch für die beiden afrikanischen Arten *A. membranaceum* und *A. venosum*, auf die sich die vorliegende Arbeit konzentriert, liegen Berichte über volksmedizinische Anwendungen vor (Tab. 17). Auffällig ist hier, daß die Pflanzen trotz der sonst vielfältigen Anwendungen in nahezu allen Regionen gegen Bauchschmerzen genutzt werden. Genauere Untersuchungen zum Wirkmechanismus liegen aber nicht vor.

Tab. 17. Volksmedizinische Anwendungen von *A. membranaceum* und *A. venosum*

Art	Region	Anwendung	Literatur
<i>A. membranaceum</i>	Westafrika	Aphrodisiacum (Rindenpulver), bei Schwangerschaft gg. Frühgeburt (Blattdekokt als Bad)	[363]
	Zentralafrika	Magenschmerzen, Kolik, Husten (Wurzeldekokt)	[282]
<i>A. venosum</i>	Tansania	Uterusvorfall (Wurzeldekokt), Brechmittel gg. Schlangenbiß (Wurzel), Leberbeschwerden (Samen), Unterleibsschmerzen (Dekokt v. Blättern, Zweigen u. Wurzeln), Hakenwürmer (Wurzeldekokt)	[364]
	Westafrika	Antalgikum gg. Magen- u. Rippenschmerzen, Kopfschmerzen (Blätter), Dermatosen (Blattstengel)	[363]
	Zentralafrika	Rippenschmerzen (Blattdekokt)	[282]
	Sudan	Collyrium	[361]
<i>A. spec.</i>	Zaire	Atemwegserkrankungen (Rindendekokt)	[365, 366]

Hierzulande wird eine Droge von *A. bunius* unter der Bezeichnung Folia Antidesmae gehandelt und als Diaphoretikum genutzt.<sup>[367]</sup> Weitere Anwendungen sind nicht beschrieben und aus diesem Grund wurden im Zuge eines WHO-Screenings in Kooperation mit R. Brun vom Schweizer Tropeninstitut *in-vitro*-Tests von **5** gegen verschiedene Erreger von Humanparasitosen durchgeführt.<sup>[28]</sup> Obwohl die Substanz keine Wirksamkeit gegen *Plasmodium falciparum* (Stämme NF54 und K1), den Erreger der Malaria tropica, gegen *Leishmania donovani*, den Erreger der visceralen Leishmaniose, und gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense*, den Erreger der Schlafkrankheit, zeigte, fiel sie durch ihre starke Wirkung gegen *Trypanosoma cruzi*, den Erreger der Chagas-Krankheit, bei gleichzeitig nur geringer Cytotoxizität auf (Tab. 18). Offenbar ist **5** ein vielversprechender neuer Wirkstoff, und Arbeiten zur Nachisolierung von größeren Substanzmengen für die *in-vivo*-Testung an Mäusen haben bereits begonnen.

Tab. 18. *In-vitro*-Aktivität von **5**

Zelltyp	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml]
<i>Trypanosoma cruzi</i>	0.02
<i>T. brucei rhodesiense</i>	20.1
<i>Leishmania donovani</i>	7.2
<i>Plasmodium falciparum</i> K1 <sup>a</sup>	3.8
<i>P. falciparum</i> NF54 <sup>b</sup>	>5.0
Ratten Skelettmuskelzellen L-6	11.8

<sup>a</sup>sensitiv für alle bekannten Medikamente;

<sup>b</sup>resistent gegen Chloroquin und Pyrimethamin

## 10 Zusammenfassung

Sekundäre Pflanzenstoffe sind aufgrund ihrer großen Strukturvielfalt sowohl als Leit- und Wirkstoffe für die Pharma- und Pflanzenschutzforschung in den Industrieländern als auch zur unmittelbaren medizinischen Grundversorgung der Entwicklungsländer von herausragender Bedeutung für den Menschen. Eine Klasse pharmakologisch, biogenetisch und chemotaxonomisch interessanter Sekundärmetabolite sind die Naphthylisochinolin-Alkaloide, die ausschließlich in den eng verwandten tropischen Pflanzenfamilien Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae vorkommen. Der Untersuchung der Biosynthese dieser Metabolite, einschließlich einiger Vorstufenderivate, durch die konsequente Etablierung von *in-vitro*-Systemen sowie der Biologie ihrer pflanzlichen Produzenten, wurde das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit gewidmet. Daneben wurde die Strategie der stabilisotopenmarkierten Vorstufenverfütterung exemplarisch auf eine Art aus den nahe verwandten Nepenthaceen ausgeweitet, indem der natürliche Aufnahmemechanismus der carnivoren Pflanze ausgenutzt wurde. Anhand von Verfütterungsexperimenten mit ebenfalls neu etablierten Zellkulturen konnte außerdem die Struktur eines neuartigen Pyridon-Alkaloids aus *Antidesma membranaceum*, das ursprünglich als Isochinolin beschrieben worden war, revidiert werden und dessen ungewöhnliche Biosynthese aufgeklärt werden. Die vielfältigen Ergebnisse sind das Resultat von interdisziplinären Kooperationen mit Wohlfarth und Schlauer innerhalb des Arbeitskreises sowie extern mit den Arbeitsgruppen von Prof. Heubl, Prof. Mudogo und Prof. Hadi.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Nach intensiver Vorbereitung inklusive des Sichtens der meisten Typusexemplare in den jeweiligen Herbarien (K, KL, M, P) wurden im Verlauf zweier Forschungsreisen nach Malaysia und Thailand zahlreiche Standorte von Ancistrocladaceen aufgesucht. Vor Ort konnten interessante Beobachtungen dieser botanisch außergewöhnlichen Pflanzen und zu den unterschiedlichen Habitaten von Meereshöhe bis auf 1180 m NN gemacht werden. Es wurden Blattproben und nach Genehmigung der lokalen Behörden in einigen Fällen auch Bulkmengen für Isolierungsarbeiten<sup>[166]</sup> und Lebendmaterial gesammelt.
- Das gesammelte Probenmaterial wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe von Prof. Heubl gegen Aufsammlungen von anderen südostasiatischen Fundorten ausgetauscht. Die derart aufgestockte Probenbank inklusive aller weiteren im Arbeitskreis vorhandenen Akzessionen von *Ancistrocladus* (insgesamt 58 Proben) 'screente' man sodann mit einem neuen photometrischen Schnelltest<sup>[169]</sup> auf dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide. Neben *A. korupensis*, der bisher einzig bekannten Art, die Dimere bildet, konnte dabei völlig

überraschend die asiatische Art *A. griffithii* als Dimerenbildner identifiziert werden. Diese Art wurde durch die genannten Expeditionen erstmals für chemische Untersuchungen zugänglich. Mittlerweile konnten aus ihr mehrere neue monomere Naphthylisochinoline als auch das dimere Ancistrogriffithin A (**42**, Abb. 61) isoliert werden.<sup>[170]</sup> Parallel zu diesen Untersuchungen wurden von Meimberg aus dem Arbeitskreis von Prof. Heubl anhand von Gensequenzen Kladogramme berechnet, die die Ausgliederung zumindest von zwei neuen Arten stützen und erstmals phylogenetische Entwicklungslinien innerhalb der Ancistrocladaceen aufzeigen, die Zusatzinformationen zu chemotaxonomischen Befunden liefern.

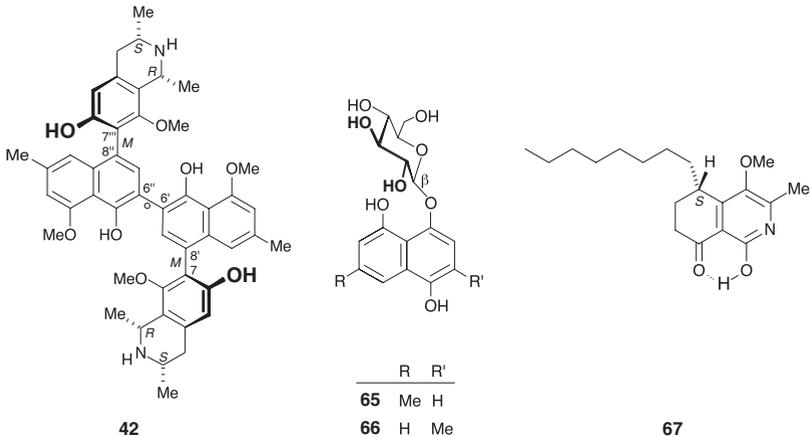
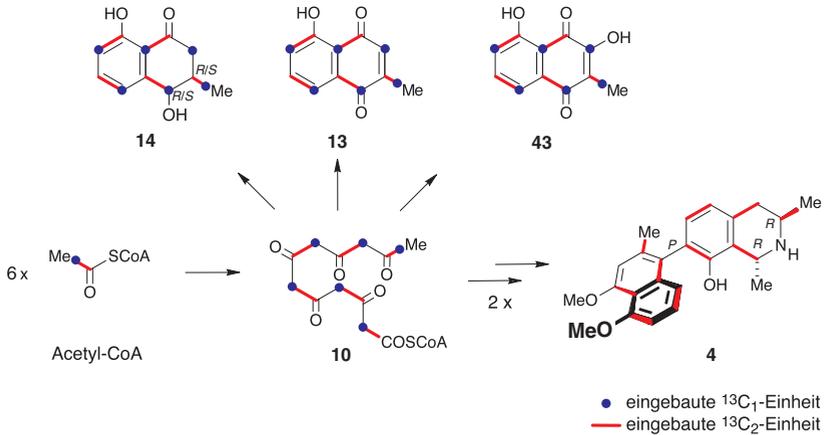


Abb. 61. Ancistrogriffithin A (**42**) aus *Ancistrocladus griffithii*, Rosolisid (**65**) und Plumbasid A (**66**) aus *Nepenthes insignis* und ursprünglicher Strukturvorschlag **67** für Antidesmon

• Die größtenteils sehr unzugänglichen Naturstandorte der bearbeiteten Pflanzenarten machen die ständige Versorgung mit frischem Pflanzenmaterial für Experimente fast unmöglich, und eine kontinuierliche Beobachtung der Pflanzen wird erschwert. Im Botanischen Garten der Universität Würzburg wurde daher die weltweit größte Sammlung von Ancistrocladaceen zusammengetragen. Der zu betreuende Bestand umfaßt inzwischen die Arten *Ancistrocladus abbreviatus*, *A. congolensis*, *A. griffithii*, *A. hamatus*, *A. heyneanus*, *A. korupensis*, *A. cf. letestui* (Bambange), *A. robertsoniorum* und *A. aff. tectorius* (Khao Yai, Nam Tok Sapanhin, Gunung Benom und Don Khon). Außerdem wurde *Triphyophyllum peltatum* erfolgreich kultiviert.<sup>[184]</sup> Bei dieser Art konnte im Gewächshaus der ungewöhnliche Blühvorgang dokumentiert werden.<sup>[185]</sup> Als nachwachsende Quelle für die Isolierung des neuen Wirkstoffs Antidesmon (**5**, Schema 13) wurde eine größere Anzahl von *Antidesma membranaceum* und *A. venosum* (Euphorbiaceae) gehalten.

• Biosyntheseuntersuchungen setzen die ganzjährige Verfügbarkeit von lebendem Pflanzenmaterial voraus. Noch wichtiger als Gewächshauspflanzen sind dafür Kulturen *in vitro*. Der bereits vor Beginn dieser Arbeit *in vitro* befindliche Bestand umfaßte die Arten *Ancistrocladus abbreviatus*,<sup>[175]</sup> *A. barteri*, *A. heyneanus*, *Triphyophyllum peltatum*, *Antidesma membranaceum* und *A. venosum*.<sup>[174]</sup> *Ancistrocladus congolensis* (Luchuadi und Ikuey) konnte der Sammlung über Aussaaten hinzugefügt werden. Durch die Sterilisation von Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus war man in der Lage, auch Arten wie z.B. *Ancistrocladus korupensis* und *A. aff. tectorius* (Khao Yai und Gunung Benom) in Sterilkultur zu überführen, von denen keine Samen verfügbar waren. Auch der umgekehrte Weg wurde beschrieben: *Ancistrocladus abbreviatus*, *A. barteri* und *Triphyophyllum peltatum* konnten nach Phytohormon-induzierter klonaler Vermehrung und Bewurzelung *in vitro* mit hoher Überlebensrate ins Gewächshaus überführt werden.<sup>[175, 187]</sup> Neben den beschriebenen Organkulturen waren für die Biosyntheseuntersuchungen vor allem schnellwachsende Kalluskulturen erforderlich. Derartige undifferenzierte Zellen, die auch die entsprechenden Sekundärmetabolite in ausreichender Menge bildeten, konnten an Explantaten von *Ancistrocladus heyneanus*, *Triphyophyllum peltatum* und *Antidesma membranaceum* induziert werden und in der Folge subkultiviert werden. Für *Ancistrocladus heyneanus* wurde ein Protokoll erarbeitet, das die Regeneration von Sprossen aus Kallus gestattete. Von *Antidesma membranaceum* konnte durch die Transformation mit *Agrobacterium-rhizogenes*-Wildtypstämmen Kallus erhalten werden, der zwar nur ein langsames Wachstum aufwies, aber auf hormonfreiem Medium wuchs.

• Mit der Etablierung von Kalluskulturen von *Triphyophyllum peltatum* war die Grundlage für Biosyntheseuntersuchungen an Naphthylisochinolin-Alkaloiden geschaffen worden. Diese Zellen bildeten – erstmals – auf Festmedien Dioncophyllin A (**4**) als Hauptmetabolit. In Zusammenarbeit mit Wohlfarth konnte nach der Durchführung von Verfütterungsexperimenten mit [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-Natriumacetat tatsächlich eine geringe Menge markiertes Dioncophyllin A (**4**) isoliert werden. Zur Aufreinigung mußte man allerdings unmarkiertes **4** zumischen, um eine gewisse Handhabbarkeit zu gewährleisten. Für die <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchung konnte die hochempfindliche Sensitivität, die für die geringe Probenmenge nötig war, nur an einem Prototypen eines Kryoprobenkopfes der Firma Bruker erreicht werden. Hier allerdings zeigten sich dann erfolgreich paarweise C-C-Korrelationen, die einen Einbau von intakten <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Einheiten deutlich belegten. Somit wurde erstmals die Hypothese der polyketidischen Biogenese von Naphthylisochinolin experimentell bewiesen. Die Biosynthese von Dioncophyllin A (**4**) läuft demnach so ab, daß beide Molekülhälften aus zwei identischen β-Polycarbonylvorläufern gebildet werden, die wiederum aus je sechs Acetateinheiten aufgebaut sind (Schema 12).<sup>[223]</sup>



Schema 12. Biosynthese der Naphthochinone Plumbagin (**13**), Droseron (**43**) und Iso-shinanolon (**14**) und des Naphthylisochinolin-Alkaloids Dioncophyllin A (**4**) aus Acetat

Bei dem Versuch, die isolierten C-Atome 1- $\text{CH}_3$  und C-3' des Dioncophyllin A (**4**) mit  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -Natriumacetat zu markieren, wurde stattdessen nur entsprechend markiertes Droseron (**43**) erhalten. Dieses war offenbar im Sinne einer Streßreaktion gebildet worden und war bereits zuvor als Hauptmetabolit in Flüssigkulturen aufgefallen, woraus es nach einer Verfütterung von  $[^{13}\text{C}_2]$ -Natriumacetat in markierter Form isoliert werden konnte.<sup>[191]</sup> Die Einbaumuster waren jeweils in vollem Einklang mit der Hypothese einer Bildung aus derselben Polyketidvorstufe, aus der auch Dioncophyllin A (**4**) hervorgeht (Schema 12).

- Mittels Elicitierungsversuchen wurde versucht, Einblick in die Kinetiken der Sekundärmetabolite von *Triphyophyllum peltatum* zu bekommen. Es wurden parallel die Gehalte von Plumbagin (**13**), Droseron (**43**) und Isoshinanolon (**14**) im Medium ermittelt und im Kallus zusätzlich Dioncophyllin A (**4**). Die Verbindungen **13**, **43** und auch **14** sind als typische Streßmetabolite zu bezeichnen. Bereits ein Wechsel der Kulturbedingungen veranlaßt die verstärkte Bildung dieser Phytoalexine. Die Gehalte von Droseron (**43**) und Isoshinanolon (**14**) sind im Kallus höher als im Medium. Für Plumbagin (**13**) gilt der umgekehrte Fall. Eine Elicitierung mit  $100\ \mu\text{M}$  Methyljasmonat induziert kurzfristig die Bildung und Ausschleusung von Plumbagin (**13**) und Droseron (**43**). Der Gehalt an Isoshinanolon (**14**) wird durch die Elicitierung kaum beeinflusst, während die Konzentration von Dioncophyllin A (**4**) mittelfristig absinkt.

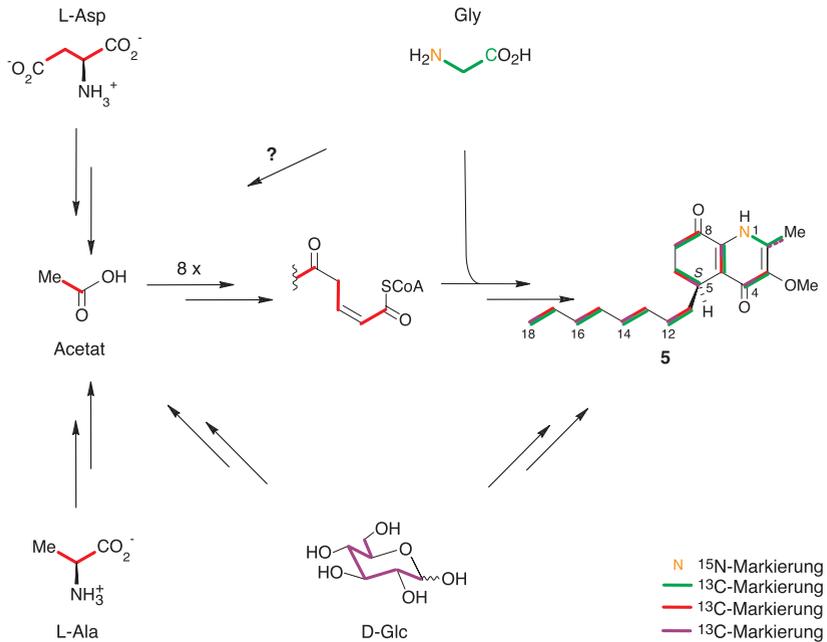
- Sekundärmetaboliten zeigen vielfältige Bioaktivitäten, die experimentell ermittelt werden müssen. Zu diesem Zweck konnten zwei neue Tests etabliert werden. Zum einen wurde ein Test auf allelopathische Aktivität durchgeführt. Hierbei wurde die keimungshemmende und wachstumshemmende Wirkung auf Gartenkresse (*Lepidium sativum*) am Beispiel von Plumbagin (**13**) und Dioncophyllin A (**4**) getestet, wobei **13** weit aktiver als **4** war. In einem weiteren Test auf bakterizide Wirkung wurde die Hemmhofwirkung derselben Substanzen auf Kulturen zweier *Agrobacterium-rhizogenes*-Stämme untersucht. Wiederum war **13** aktiver, jedoch ergab sich eine unterschiedliche Sensitivität der beiden Stämme.

- So gut sich dedifferenzierte Zellkulturen für die Biosyntheseforschung auch eignen, so können sie doch nicht zur Aufklärung von Produktionsorten und Transportwegen in der Pflanze beitragen. Für die Untersuchung dieser Fragestellung für die Naphthylisochinoline wurde ein neuartiger Versuchsansatz gewählt. Man pflanzte ein Reis von *Ancistrocladus heyneanus* auf die Unterlage einer *A. abbreviatus*-Pflanze und versuchte nach dem Verwachsen im oberen Teil der Pflanze, die für *A. abbreviatus* spezifischen und in *A. heyneanus* original nicht vorhandenen Naphthylisochinolin-Alkaloide vom Dioncophyllaceen-Typ nachzuweisen. Somit kommt der Versuch völlig ohne die Applikation markierter Substanzen aus. Im Blattmaterial des Pflanzensprosses konnten in Kooperation mit Wohlfarth mit den empfindlichen online-Techniken HPLC-MS/MS, -NMR und -CD jedoch keine für *A. abbreviatus* spezifischen Alkaloide nachgewiesen werden. Somit widersprechen diese Befunde der Hypothese eines Transportes von vorgefertigten Alkaloiden aus dem Wurzelbereich der Pflanzen in die oberen Regionen. Gestützt wird hingegen die Annahme, daß sich die Alkaloidsynthese womöglich in den Blättern abspielt. Um diese Thesen weiter zu untersuchen, sollten möglichst viele Pflanzkombinationen hergestellt werden. Hierzu verhalf die Pflanzung *in vitro*. Es konnten *A. heyneanus*, *A. barteri* und sogar *Triphyophyllum peltatum* auf jeweils eine Unterlage von *A. abbreviatus* gepfropft werden. Mit den nunmehr etablierten Protokollen zur Bewurzelung und Auspflanzen sollte es möglich sein, diese Pflanzen ins Gewächshaus zu überführen.

- Tropische Kannenpflanzen der Gattung *Nepenthes* sind carnivor. Sie fangen und verdauen Tiere in ihren zu Fallgruben umgewandelten Blättern, um die Bestandteile aufzunehmen und dadurch in nährstoffarmen Habitaten konkurrieren zu können. In einer *in vitro* durchgeführten Verfütterungsstudie mit *N. insignis* zeigte sich, daß intakte C<sub>2</sub>-Einheiten aus (L)-[U-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, <sup>15</sup>N]-Alanin, das biomimetisch über die Kannen zugeführt wurde, dazu dienen können, das allelochemisch wirksame Plumbagin (**13**) aufzubauen. Dieses Resultat wirft ein neues Licht auf den Nutzen der Carnivorie für Pflanzen. Vermutlich erhöht die Verfügbarkeit von *de novo* synthetisiertem **13** die Fähigkeit der Pflanze, sich gegen phytophage und -pathogene Organismen durchzusetzen. Markiertes Acetat hingegen wurde nicht in **13** eingebaut. Ein möglicher Grund dafür könnte ein

fehlender Aufnahmemechanismus sein. Im Zuge der Arbeiten konnten zwei Naphthochinon-glucoside, Rossolisid (**65**) und Plumbasid A (**66**, Abb. 61), zum ersten Mal aus *Nepenthes* isoliert werden. Vermutlich stellen sie Speicherformen mit einem sehr langsamen Umsatz dar, da sie bei keiner Verfütterung in markierter Form anfielen.<sup>[256]</sup>

• Antidesmon (**5**, Schema 13) wurde zunächst als ein Isochinolin-Alkaloid mit der Struktur **67** (Abb. 61) beschrieben. Einbaumuster, die nach der Verfütterung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-Natriumacetat in Kooperation mit Wohlfarth an Kalluskulturen in 2D-INADEQUATE-Experimenten ermittelt wurden, widersprachen dieser Struktur.



Schema 13. Einbaumuster zur Aufklärung der Biosynthese von Antidesmon (**5**)

Um trotz der geringen Substanzmengen mittels NMR eine Strukturaufklärung betreiben zu können, fütterte man die Zellen mit <sup>15</sup>N-markierten Stickstoffquellen und isolierte anschließend <sup>15</sup>N-angereichertes Antidesmon (**5**). <sup>15</sup>N-Heterokernexperimente ermöglichten dann eine korrekte Zuordnung der 1,4-Pyridonstruktur.<sup>[310]</sup> Die dargelegte Strukturaufklärung des Naturstoffs **5** anhand eines durch Kallus *in vitro* biosynthetisch erzeugten NMR-aktiven Pendants zeigt eindrucksvoll das Potential von Sterilkulturen auch für die Naturstoffchemie. Weitere Ver-

fütterungsversuche mit (D)-[ $^{13}\text{C}_6$ ]-Glucose, (L)-[ $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}_3$ ]-Alanin und (L)-[ $^{13}\text{C}_4$ ]-Asparaginsäure sollten zunächst die Vermutung einer vollständig polyketidischen Herkunft von **5** belegen. Es zeigte sich jedoch, daß das  $\text{C}_2\text{N}$ -Fragment nur nach der Zugabe von Glucose markiert war. Erst eine Verfütterung von [ $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}_2$ ]-Glycin ergab einen durchgehenden Einbau inklusive eines intakten Einbaus von Glycin als  $\text{C}_2\text{N}$ -Teil. Die Kondensation eines polyketidischen  $\text{C}_{16}$ -Kohlenstoffgerüsts mit Glycin, dessen Carboxylgruppe letztendlich – zumindest formal – zur 2-Methylgruppe von **5** reduziert wird, ist in dieser Form neu für Pflanzen.<sup>[321]</sup> Ebenso vielseitig sind teilweise die Umwandlungen von den verfütterten Substanzen zum entsprechend markierten Acetyl-CoA (Schema 13). Neben seiner Struktur, die manche Übereinstimmungen mit anderen Naturstoffen aufweist, und seiner ungewöhnlichen Biosynthese ist Antidesmon (**5**) jedoch auch wegen seiner vielversprechenden Aktivität gegen *Trypanosoma cruzi*, den Erreger der Chagas-Krankheit, von großem Interesse.<sup>[28]</sup>

## 11 Summary

Secondary metabolites from plants exhibit a great structural diversity and are therefore of great importance for mankind. While they are used in the industrial countries as leads and drugs in the pharmaceutical and the agrochemical research, they contribute directly to the basic medicinal supply in the developing countries. The naphthylisoquinoline alkaloids constitute a class of pharmacologically, biogenetically and chemotaxonomically interesting secondary metabolites exclusively found in the Ancistrocladaceae and in the closely related tropical plant family Dioncophyllaceae. The main objective of this work was devoted to the investigation of the biosynthesis of these metabolites including several precursors by means of consistently establishing *in vitro* systems, but also to the biology of their producers. Additionally the strategy of feeding stable isotope labelled precursors was exemplarily adopted to a species of the closely related Nepenthaceae by using the natural uptake mechanism of the carnivorous plant. Feeding experiments with likewise recently established cell cultures revealed the structure of a novel pyridone alkaloid from *Antidesma membranaceum*, which had originally been described as an isoquinoline, and its unusual biosynthesis. The diverse results are the consequence of interdisciplinary cooperations with Wohlfarth and Schlauer within the working group and the external groups of Prof. Heubl, Prof. Mudogo and Prof. Hadi.

The following results were obtained in detail:

- Several habitats of Ancistrocladaceae were visited in the course of two scientific expeditions to Malaysia and Thailand after intensive preparation inclusively screening most type specimen in the relevant herbaria (K, KL, M, P). Interesting observations on these exceptional plants especially on their pests and the different habitats ranging from sealevel to 1180 m above sealevel were made at the natural site. Samples of leaves, bulk material for isolation work<sup>[166]</sup> and living plants were collected according to an official licence.
- In the course of a cooperation with the group of Prof. Heubl the collected samples were exchanged for material originating from other locations in Southeast Asia. The thereby increased number of *Ancistrocladus* samples including our own accessions (a total of 58 samples) were then screened by a new photometric test<sup>[169]</sup> for dimeric naphthylisoquinoline alkaloids. Apart from *A. korupensis*, the so far only known species containing dimers, the Asian species *A. griffithii* was surprisingly identified as a producer of dimers, too. This species was made accessible for chemical examinations for the first time by the expeditions. In the meantime several new monomeric naphthylisoquinolines and the dimer ancistrogriffithine A (**42**, Fig. 62) have been isolated from the plant.<sup>[170]</sup> Meimberg working in the group of Prof. Heubl compared gene

sequences and calculated cladograms, which support the separation of two new species and show the phylogenetic evolution of the Ancistrocladaceae for the first time, which gives additional information complementing the chemotaxonomical data.

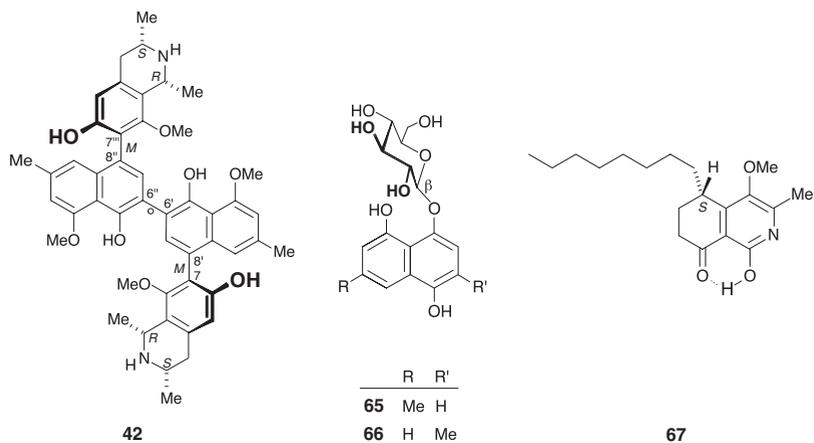


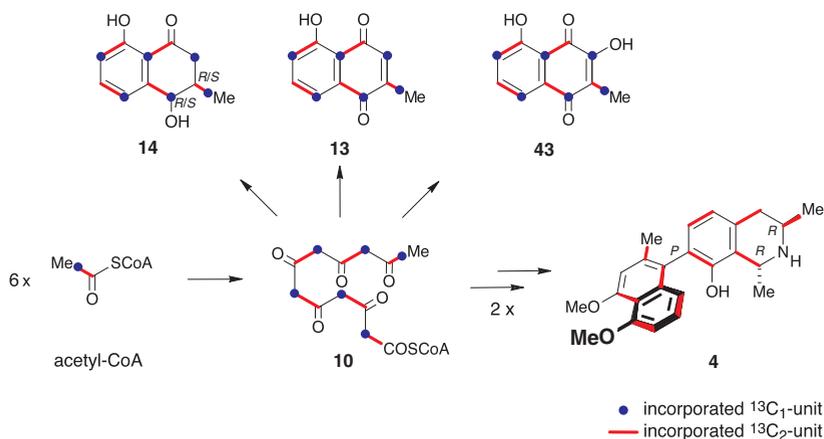
Fig. 62. Ancistrogriffithine A (**42**) from *Ancistrocladus griffithii*, rossoliside (**65**) and plumbaside A (**66**) from *Nepenthes insignis*, and the original structure **67** for antidesmone

- The inaccessibility of the habitats of the plants dealt with make the continuous supply with fresh material for experiments almost impossible and render the permanent observation of living plants. Therefore the worldwide largest collection of Ancistrocladaceae was gathered in the Botanical Garden in Würzburg. In the meantime our stock contains the species *Ancistrocladus abbreviatus*, *A. congolensis*, *A. griffithii*, *A. hamatus*, *A. heyneanus*, *A. korupensis*, *A. cf. letestui* (Bambange), *A. robertsoniorum* and *A. aff. tectorius* (Khao Yai, Nam Tok Sapanhin, Gunung Benom and Don Khon). Furthermore, *Triphyophyllum peltatum* was successfully cultivated, too.<sup>[184]</sup> The unusual flowering of this species in the greenhouse was documented.<sup>[185]</sup> Several plants of *Antidesma membranaceum* and *A. venosum* (Euphorbiaceae) were grown for the isolation of the bioactive alkaloid antidesmone (**5**, Scheme 15).

- Biosynthetic investigations require the availability of living plants throughout the year. Cultures grown *in vitro* are even better suited for this purpose than greenhouse grown plants. The species, which have already been cultivated *in vitro* before the beginning of this work comprised *Ancistrocladus abbreviatus*,<sup>[175]</sup> *A. barteri*, *A. heyneanus*, *Triphyophyllum peltatum*, *Antidesma membranaceum* and *A. venosum*.<sup>[174]</sup> *Ancistrocladus congolensis* (Luchuadi and Ikuey) was added to the collection by germinating seeds. Species of which seeds were not available, e.g.

*Ancistrocladus korupensis* and *A. aff. tectorius* (Khao Yai and Gunung Benom), were transferred to sterile conditions by sterilization of green plant material. Following clonal propagation and rooting *in vitro* regulated by added phytohormones, *Ancistrocladus abbreviatus*, *A. barteri*, and *Triphyophyllum peltatum* were transferred to the greenhouse with a high survival rate.<sup>[175, 187]</sup> In addition to the described organ cultures there was a need for fast growing callus cultures for biosynthetic investigations. Nondifferentiated cells, which are capable of producing the relevant secondary metabolites in large amounts, were induced on explants of *Ancistrocladus heyneanus*, *Triphyophyllum peltatum*, and *Antidesma membranaceum* and were then subcultivated. A protocol was established to regenerate shoots from callus of *Ancistrocladus heyneanus*. Callus of *Antidesma membranaceum* showing slow growth on medium without hormones was received by the transformation with wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes*.

• The establishment of callus cultures of *Triphyophyllum peltatum* was the basis for biosynthetic investigations on naphthylisoquinoline alkaloids. These cells grown on solid medium produced the main metabolite dioncophylline A (**4**) for the first time. In cooperation with Wohlfarth a small quantity of labelled dioncophylline A (**4**) was in fact isolated after the feeding of [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-sodium acetate. For easier handling during the purification process, unlabelled **4** was added. The <sup>13</sup>C-NMR-examination was performed using special instruments. Only a prototype of a cryoprobe-head made by Bruker reached the high sensitivity necessary for the small quantity of the sample. Here pairwise C-C-couplings were visible, which clearly proved the incorporation of intact <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-units. This is the first experimental proof of the polyketidic biogenesis of the naphthylisoquinolines. Hence the molecular halves of dioncophylline A (**4**) are synthesized from two identical halves of β-polycarbonyl-precursors, which are each build from six acetate units (Scheme 14).<sup>[223]</sup> An attempt to label the isolated C-atoms 1-CH<sub>3</sub> and C-3' of dioncophylline A (**4**) with [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-sodium acetate only yielded accordingly labelled droserone (**43**), obviously as a stress related response. Droserone (**43**) had previously been noticed in liquid cultures where it constituted the main metabolite and from which it was isolated in labelled form after feeding [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-sodium acetate.<sup>[191]</sup> The incorporation pattern was in full agreement with the postulated synthesis of a common polyketide precursor from which dioncophylline A (**4**) originates, too (Scheme 14).



Scheme 14. Biosynthesis of the naphthoquinones plumbagin (**13**), droserone (**43**), and isoshinanolone (**14**) and the naphthylisoquinoline alkaloid dioncophylline A (**4**) from acetate

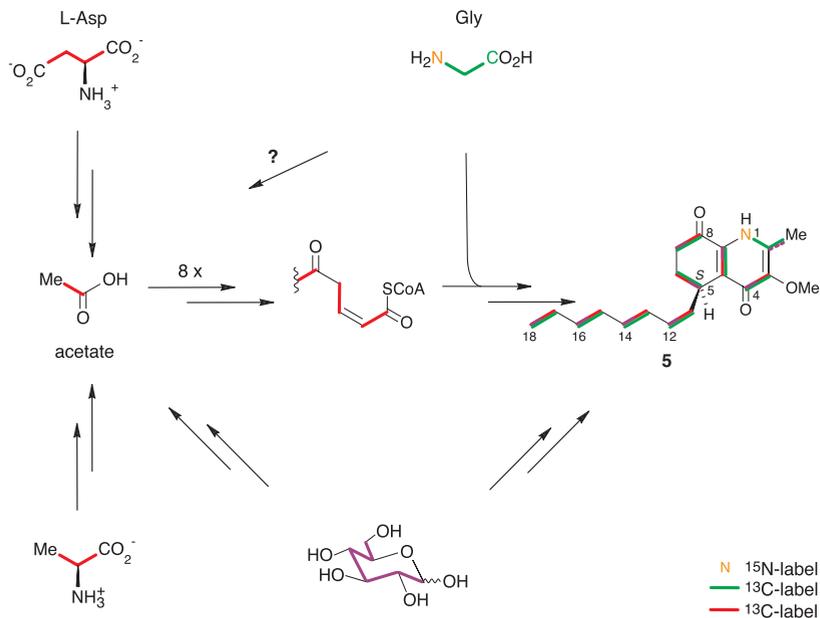
- It was tried to gain some insight into the kinetics of the secondary metabolites of *Triphyophyllum peltatum* by means of elicitation. The contents of plumbagin (**13**), droserone (**43**), and isoshinanolone (**14**) were simultaneously determined in the medium and additionally the content of dioncophylline A (**4**) in the callus. The substances **13**, **43**, and **14** are typical stress metabolites. Changes in the culture conditions already cause an increased production of these phytoalexins. The contents of droserone (**43**) and isoshinanolone (**14**) in the callus are greater than in the medium. The contrary is true for plumbagin (**13**). Elicitation with 100  $\mu\text{M}$  methyl jasmonate temporarily induces the production of plumbagin (**13**) and droserone (**43**). The isoshinanolone (**14**) content is only slightly influenced by elicitation but the concentration of dioncophylline A (**4**) is medium-termed decreased.

- Secondary metabolites show various bioactivities, which have to be determined by experiments. For this purpose two new tests were established. One of them was a test for allelopathic activity. For this the inhibiting effect on germination and growth of garden cress (*Lepidium sativum*) was exemplarily examined for plumbagin (**13**) und dioncophylline A (**4**). Metabolite **13** was far more active than **4**. A second test was performed to show the bactericidal effect of the same substances by means of comparing the inhibition zones in cultures of two *Agrobacterium rhizogenes* strains. Substance **13** was again more active, but the two strains exhibited different sensitivity.

• Though nondifferentiated cells are excellently suited for the research of the biosynthesis, they cannot contribute to the localization of the production site and the transport within the plant. A novel approach was chosen for investigating naphthylisoquinolines in these respects. A scion of *Ancistrocladus heyneanus* was grafted on *A. abbreviatus*. It was then tried to detect alkaloids specific for *A. abbreviatus* (Dioncophyllaceae-type), which are originally not present in *A. heyneanus* in the in the upper part. The application of labelled substances is therefore not necessary for this experiment. However, in cooperation with Wohlfarth it was impossible to detect alkaloids specific for *A. abbreviatus* even with the sensitive online-techniques HPLC-MS/MS, -NMR and -CD in the leaves of the scion. These results therefore contradict the hypothesis of a transport of prefabricated alkaloids from the roots to the upper part of the plants. It rather seems that the alkaloids are synthesized in the leaves. As many combinations of grafted plants as possible were produced for the testing of this assumption. This was possible by grafting *in vitro*. *A. heyneanus*, *A. barteri*, and even *Triphyophyllum peltatum* were grafted on an *A. abbreviatus* stock. It should be possible to root the plants and transfer them to the greenhouse by applying the established methods.

• Tropical pitcher plants of the genus *Nepenthes* are carnivorous. They catch and digest animals in their modified leaves and are able to survive in habitats deficient in nutrients by taking up the ingredients of the prey. An *in vitro* feeding study with *N. insignis* revealed that intact C<sub>2</sub>-units of (L)-[U-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>,<sup>15</sup>N]-alanine, which had been applied biomimetically to the pitchers served to build up plumbagin (**13**), which shows allelopathic activities. This result adds a new facet to the benefit of carnivory for plants. The availability of **13** by a *de novo* synthesis probably enhances the plants' fitness in their defence against phytophagous and -pathogenic organisms. Labelled acetate was not incorporated into **13**. A possible reason for that might be a missing uptake mechanism. In the course of the work the two naphthoquinone glucosides rossoliside (**65**) and plumbaside A (**66**, Fig. 62) were isolated for the first time from *Nepenthes*. They probably constitute storage forms with a very slow turnover as they were not labelled in the feeding experiments.<sup>[256]</sup>

• Antidesmone (**5**) was initially described as an isoquinoline with the structure **67** (Fig. 62). The incorporation pattern obtained in 2D-INADEQUATE experiments after feeding [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]sodium acetate to callus cultures were contradictory to the proposed structure.



Scheme 15. Incorporation pattern for the elucidation of the biosynthesis of antidesmone (**5**)

As the available quantity of **5** was too low to perform conventional structure elucidation by NMR experiments, <sup>15</sup>N-labelled nitrogen sources were applied to cell cultures of *Antidesma membranaceum*. By these means, <sup>15</sup>N-enriched **5** was obtained. The degree of <sup>15</sup>N-incorporation was high enough to allow the correct attribution of the 1,4-pyridone structure by <sup>15</sup>N-heteronuclear experiments.<sup>[310]</sup> The described structural elucidation of the natural compound **5** by using an *in vitro* biosynthetically generated NMR-active counterpart shows impressively the high potential of sterile cultures for the chemistry of natural products. Additional feeding experiments with (D)-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-glucose, (L)-[<sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]-alanine and (L)-[<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]-aspartic acid were performed to prove the polyketidic origin of **5**. However it was shown that the C<sub>2</sub>N-fragment was only labelled after the application of glucose. Only the feeding of [<sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-glycine gave a continuous incorporation with an intact incorporation of glycine as a C<sub>2</sub>N-part. The condensation of a polyketidic C<sub>16</sub>-carbon chain with glycine, of which the carboxyl group is then – at least formally – reduced to the 2-methylgroup of **5**, is new to plants.<sup>[321]</sup> The conversions of the applied substances to the correspondingly labelled acetyl-CoA (Scheme 15) are very diverse, too. Antidesmone (**5**) is of great interest not only because of its structure, which shows similarities to other natural products, and its unusual biosynthesis, but because of its promising activities against *Trypanosoma cruzi*, which is the causing agent of the Chagas disease.<sup>[28]</sup>

## EXPERIMENTELLER TEIL

### 1 Herkunft der Organismen

#### 1.1 Lebendes Pflanzenmaterial

Ein Großteil des lebenden Pflanzenmaterials, sei es in Form von Samen oder Jungpflanzen, wurde von Kooperationspartnern in Afrika und Asien gesammelt. Nur ein kleiner Teil konnte in Absprache mit den lokalen Kooperationspartnern selbst gesammelt werden (Tab. 19).

Tab. 19. Herkunft der bearbeiteten Pflanzen

Art / Familie	Pflanzenteil / Herkunft	Sammler / Beleg
<i>Antidesma membranaceum</i> / Euphorbiaceae	Samen / Bamburi, Kenia	Bringmann / HB 25
<i>Antidesma venosum</i> / Euphorbiaceae	Samen / Bamburi, Kenia	Bringmann / HB 27
<i>Ancistrocladus abbreviatus</i> / Ancistrocladaceae	Samen / Parc de Taï, Elfenbeinküste	Aké Assi / HB 3
<i>Ancistrocladus barberi</i> / Ancistrocladaceae	Samen / kult. Abidjan, Elfenbeinküste	Aké Assi / HB 7
<i>Ancistrocladus congolensis</i> / Ancistrocladaceae	Samen / Ikuey u. Luchuadi, Zaire	Mudogo / HB 53, HB 56
<i>Ancistrocladus griffithii</i> / Ancistrocladaceae	Sämlinge / Khao Lak, Thailand	Rischer / HB 49
<i>Ancistrocladus heyneanus</i> / Ancistrocladaceae	Samen / West Ghats, Indien	Ketkar / HB 4
<i>Ancistrocladus korupensis</i> / Ancistrocladaceae	Sämlinge / kult. Korup Nursery, Kamerun	Ayafor / HB 40
<i>Ancistrocladus robertsoniorum</i> / Ancistrocladaceae	Samen / Kenia	Bär / HB 8
<i>Ancistrocladus tectorius</i> / Ancistrocladaceae	Sämlinge / Johor Bahru, G. Benom, Malaysia	Rischer / HB 46, HB 47
<i>Ancistrocladus tectorius</i> / Ancistrocladaceae	Sämlinge / Khao Yai, Nam Tok Sapanhin, Thailand	Rischer / -
<i>Ancistrocladus tectorius</i> / Ancistrocladaceae	Sämlinge / Khao Yai, Thailand, Don Khon, Laos	Bräuchler / -
<i>Lepidium sativum</i> / Cruciferae	Samen / Carl Spering & Co., Lüneburg	- / -
<i>Nepenthes insignis</i> / Nepenthaceae	Sterilkultur / kult. Rischer	Rischer / -
<i>Nicotiana tabacum</i> SR I / Solanaceae	Sterilkultur / Universität Hohenheim	Huber / -
<i>Triphyophyllum peltatum</i> / Dioncophyllaceae	Samen, Jungpflanzen / Parc de Taï, Elfenbeinküste	Aké Assi / HB 2

## 1.2 Herbarmaterial

Bei einem Besuch des Herbariums in Kew zu Beginn dieser Arbeit konnten die Holotypen der meisten *Ancistrocladaceen* sowie einiger Isotypen selbst untersucht und fotografiert werden. Vom Herbarium in Paris wurden der Lectotypus von *A. cochinchinensis* und die Holotypen von *A. harmandii* und *A. letestui* zur Begutachtung ausgeliehen. In den Herbarien von München (M) und Kuala Lumpur (KL) konnten ebenfalls Exemplare studiert werden. Tabelle 20 gibt einen Überblick über die Aufbewahrungsorte der wichtigsten Typen und über die gesehenen Exemplare (!).

Tab. 20. Typen von *Ancistrocladus*; Abkürzungen entsprechend dem Index Herbariorum<sup>[383]</sup>

Art	K	P	BR	C	BM	M
<i>Ancistrocladus abbreviatus</i>	Lecto.!	Isolecto.	-	-	Isolecto.	-
<i>A. attenuatus</i>	Lecto.!	Iso.	-	Iso.	-	Iso.!
<i>A. barteri</i>	Holo.!	-	-	-	Isolecto.	-
<i>A. carallioides</i>	Holo.!	-	-	-	Isolecto.	-
<i>A. cochinchinensis</i>	Isolecto.!	Lecto.! / Isolecto.	-	Isolecto.	-	-
<i>A. congolensis</i>	-	Iso.	Holo.	-	-	-
<i>A. ealaensis</i>	Iso.!	Iso.	Holo.	-	-	-
<i>A. extensus</i>	Holo.! / Iso.	-	-	-	Iso.	-
<i>A. grandiflorus</i>	Holo.	-	Iso.	-	-	-
<i>A. griffithii</i>	Holo.!	Iso.	-	-	-	-
<i>A. guineensis</i>	Holo.!	Iso.	-	-	-	-
<i>A. hainanensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. hamatus</i>	-	Iso.	-	Holo.	Iso.	-
<i>A. harmandii</i>	Iso.!	Holo.!	-	-	-	-
<i>A. heyneanus</i>	Holo.!	-	-	Iso.	-	-
<i>A. korupensis</i>	Iso.!	Iso.	-	-	-	-
<i>A. letestui</i>	-	Holo.!	Iso.	-	Iso.	-
<i>A. likoko</i>	-	Iso.	Holo. / Iso.	-	-	-

<i>A. pachyrrhachis</i>	Holo.! / Iso.	-	-	-	-	-
<i>A. pinangianus</i>	Holo.! / Iso.	Iso.	Iso.	Iso.	-	Iso.!
<i>A. robertsonianorum</i>	-	-	Holo. / Iso.	-	-	-
<i>A. stelligerus</i>	-	-	-	-	-	Iso.!
<i>A. tanzaniensis</i>	Holo.	-	-	Iso.	-	-
<i>A. tectorius</i>	-	-	-	-	Holo.	-
<i>A. uncinatus</i>	Holo.!	-	-	-	Iso.	-
<i>A. wallichii</i>	Holo.!	-	-	Iso.	-	-

### 1.3 Agrobakterien

Zu den Transformationsversuchen wurden zwei Wildtypstämme von *Agrobacterium rhizogenes* ausgewählt. Der Stamm DSMZ 30200 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bezogen. Der Stamm ATCC 15834 wurde freundlicherweise von Prof. R. Verpoorte (Division of Pharmacognosy, Leiden University, The Netherlands) kostenlos überlassen.

## 2 Kulturbedingungen

### 2.1 Gewächshauskultur

#### 2.1.1 Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Licht

Die Durchschnittstemperatur wurde im Gewächshaus durch die Beheizung der Tische (Bodenwärme) bzw. durch Lüften auf 22° C gehalten. Morgens und abends betragen die Extremwerte 17° C bzw. 28° C (Abb. 63). Es herrschte eine mittlere Luftfeuchtigkeit von 83% mit Maxima von 53% und 95%. In den Vermehrungskammern betrug die Luftfeuchtigkeit annähernd 100%. Auch im Winter wurde die Lichtintensität durch Zusatzbeleuchtung (Natriumdampf lampen) 12 h lang konstant gehalten. Die tägliche Lichtmenge betrug im Mittel *ca.* 340 klx h.

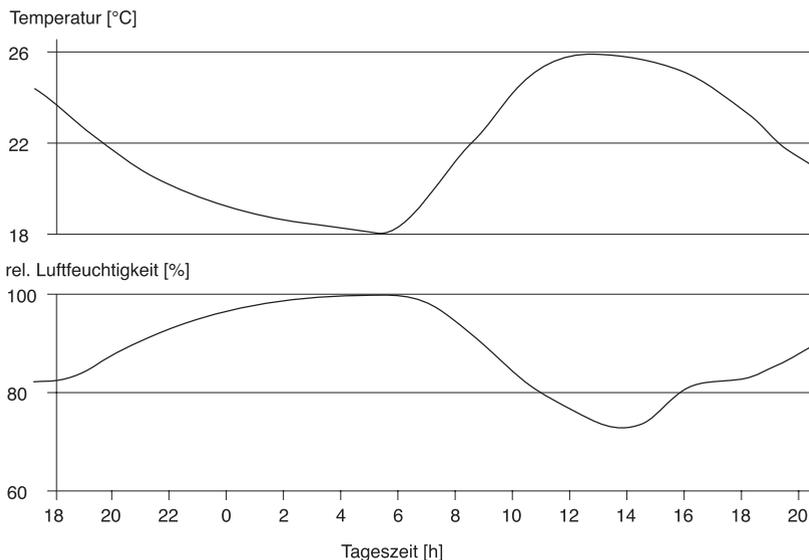


Abb. 63. Typischer Tagesverlauf von Temperatur und Luftfeuchtigkeit im Tropenanzuchthaus des Botanischen Gartens der Universität Würzburg

### 2.1.2 Substrate und Düngung

Generell wurde in Lecaton® (Leca, Pinneberg) verschiedener Korngrößen getopft und, außer im Vermehrungsbereich, wo im Anstauverfahren bewässert wurde, ausschließlich von oben gegossen (einmal täglich). Aussaaten sowie die Anzucht von Sämlingen und abzuhärtenden Pflanzen aus *in-vitro*-Kultur erfolgten in Seramis® (Effem GmbH, Verden/Aller). Je nach Pflanzengröße kamen unterschiedliche Topfgrößen zum Einsatz, wobei Rosentöpfe (hauptsächlich 17 cm x 19 cm für Jungpflanzen) bevorzugt wurden, da diese im Vergleich zu herkömmlichen Töpfen tiefer sind. Die größten Gefäße waren Wannen mit einem Volumen von 65 l, die mit Abzugslöchern versehen worden waren.

Beim Umtopfen wurde dem Substrat Osmocote Langzeitdünger (NPK 14/14/14, Urania Agrochem GmbH, Hamburg) zugesetzt. Nachdem dieser verbraucht war, wurde entsprechend den Herstellerangaben regelmäßig der gleiche Dünger auf die Substratoberfläche aufgestreut.

### 2.1.3 Schädlingsbekämpfung

Relevante Schädlinge waren hauptsächlich Schild- und Wollläuse sowie Trauermückenlarven. Im Vermehrungsbereich traten seltener Schnecken auf. Gegen Trauermückenbefall halfen meist vorsorglich aufgehängte Gelbtafeln (W. Neudorff GmbH KG, Emmerthal) sowie der Einsatz von Nematoden (Nemalagic, Sautter & Stepper GmbH, Ammerbuch), während die Läuse biologisch mit Larven des Australischen Marienkäfers in Schach gehalten werden konnten. War der Befallsdruck zu hoch, so wurde chemisch mit den Mitteln Systemschutz D-Hydro (Dow AgroSciences, München), Neem-Power Konzentrat (F. Schacht GmbH, Braunschweig) und Confidor WG 70 (Bayer AG, Leverkusen) bekämpft.

## 2.2 Sterilkulturen

### 2.2.1 Allgemeine Techniken und Geräte

Alle Arbeiten unter keimfreien Bedingungen wurden in einer Laminar-Flow-Bench (Biohazard Laminar Flow Class II, UniEquip Laborgerätebau) durchgeführt. Die verwandten Geräte wie z.B. Pinzetten, Skalpelle *etc.* wurden in regelmäßigen Abständen autoklaviert und ansonsten nach jeder Benutzung mit 70% Ethanol abgeflammt. Zur Sterilfiltration wurden Einwegfilterkartuschen mit 0.22 µm Porengröße (Bestellnr. FP030/3, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) benutzt.

### 2.2.2 Temperatur und Licht

Im Kulturraum herrschte eine durchschnittliche Temperatur von  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , die auch im Winter mittels einer thermostatgeregelten Zusatzheizung gehalten wurde. Der Beleuchtungsrhythmus folgte einem 14:10-h-Regime. Die Kulturen erhielten von den Leuchtstoffröhren eine photosynthetisch aktive Strahlung von  $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Einige Kalluskulturen wurden in völliger Dunkelheit in separaten Styroporkisten bei gleicher Temperatur gezogen.

### 2.2.3 Gefäße und Kulturbedingungen

Für Organkulturen wurden Weithals-Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von 100 ml und 250 ml verwendet, die mit 50 ml bzw. 80 ml Medium befüllt waren. Verschlussen wurden die Kolben mit Cellulose-Stopfen (Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg), die ihrerseits mit Alufolie abgedeckt wurden. Kalluskulturen wurden gleichermaßen in diesen Kolben sowohl auf Fest- als auch auf Flüssigmedien kultiviert, zum Großteil aber in Einwegpetrischalen ( $\varnothing$  9 cm mit Nocken), die mit Parafilm verschlossen waren. Flüssigkulturen wurden bei 100 U/min auf einem Rundschtüttler (Infors GmbH, Einsbach) aufgestellt. Desweiteren kamen flotierende Siebe (Membrane Raft, Bestellnr. M1917, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) zum Einsatz, die nur in spezielle Gefäße (Magenta GA7 Vessel, Bestellnr. V8505, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen), befüllt mit 50 ml Flüssigmedium, paßten.

### 2.2.4 Medien

Alle Medien wurden bei  $120^\circ \text{C}$  und 1.5 bar Druck für 30 min in einem Dampfsterilisator Varioklav<sup>®</sup> 500 E (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim) sterilisiert. Das benutzte demineralisierte Wasser stammte aus der Hausanlage. Die verwandten Chemikalien waren von analysenreiner Qualität (*p. a.*).

Für die Pflanzenkultur *in vitro* kamen abgewandelte Formulierungen des Murashige-&-Skoog-Mediums (MS)<sup>[368]</sup> und eines Mediums für *Rhododendron* (Anderson)<sup>[369]</sup> zum Einsatz (Tab. 21). Desweiteren wurde McCown's Woody Plant Medium (WPM)<sup>[370]</sup> benutzt, welches als fertige Mischung (Bestellnr. M6774, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) bezogen wurde.

Alle Medien wurden mit 30 g/l Saccharose als Kohlenstoffquelle versetzt und mit 2 g/l Gelrite<sup>®</sup> (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) verfestigt. Bei Flüssigmedien wurde kein Gelrite<sup>®</sup> zugesetzt. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 1 N NaOH auf 5.8 eingestellt.

Tab. 21. Medien zur Pflanzenkultur

		MS verändert [mg/l]	Anderson verändert [mg/l]
Anorg. Makrobestandteile	KNO <sub>3</sub>	380 <sup>a</sup>	480
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	330 <sup>a</sup>	400
	CaCl <sub>2</sub>	88 <sup>a</sup>	332.2
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	74 <sup>a</sup>	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34 <sup>a</sup>	330.6 <sup>b</sup>
Eisenquelle	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	55.7
	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	74.5
Anorg. Mikrobestandteile	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3
	ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	8.6	8.6
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2
	KI	0.83	0.83 <sup>c</sup>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
Organische Bestandteile	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
	myo-Inositol	100	100
	Nikotinsäure	0.5	0.5 <sup>d</sup>
	Pyridoxolhydrochlorid	0.5	0.5 <sup>d</sup>
	Thiaminiumdichlorid	0.1	0.1 <sup>d</sup>
	Glycin	2	2 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> 1/5 der Originalformulierung; <sup>b</sup> anstatt 380 mg/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; <sup>c</sup> anstatt 0.3 mg/l KI; <sup>d</sup> nicht in der Originalformulierung enthalten

*Nepenthes insignis*, die aus Samen *in vitro* auf 1/5 MS erhalten worden waren, wurden für die Verfütterungsversuche auf sterilem befeuchtem Seramis<sup>®</sup> (Effem GmbH, Verden/Aller) gehalten, das in kleine Einwegpetrischalen (Ø 5 cm) gefüllt war. Die Petrischalen mit den Pflanzen (*ca.* Ø 6 cm) wurden in größeren Gefäßen plaziert, die mit sterilem, befeuchtem Filterpapier ausgelegt worden waren, so daß die Kannen seitlich über die Ränder hinausgingen. Dies war eine Vorsichtsmaßnahme, um zu verhindern, daß Fütterungslösung aus alten Kannen in den Wurzelballen gelangte.

Die Medien für die Bakterienkultur (Tab. 22) wurden vor dem Autoklavieren mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt.

Tab. 22. Kulturmedien für *Agrobacterium rhizogenes*: Verändertes YT-Kulturmedium (Yeast-tryptone) [371] für ATCC 15834 (A); YMB-Kulturmedium (Yeast-mannitole 'B') [371] für DSMZ 30200 (B)

A	Bestandteil	[g/l]	B	Bestandteil	[g/l]
	CaCl <sub>2</sub>	0.8		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
	Hefe-Extrakt	3.0		MgSO <sub>4</sub>	0.2
	Pepton	5.0		NaCl	0.1
	Difco Bacto Agar	10.0		Hefe-Extrakt	0.4
				Mannitol	10.0
				Difco Bacto Agar	10.0

### 2.2.5 Sterilisation von Pflanzenmaterial

Die Oberflächensterilisation von *Ancistrocladus*-Samen erfolgte in gleicher Weise wie früher beschrieben.<sup>[245, 174]</sup> Als Sterilisationsmittel diente dabei immer Natriumhypochloritlösung (13% freies Chlor). Unsteriles Pflanzenmaterial wurde nach einem mehrstufigen Protokoll desinfiziert. Zunächst wusch man das Material, dessen Blätter eingekürzt worden waren, ca. 10 min in sterilem Wasser mit einem Tropfen Triton X 100 (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe). Die Blätter wurden dann weiter eingekürzt und 5 min lang in Weichagar gelegt. Dieser Weichagar bestand aus 0.06 g/20 ml Agar (Bestellnr. A9799, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) mit 0.6 ml PPM™ (Bestellnr. PPM-001-100, Plant Cell Technology Inc., Washington, USA) in sterilem Wasser. Anschließend setzte man die Pflanzen auf 1/5 MS-Medium mit 5 ml/l PPM™. Beim zunächst wöchentlich durchgeführten Umsetzen auf frisches Medium wurden die Explantate jeweils erneut für 5 min in Weichagar gelegt. Nach zwei Monaten änderte man den Umsetzturnus auf einmal pro Monat bei beibehaltener Behandlung mit Weichagar. Erst nach einem Jahr konnten die Pflanzen auf Medium ohne PPM™ überführt werden.

### 3 Pfropfversuche

#### *Gewächshausbedingungen:*

Im Gewächshaus wurden je eine *ca.* 50 cm hohe Jungpflanze von *A. abbreviatus* und von *A. heyneanus* ausgesucht, die ungefähr gleich dicke Stämme hatten. Mit einem scharfen Messer führte man *ca.* 10 cm unter der Sproßspitze einen 5 cm langen schrägen Schnitt aus. Es wurde darauf geachtet, daß der Schnitt in grünem, unverholztem Gewebe lag. Nach dem Einkürzen der Blätter wurde jedes Reis auf die Unterlage der anderen Art mit Bast aufgebunden, so daß sich möglichst große Kambiumflächen berührten (Abb. 64A). Anschließend wurden die Schnittwunden mit Baumwachs versiegelt. Die Pflanzen kultivierte man dann einen Monat lang im Vermehrungsbereich bei hoher Luftfeuchtigkeit, bevor sie wieder unter normalen Bedingungen im Gewächshaus weiterkultiviert wurden. Sobald Spitzenwachstum und in der Folge auch Dickenwachstum des Sprosses einsetzte, wurden das Baumwachs und die Bastverschnürung vorsichtig abgenommen.

#### *In-vitro-Bedingungen:*

Es wurden *in vitro* kultivierte Pflanzen von *A. abbreviatus*, *A. barteri*, *A. heyneanus* und *T. peltatum* mit ungefähr gleichen Sproßdurchmessern ausgewählt. Die Pflanzen wurden dann auf halber Länge mit einem scharfen Skalpell durchgeschnitten. Die Oberteile schnitt man V-förmig an, und das Unterteil erhielt am apikalen Ende einen *ca.* 7 mm langen senkrechten Schnitt (Abb. 64B).

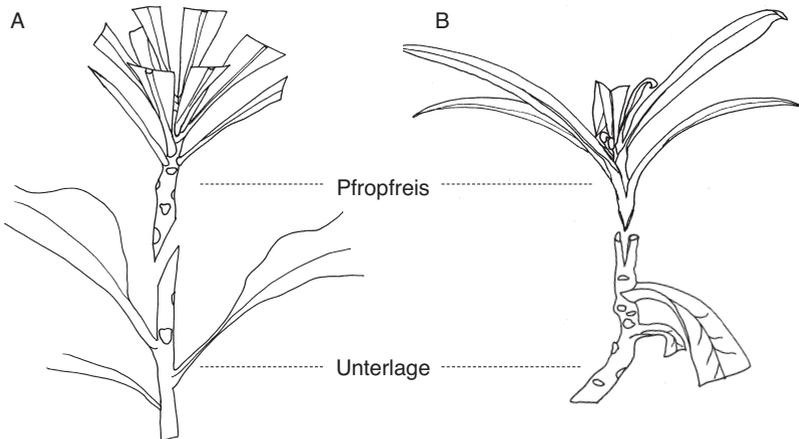


Abb. 64. Pfropfmethode: Gewächshausbedingungen (A); *in-vitro*-Bedingungen (B)

Das Pfropfreis wurde dann vorsichtig in den Spalt der jeweiligen Unterlage geschoben, indem dieser leicht auseinandergespreizt wurde. Zur Fixierung klemmte man mit Ethanol sterilisierte Büroklammern an die Pfropfstelle. Anschließend wurden die Pflanzen auf frisches Medium überführt. Sobald an der Nahtstelle Kallusbildung sichtbar war, konnten die Klammern entfernt werden.

#### **4 Filmtest**

Der durchgeführte Filmtest ist eine Abwandlung des von Fratello<sup>[189]</sup> beschriebenen Tests zur Visualisierung von Protease-Aktivität, der zur Untersuchung von karnivoren Pflanzen eingesetzt wird.<sup>[190]</sup> Die Proteasen bauen die Gelatineschichten des Filmstreifens ab und legen so die einzelnen Farbschichten frei. Entwickelte Streifen von unbelichtetem Fuji Sensia 100 Film (Fuji, Tokyo, Japan) wurden dazu eng auf die Blätter gelegt und über Nacht darauf gelassen. Man spülte die Filmstreifen dann mit destilliertem Wasser und ließ sie an der Luft trocknen. Anschließend wurden sie fotografiert und ausgewertet.

## 5 Transformationsversuche mit *Agrobacterium rhizogenes*

Gefriergetrocknete Bakterienkulturen wurden gemäß der beiliegenden Anleitung der DSMZ wieder befeuchtet. Das gequollene Pellet wurde in 3 ml Gesamtvolumen des jeweiligen Mediums aufgeschlämmt. Von diesem Ansatz legte man Stich- bzw. Ausstrichkulturen auf entsprechenden Medienplatten an. Nach 2 d bei Inkubation im Dunkeln und bei einer konstanten Temperatur von 25° C war bereits ein deutliches Wachstum sichtbar. Die Kulturen wurden in zweimonatigem Turnus auf frisches Medium überführt.

Für die Transformationsversuche mußten zunächst Flüssigkulturen der Agrobakterien angelegt werden. In 100-ml-Erlenmeyerkolben wurde 50 ml Medium vorgelegt, mit ca. 5 Impfösen der oben beschriebenen Kulturen beimpft und 2 d im Dunkeln bei 25° C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Suspension photometrisch bei 546 nm bestimmt. Falls sie weniger als 0.7 betrug, wurde solange weiterkultiviert, bis mindestens dieser Wert erreicht war. Zur Infektion der pflanzlichen Explantate wurde die Suspension in eine Spritze aufgezogen und kleine Tropfen davon in frische Verletzungen eingebracht, die mit einer Kanüle verursacht worden waren. Bei einigen Infektionsversuchen wurden die Agrobakterien zur Virulenzsteigerung zuvor mehrere Stunden mit Acetosyringon (Bestellnr. D13,440-6, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) behandelt. Dies geschah so, daß zu 3 ml einer Agrobaktériensuspension der optischen Dichte von 0.5 solange eine 20 mM Acetosyringonlösung in DMSO (sterilfiltriert) gegeben wurde, bis eine Endkonzentration von 200 µM erreicht war.

Nach einer Woche Cokultur wurden die Explantate auf Decontaminationsmedium überführt. Für den Stamm DSMZ 30200 war dies Medium, das mit 100 mg/l Cefotaxim (Bestellnr. C-7039, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) und 5 ml/l PPM™ (Bestellnr. PPM-001-100, Plant Cell Technology Inc., Washington, USA) angereichert war, während für ATCC 15834 100 mg/l Ampicillin (Bestellnr. A-9393, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) und 5 ml/l PPM™ zugesetzt wurden. Auf diese Medien wurde zweiwöchentlich umgesetzt. Meistens konnte nach zwei Monaten auf normalem Medium weiterkultiviert werden, da kein Agrobakterienwachstum mehr beobachtet wurde.

Zur längerfristigen Lagerung der Agrobakterien wurden 1 ml Aliquots der oben beschriebenen flüssigen Suspension 1:1 mit dem entsprechenden Kulturmedium, das 30% Glycerin enthielt, gemischt und bei -45° C aufbewahrt.

## 6 Hemmhoftest

Von den *Agrobacterium-rhizogenes*-Wildtyp-Stämmen ATCC 15834 und DSMZ 30200 wurden zunächst Flüssigkulturen angelegt. Dazu inokulierte man 50 ml des jeweiligen Mediums (vgl. Kap. 2.2.4) mit fünf Impfösen Bakterienabstrich von Dauerkulturen. Nach 2 d Inkubation bei 25° C legte man mit 200 µl dieser Suspensionen Ausstrichkulturen auf entsprechenden Medienplatten an. In die Mitte dieser Petrischalen (Ø 90 mm) wurden die jeweiligen Testscheiben (Ø 14 mm, Höhe 7.6 mm) aufgelegt. Diese Scheiben, die die Testsubstanzen in den Konzentrationen 0, 31, 63, 125, 250 und 500 ppm beinhaltenen, bestanden aus dem jeweiligen Kulturmedium. Nach 3 d bei 25° C wurde der Hemmhof ausgemessen und die Platten fotografiert.

## 7 Test auf allelopathische Wirkungen

Einwegpetrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm wurden mit Filterpapierscheiben ausgelegt. In jeweils eine Petrischale wurden 2 ml einer methanolischen Lösung der Testsubstanz mit den Konzentrationen 0, 31, 63, 125, 250 und 500 ppm pipettiert. Nachdem das Lösungsmittel verdampft war, gab man pro Petrischale 2 ml Wasser zu und legte 50 Kressesamen (*Lepidium sativum*) aus. Anschließend wurden die Schalen mit Parafilm verschlossen und bei 25° C im Dauerlicht für 4 d inkubiert. Man bestimmte dann die Keimungsrate und maß mittels eines Lineals die ausgestreckte Wurzellänge und die Hypokotyllänge. Die Gesamtlänge wurde als die Summe aus Wurzellänge und Hypokotyllänge berechnet.

## 8 Isolierung und Analytik von Sekundärmetaboliten

### 8.1 Verwendete Geräte

*Schmelzpunkte:* Die Schmelzpunkte wurden an einem Kofler-Heiztischmikroskop der Fa. Reichert bestimmt und sind nicht korrigiert.

*Infrarotspektren (IR):* Zur Aufnahme der Infrarotspektren benutzte man ein Spektrometer vom Typ 1420 der Fa. Perkin-Elmer (Rodgau-Jügesheim). Um die Intensität der Absorptionsbanden zu kennzeichnen, wählte man die folgenden Abkürzungen: s = stark, m = mittel, w = schwach und br = breit.  $\nu$  bezeichnet die Wellenzahl in  $\text{cm}^{-1}$ .

*Drehwerte:* Zur Bestimmung der optischen Aktivitäten diente ein Polarimeter des Typs 241 der Fa. Perkin-Elmer (Rodgau-Jügesheim). Die spezifischen Drehwerte  $[\alpha]_D$  wurden bei den Wellenlängen  $\lambda = 546 \text{ nm}$  und  $\lambda = 579 \text{ nm}$  der Quecksilberdampfampe, einer Spaltbreite von 1 mm und  $25^\circ \text{ C}$  ermittelt. Dann wurde mit Hilfe der Drude-Gleichung<sup>[372]</sup> auf die Natrium-D-Linie ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ) extrapoliert:

$$\alpha_{589} = \frac{\alpha_{579} \times 3.199}{4.199 - \frac{\alpha_{579}}{\alpha_{546}}} \quad [\alpha]_D = \frac{\alpha_{589} \times 100}{c \times d} \quad \begin{array}{l} \alpha : \text{gemessener Drehwert;} \\ c : \text{Konzentration [g/100ml];} \\ d : \text{Schichtdicke [dm]} \end{array}$$

*Kernresonanzspektren ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ):*  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren wurden mit einem DMX-600-Spektrometer (Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten) in  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7.26$  und  $77.01 \text{ ppm}$ ) und  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta = 3.30$  und  $49.01 \text{ ppm}$ ) gemessen. Als interne  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Standards dienten die Resonanzsignale der verwendeten deuterierten Lösungsmittel. Die Aufnahme von HMQC- (optimiert für  $^1J_{\text{HC}} = 145 \text{ Hz}$ ), HMBC- (optimiert für  $^nJ_{\text{HC}} = 7 \text{ Hz}$ ) und ROESY-Spektren erfolgte am selben Gerät. Die Abkürzungen s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multiplett kennzeichnen die Multiplizität der Signale. 'br' bedeutet 'breit'. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz [Hz] angegeben. Spezielle Techniken zur NMR-spektroskopischen Untersuchung von isotopenmarkierten Substanzen finden sich bei Wohlfarth.<sup>[168]</sup>

*Massenspektren (MS):* DCI-Messungen wurden mit dem Gerät Finnigan MAT 90 (Finnigan MAT, Bremen) durchgeführt. Als Reaktantgase dienten Ammoniak und Isobutan. HPLC-ESI-MS/MS-Experimente wurden an einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer TSQ 7000 durchgeführt, das mit einem Elektrosprayinterface (Finnigan MAT, Bremen) und einer DECstation 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring) mit ICIS 8.1 Software (Finnigan MAT, Bremen) zur Datenauswertung ausgestattet war. Als Hilfsgas diente Stickstoff und als Kollisionsgas Argon (1.8 Torr). Die Kapillartemperatur betrug  $200^\circ \text{ C}$  bei einer ESI-Spannung von 3.5 kV. Positive Ionen wurden durch Scannen zwischen 150 und 800 u mit einer Scanzeit von 1 s detektiert.

## 8.2 Vorbereitung von Lösungsmitteln

Methanol wurde in Industrie-Qualität bezogen und destilliert, nachdem es 4 h über Magnesium zum Sieden gebracht worden war. Dichlormethan wurde 2 h über Phosphorpentoxid unter Rückfluß erhitzt und abdestilliert. Acetonitril wurde geeignet für die HPLC bezogen (Bestellnr. 1.00030.2500 Lichrosolv® und 1.13358.2500 Prepsolv®, Riedel-de-Häen AG, Seelze). Hochreines Wasser wurde mit Hilfe der Reinstwasseranlage Milli Q der Fa. Millipore (Bedford, USA) mit vorgeschalteter VE-Patrone B 10D gewonnen. Für die HPLC wurden die Lösungsmittel durch 5 min Einleiten von Helium entgast.

## 8.3 Probenvorbereitung

*Festphasenextraktion (SPE):* Man benutzte mit C<sub>18</sub>-Phase gepackte Kartuschen (Bestellnr. 7020-03, J.T. Baker Inc., Phillipsburg, USA). Die Kartuschen wurden vor dem Probenauftrag zunächst mit 3 ml Methanol und 6 ml H<sub>2</sub>O konditioniert.

*Gefriertrocknung:* Das mit flüssigem Stickstoff eingefrorene Pflanzenmaterial wurde an der Gefriertrocknungsanlage Alpha I-4 der Fa. Christ (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) bei 0.01 mbar getrocknet.

*Zentrifugation:* Es kamen die DuPont-Geräte Microspin 12S und Sorvall® RC-5B (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau), letzteres ausgerüstet mit den Rotoren SS34 und SH-MT, zum Einsatz.

## 8.4 Chromatographische Methoden

*Dünnschichtchromatographie (DC):* Es wurden DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) verwendet. Zur Entwicklung von stickstoffhaltigen Substanzen wurden die DC-Folien vor dem Gebrauch mit NH<sub>3</sub>-Gas desaktiviert. Detektiert wurden die Substanzen über ihre Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und über die Anregung ihrer Eigenfluoreszenz bei 366 nm. Die spezifische Anfärbung von Alkaloiden wurde mit Dragendorffs Reagenz (Bestellnr. 1.02035, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) in Kombination mit Methanol/Schwefelsäure (19:1) erreicht.

*Säulenchromatographie (SC):* Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 60 0.032–0.063 mm (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) benutzt. Die Säulen wurden naß befüllt. Alle Mengenverhältnisse der Laufmittelgemische sind in Volumenprozent angegeben.

*Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)*: Die Trennung wurde mit einer Lobar<sup>®</sup>-Säule RP-18 (Größe B) der Fa. Merck durchgeführt. Das Gerät P400 der Fa. Latek (Laborgeräte Technik GmbH, Heidelberg) diente als Pumpe. Man detektierte die eluierenden Substanzen bei 254 nm mit dem Detektor Visi-6 der Fa. Latek.

*Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)*: Die verwendete RP-HPLC-Anlage bestand aus zwei Pumpen (Millipore<sup>®</sup> Waters Model 510, Waters Corp., Milford, USA), einem Injektionsblock, einer Vorsäule (Waters  $\mu$  Bondapak<sup>™</sup> C<sub>18</sub> Guard Pak<sup>™</sup> HPLC Precolumn Insert), sowie einer analytischen Trennsäule (Waters  $\mu$  Bondapak<sup>™</sup> C<sub>18</sub> 3.9 x 300 mm Column), einer semipräparativen Säule (Waters Symmetry<sup>™</sup> Prep C<sub>18</sub> 7.8 x 300 mm, 7  $\mu$ m Column) oder einer präparativen Säule (Waters Deltapak<sup>™</sup> C<sub>18</sub> 300 Å, 19 x 30 cm, 15  $\mu$ m Column). Detektiert wurde bei 254 nm mittels eines Absorptionsdetektors (Waters 484 Tunable Absorbance Detector). Die Steuerung erfolgte über einen mittels Interface (Millipore<sup>®</sup> Waters System Interface Module) angeschlossenen PC (Software: Millenium<sup>®</sup> Waters Chromatography Manager). Als Laufmittel wurde, falls nicht anders vermerkt, ein Gemisch aus Acetonitril und Reinstwasser mit 1% Trifluoressigsäure (Bestellnr. 61030, Riedel-de-Häen AG, Seelze) verwendet. Die Zusammensetzungen bzw. Gradienten der verwendeten Laufmittelgemische sind bei den jeweiligen Versuchen in Volumenprozent angegeben. Für HPLC-ESI-MS/MS-Versuche wurde die Trennung mit einer Waters-Symmetry<sup>™</sup>-C<sub>18</sub>-Säule (150 x 2.1 mm, 5 $\mu$ m, Waters Corp., Milford, USA) durchgeführt. Die HPLC-Anlage bestand aus einer Spritzenpumpe 140b (Applied Biosystems, Foster City, USA). Bei einem Fluß von 0.2 ml/min wurde folgender Gradient zur Elution benutzt: 0 – 20 min 10 – 40% Acetonitril (linearer Gradient). Das Probenvolumen betrug 5  $\mu$ l.

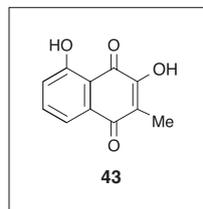
## 8.5 Isolierung von Droseron (43) aus Zellkulturen von *Triphyophyllum peltatum*

Das Flüssigmedium wurde abdekantiert und über ein Faltenfilter (Typ 595, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) abfiltriert. Nach dem Ansäuern des schwach basischen Mediums mit 0.2 ml 0.1 N HCl zeigte sich ein für Hydroxynaphthochinone charakteristischer Farbumschlag von Dunkelrot nach Gelb.<sup>[373]</sup> Man schüttelte die Lösung sodann mehrmals mit Dichlormethan aus, bis sie annähernd farblos war. Das Lösungsmittel wurde *i. vac.* abdestilliert, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mittels präparativer MPLC [mobile Phase: MeOH/H<sub>2</sub>O v/v 70/30 mit 1% TFA (Bestellnr. 61030, Riedel-de-Häen AG, Seelze)] gereinigt. Droseron (43) blieb als gelber Feststoff nach dem Abziehen des Lösungsmittels zurück (vgl. Ausbeuten Kap. 9.1) und konnte durch Vergleich mit einer authentischen Referenzprobe<sup>[374]</sup> identifiziert werden.<sup>[191]</sup>

**Droseron (43)**

Schmp. 172° C, Lit.<sup>[196]</sup> 171° C.

Alle übrigen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.<sup>[36]</sup> Das chromatographische Verhalten entsprach dem einer authentischen Probe.<sup>[374, 384]</sup>



### 8.6 Isolierung von Dioncophyllin A (4) aus Zellkulturen von *Triphyophyllum peltatum*

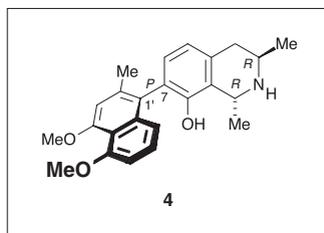
Die gefriergetrockneten Kalli wurden über Nacht mit zweimal je 50 ml Methanol, das mit 1% 0.1 N HCl angesäuert war, extrahiert. Nach Verdünnung mit 100 ml H<sub>2</sub>O und Neutralisierung mit Ammoniak schüttelte man mit Dichlormethan aus. Das Lösungsmittel wurde *i. vac.* abdestilliert, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mittels präparativer RP-MPLC (mobile Phase: MeOH/H<sub>2</sub>O v/v 70/30 mit 1% TFA), Normalphasen-MPLC (Lobar Si-60, mobile Phase: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH v/v 90/10 mit 1% NEt<sub>3</sub>) und chiraler HPLC (Chiralcel OD 250 x 7.8 mm, mobile Phase: *n*-Hexan/*i*-PrOH mit 1% NEt<sub>3</sub>) gereinigt (vgl. Ausbeuten Kap. 9.1).<sup>[168, 223]</sup>

**Dioncophyllin A (4)**

Schmp. 215° C, Lit.<sup>[31]</sup> 214° C.

$[\alpha]_D^{20} = -15.0^\circ$  ( $c = 0.45$  in CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>[31]</sup> 14,9°.

Alle übrigen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.<sup>[385]</sup> Das chromatographische Verhalten entsprach dem einer authentischen Probe.<sup>[385]</sup>



### 8.7 Quantitative Bestimmung von Droseron (43), Plumbagin (13), Isoshinanolon (14) und Dioncophyllin A (4) in Flüssigkulturen von *Triphyophyllum peltatum* nach Elicitierung

*Durchführung der Elicitierungsversuche:* Pro 200-ml-Erlenmeyerkolben wurden sechs *ca.* gleich große Kalli überführt, deren Frischgewicht bestimmt und 50 ml verändertes MS mit 2 mg/l BAP und 0.01 mg/l NAA zugegeben. Das Trockengewicht der Kalli wurde mit einem zuvor ermittelten Umrechnungsfaktor berechnet. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt. Die Kalli stammten

immer von Festmedienkulturen mit dem gleichen Phytohormonzusatz außer für einen Vergleichsversuch, bei dem bereits an Flüssigkulturbedingungen angepasste Kalli benutzt wurden. Sodann wurden die Kulturen auf einem Rundschtüttler plaziert. Nach 7 bzw. 14 d wurde durch Zupipettieren der entsprechenden Menge Methyl-(±)-Jasmonat (Bestellnr. 1211-29-6, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) elicitiert. Nach festgelegten Intervallen von 0 h, 6 h, 1 d, 2 d und 7 d (beim Vergleichsversuch zwischen adaptierten und neu überführten Kalli noch mehr Meßpunkte) wurde vom Medium 1 ml und je ein Kallus entnommen.

*Extraktion und Probenvorbereitung:* Die Medienproben wurden 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Aufbewahrung eingefroren. Die Kalli wurden lyophilisiert, pulverisiert und 100 mg mit 10 ml Acetonitril/H<sub>2</sub>O (2:8) für 36 h bei Raumtemperatur extrahiert. Danach wurde die Lösung bei 12000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand ebenfalls eingefroren.

*Herstellung der Standards und Kalibrierung:* Von den HPLC-reinen Referenzen Droseron (**43**), Plumbagin (**13**), Isoshinanolon (**14** mit *trans*-3*R*,4*S*-Konfiguration) und Dioncophyllin A (**4**) wurden mittels einer Verdünnungsreihe mindestens fünf Lösungen in Acetonitril/H<sub>2</sub>O (2:8) hergestellt und mit der HPLC-UV vermessen (je drei Wiederholungen). Die ermittelten Peakflächen wurden gegen die Konzentrationen aufgetragen. Die linearen Beziehungen dienen zur externen Kalibrierung.<sup>[375]</sup> Tabelle 23 faßt die Kalibrierungsparameter zusammen.

Tab. 23. Kalibrierungsparameter für die Quantifizierung von Droseron (**43**), Plumbagin (**13**), Isoshinanolon (**14**) und Dioncophyllin A (**4**) mit HPLC-UV

Substanz	$t_R$	$y = a + bx$	$y = a + bx$	$R^2$
	[min]	a	b	
<b>43</b>	20.97	0	$2 \cdot 10^{-6}$	0.9874
<b>13</b>	24.35	0	$5 \cdot 10^{-7}$	0.9908
<b>14</b>	15.10	0	$7 \cdot 10^{-7}$	0.9992
<b>4</b>	19.66	0	$2 \cdot 10^{-6}$	0.9719

*HPLC:* Zum Einsatz kam oben beschriebene HPLC-Anlage mit analytischer Säule. Folgender 25 min Elutionsgradient wurde benutzt: 0 – 2 min 20% Acetonitril, 2 – 15 min 20 – 50% Acetonitril (linearer Gradient), 15 – 20 min 50 – 60% Acetonitril (linearer Gradient), 20 – 25 min 60 – 20% Acetonitril (linearer Gradient). Der Gradient gestattete es, alle Metaboliten in einem Lauf zu detektieren. Isoshinanolon (**14**) wurde auf der verwendeten Säule nicht in seine Diastereomere oder Enantiomere getrennt. Die Proben wurden direkt vor dem Aufgeben aufgetaut und sofort nach der Kalibrierung vermessen.<sup>[376]</sup> Vom Medium wurden jeweils 100 µl eingespritzt, vom Kallusextrakt jeweils 50 µl.

## 8.8 Isolierung von Plumbagin (13), Rossolisid (65) und Plumbasid A (66) aus Sterilkulturen von *Nepenthes insignis*

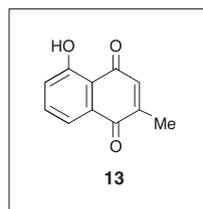
*Extraktion:* Gefütterte oder ungefütterte Pflanzen wurden nach 90 d komplett geerntet. Man ermittelte das FG und nach Gefriertrocknung das TG (vgl. Tab. 33). Das Material wurde pulverisiert und mit Methanol/H<sub>2</sub>O (9:1) über Nacht bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Filtration durch ein Faltenfilter (Typ 595, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) zog man das Lösungsmittel ab und nach erneuter Lyophilisation bestimmte man das TG des Rohextrakts. Eine erste Vorfraktionierung und eine Entfernung des Chlorophylls wurde mit R<sub>P</sub>C<sub>18</sub>-Einwegkartuschen (Bestellnr. 7020-03, J.T. Baker Inc., Phillipsburg, USA) erreicht. Die Kartuschen wurden dazu nach den Angaben des Herstellers konditioniert und der Rohextrakt in 6 ml Methanol/H<sub>2</sub>O (1:1) aufgegeben. Nach dem Sammeln der Fraktion 1 erhielt man drei weitere Fraktionen, indem man die Säule nacheinander mit jeweils 3 ml Methanol/H<sub>2</sub>O (7:3) spülte.

Der Rückstand aus Fraktion 2 wurde nach dem Trocknen gewogen und in 1 ml Methanol gelöst. Die weitere Reinigung wurde durch präparative HPLC mit einer isokratischen mobilen Phase aus H<sub>2</sub>O/Acetonitril (4:1) bei einer Flußrate von 5 ml/min bewerkstelligt. Man sammelte die bei 254 nm detektierten Peaks manuell. Rossolisid (65) und Plumbasid A (66) erhielt man rein (vgl. Ausbeuten Tab. 33). Plumbagin (13) wurde aus Fraktion 4 durch Flash CC (Silica Gel 60, Petrolether/Ethylacetate 100:5) abgetrennt und stimmte mit einer Referenzprobe (Bestellnr. P7262, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) überein (vgl. Ausbeuten Tab. 33).

### Plumbagin (13)

Schmp. 77° C, Lit.<sup>[258]</sup> 76 – 77° C.

Alle übrigen physikalischen und spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.<sup>[209]</sup> Das chromatographische Verhalten entsprach dem einer authentischen Probe (Bestellnr. P7262, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen).



Rossolisid (**65**)

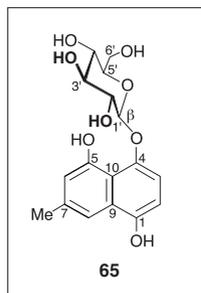
Man erhielt **65** als amorphen Feststoff, dessen Kristallisation nicht gelang.

$[\alpha]_D^{20} = -168.2^\circ$  ( $c = 0.122$  in MeOH), Lit. keine Angabe.

IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3400 (br), 1600 (m), 1510 (m), 1090 (s), 1070 (s), 1050 (s), 820 (w), 770 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 2.40$  (s, 3H, 7- $\text{CH}_3$ ), 3.40 – 3.60 (m, 4H, Glycosid-H), 3.74 (dd, 1H,  $J = 12.1, 5.6$ , 6'-H'), 3.93 (dd, 1H,  $J = 12.1, 2.1$ , 6'-H), 4.95 (d, 1H,  $J = 7.8$ , 1'-H), 6.64 (d, 1H,  $J = 8.3$ , 2-H) 6.67 (d, 1H,  $J = 1.60$ , 6-H) 7.12 (d, 1H,  $J = 8.3$ , 3-H) 7.45 (dd, 1H,  $J = 1.0, 1.6$ , 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 21.9$  (7- $\text{CH}_3$ ), 62.6 (C-6'), 71.4 (C-4'), 75.1 (C-2'), 78.2 (C-3'), 78.7 (C-5'), 105.3 (C-1'), 108.4 (C-2), 111.9 (C-3), 113.8 (C-6), 114.0 (C-8), 116.1 (C-10), 130.0 (C-9), 137.3 (C-7), 148.8 (C-4), 150.0 (C-1), 154.6 (C-5).



MS (DCI,  $\text{NH}_3$ ) 370 (26.8)  $[\text{M}^+ + \text{NH}_4]$ , 353 (17.9)  $[\text{M}^+ + \text{H}]$ .

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur angegebenen.<sup>[258, 259]</sup>

Tab. 24. ROESY-Wechselwirkungen von **65**

Proton	[ppm]	Proton	[ppm]
7- $\text{CH}_3$	2.40	8-H	7.45
4'-H	3.42	6'-H	3.93
		6'-H	3.74
5'-H	3.46	6'-H	3.93
1'-H	4.95	3-H	7.12
		2'-H	3.52
		3'-H	3.46
		6'-H	3.74
		6'-H'	3.93
2-H	6.64	3-H	7.12
6-H	6.67	7- $\text{CH}_3$	2.40
		8-H	7.45

Tab. 25. HMQC- und HMBC-Korrelationen von **65**

<sup>13</sup> C-Zuordnung	[ppm]	HMQC-Korrel.	[ppm]	HMBC-Korrel.	[ppm]
7-CH <sub>3</sub>	21.9	7-CH <sub>3</sub>	2.40	6-H	6.67
				8-H	7.45
C-6'	62.6	6'-H	3.74	4'-H	3.42
		6'-H'	3.93		
C-4'	71.4	4'-H	3.42	3'-H	3.46
				6'-H	3.74
				6'-H'	3.93
C-2'	75.1	2'-H	3.52	3'-H	3.46
C-3'	78.2	3'-H	3.46	2'-H	3.52
				4'-H	3.42
C-5'	78.7	5'-H	3.46	6'-H	3.74
				6'-H'	3.93
C-1'	105.3	1'-H	4.95	2'-H	3.52
C-2	108.4	2-H	6.64	-	-
C-3	111.9	3-H	7.12	-	-
C-6	113.8	6-H	6.67	8-H	7.45
C-8	114.0	8-H	7.45	6-H	6.67
C-10	116.1	-	-	3-H	7.12
				6-H	6.67
				8-H	7.45
C-9	130.0	-	-	2-H	6.64
C-7	137.3	-	-	7-CH <sub>3</sub>	2.40
C-4	148.8	-	-	2-H	6.64
				3-H	7.12
				1'-H	4.95
C-1	150.0	-	-	2-H	6.64
				3-H	7.12
				8-H	7.45
C-5	154.6	-	-	6-H	6.67

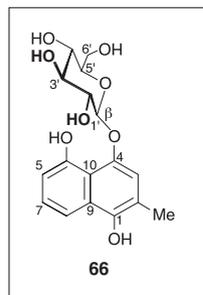
Plumbasid A (**66**)

Man erhielt **66** als amorphes Feststoff, dessen Kristallisation nicht gelang.

$[\alpha]_D^{20} = -31.8^\circ$  ( $c = 0.077$  in MeOH), Lit. keine Angabe.

IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3300 (br), 1620 (s), 1530 (s), 1510 (s), 810 (w), 760 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 2.34$  (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 3.40 – 3.60 (m, 4H, Glycosid-H), 3.73 (dd, 1H,  $J = 12.1, 6.2$ , 6'-Ha), 3.94 (dd, 1H,  $J = 12.1, 2.2$ , 6'-Hb), 4.98 (d, 1H,  $J = 7.8$ , 1'-H), 6.73 (dd, 1H,  $J = 7.6, 1.0$ , 6-H) 7.20 (s, 1H, 3-H) 7.25 (dd, 1H,  $J = 8.4, 7.7$ , 7-H) 7.65 (dd, 1H,  $J = 8.5, 1.1$ , 8-H).



$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 16.3$  (2- $\text{CH}_3$ ), 62.6 (C-6'), 71.5 (C-4'), 75.2 (C-2'), 78.3 (C-3'), 78.8 (C-5'), 105.3 (C-1'), 111.0 (C-6), 114.1 (C-8), 116.0 (C-3), 116.4 (C-10), 119.8 (C-2), 127.3 (C-7), 129.9 (C-9), 146.8 (C-1), 148.9 (C-4), 154.9 (C-5).MS (DCI,  $\text{NH}_3$ ) 370 (31.3) [ $\text{M}^+ + \text{NH}_4$ ], 353 (10.5) [ $\text{M}^+ + \text{H}$ ].

Die spektroskopischen Daten entsprechen den in der Literatur angegebenen.<sup>[207]</sup>

Tab. 26. ROESY-Wechselwirkungen von **66**

Proton	[ppm]	Proton	[ppm]
2- $\text{CH}_3$	2.34	3-H	7.25
1'-H	4.98	Gly-H	3.40-3.60
		3-H	7.25
6-H	6.73	7-H	7.25
		8-H	7.65
7-H	7.25	8-H	7.65

Tab. 27. HMQC- und HMBC-Korrelationen von **66**

$^{13}\text{C}$ -Zuordnung <sup>a</sup>	[ppm]	HMQC-Korrel.	[ppm]	HMBC-Korrel.	[ppm]
2- $\text{CH}_3$	16.3	2- $\text{CH}_3$	2.34	3-H	7.20
C-1'	105.3	1'-H	4.98	Gly-H	3.40-3.60
C-6	111.0	6-H	6.73	8-H	7.65
C-8	114.1	8-H	7.65	6-H	6.73
C-3	116.0	3-H	7.20	2- $\text{CH}_3$	2.34
C-10	116.4	-	-	3-H	7.20
				6-H	6.73
				8-H	7.65
C-2	119.8	-	-	2- $\text{CH}_3$	2.34
				3-H	7.20
C-7	127.3	7-H	7.25	6-H	6.73
				8-H	7.65
C-9	129.9	-	-	7-H	7.25
C-1	146.8	-	-	2- $\text{CH}_3$	2.34
				3-H	7.20
				8-H	7.65
C-4	148.9	-	-	1'-H	4.98
				3-H	7.20
C-5	154.9	-	-	6-H	6.73
				7-H	7.25

<sup>a</sup> Aufgrund von Signalüberlappung konnten die chemischen Verschiebungen der einzelnen Glycosid-Protonen nicht zugeordnet werden

## 8.9 Isolierung von Antidesmon (5) aus Zellkulturen von *Antidesma membranaceum*

Gefriergetrockneter Kallus wurde zermörsert und mit Methanol im Ultraschallbad extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 10000 rpm für 15 min wurde der Überstand abdekantiert und das Pellet erneut mit Methanol nachextrahiert. Dann wurde nochmals abzentrifugiert. Das Pellet verwarf man, und die Überstände wurden zur gemeinsamen Aufarbeitung vereinigt. Zunächst gab man das gleiche Volumen Reinstwasser zu und brachte die Lösung auf eine C<sub>18</sub>-Kartusche auf. Eluiert wurde mit einer aufsteigenden Methanolreihe (60%, 70%, 80%, 90%). Die gelb fluoreszierenden antidesmonhaltigen Fraktionen wurden abgenommen und mittels HPLC (Wasser/Acetonitril-Gradient: 6:4 – 1:9 in 10 min, 4 ml/min) präparativ gereinigt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels blieb Antidesmon (5) als gelbes Öl zurück (vgl. Ausbeuten Tab. 35). Die physikalischen Substanzdaten entsprachen denen aus der Literatur.<sup>[168, 292, 321]</sup> Medium aus Flüssigkulturen wurde mehrmals mit Dichlormethan ausgeschüttelt und nach dem Abziehen des Lösungsmittels ebenfalls der beschriebenen HPLC-Reinigung unterworfen.

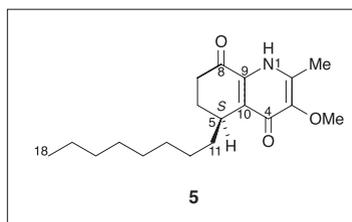
### Antidesmon (5)

$[\alpha]_D^{20} = -76.1^\circ$  ( $c = 0.12$  in  $\text{CHCl}_3$ ).

CD (EtOH):  $\Delta\epsilon_{212} -4.38$ ,  $\Delta\epsilon_{246} +5.63$ ,  $\Delta\epsilon_{279} +1.87$ ,  $\Delta\epsilon_{315} +2.36$ ,  $\Delta\epsilon_{354} -3.19$ .

IR (NaCl):  $\nu_{\text{max}}$  3180, 2900, 2815, 1775, 1595, 1535, 1385, 1260, 1190, 1025, 790, 715  $\text{cm}^{-1}$ .

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.88$  (d,  $J = 7.0$ , 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.2-1.4 (6H, 13-H, 14-H, 15-H, überlappend), 1.27 (2H, 16-H, überlappend), 1.29 (2H, 17-H, überlappend), 1.43 (1H, 11-H, überlappend), 1.45 (2H, 12-H, überlappend), 1.76 (m, 2H, 11-H), 2.12 (m, 1H, 6-H), 2.21 (m, 1H, 6-H), 2.41 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 2.54 (m, 1H, 7-H), 2.76 (m, 1H, 7-H), 3.28 (m, 1H, 5-H), 3.90 (s, 3H, 3-OCH<sub>3</sub>).



<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 14.1$  (C-18), 14.7 (2-CH<sub>3</sub>), 22.7 (C-17), 24.5 (C-6), 28.5 (C-12), 29.3 (C-15), 29.6 (C-13), 29.7 (C-14), 30.3 (C-5), 30.6 (C-11), 31.9 (C-16), 32.2 (C-7), 59.4 (3-OCH<sub>3</sub>), 131.9 (C-9), 137.9 (C-2), 139.1 (C-10), 147.6 (C-3), 173.4 (C-4), 194.9 (C-8).

EIMS (70 eV);  $m/z$  (%): 319.2  $[\text{M}]^+$  (4), 318.2  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (3), 291 (24), 234  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$  (24), 207.1  $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{16}]^+$  (100), 206.1  $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{17}]^+$  (35).

HREIMS (70eV); C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>3</sub>  $[\text{M}-\text{H}]^+$ : Ber. 318.2069 Gef. 318.2071

### 8.10 Schnelltest auf dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide

*Laborbedingungen:* Ca. 100 mg getrocknetes Blattmaterial wurden mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und genau eingewogen. Zu 100 mg Blattmaterial gab man 1 ml Eisessig und extrahierte eine Stunde im Ultraschallbad. Die Probe wurde abzentrifugiert. In einer Mikroküvette versetzte man 50 µl des Überstandes mit 800 µl Eisessig und nahm am Photometer (Cary 50 Conc, Varian GmbH, Darmstadt) ein Spektrum von 400 – 600 nm auf. Nach Zugabe von 15 µl einer Pb(OAc)<sub>4</sub>-Lösung in Eisessig (10 mg/ml) wurde erneut ein Spektrum gemessen und die Extinktionsdifferenz bei 525 nm ermittelt. Die Gehalte an Dimeren in der jeweiligen Lösung wurden durch einen Vergleich mit einer definierten Lösung von 1 mM Michellamin B ( $\Delta E_{525} = 0.87$ ) geschätzt (Tab. 28 und 29).

Tab. 28. Dimerenscreening von afrikanischen Ancistrocladaceen

Taxon	Ort bzw. Herbarnummer	Sammler	$\Delta E_{525}$	Geschätzte Dimerkonzentration im Extrakt [mM]
<i>Ancistrocladus abbreviatus</i>	kult. Gewächshausmaterial, orig. Elfenbeinküste	Aké Assi	0.06	0.07
<i>Ancistrocladus barteri</i>	HB 7, Elfenbeinküste	Aké Assi	0.01	0.01
<i>Ancistrocladus congolensis</i>	HB 30, Zaire	Nladu	0.40	0.46
<i>Ancistrocladus congolensis</i>	HB 53, Zaire	Mudogo	0.05	0.06
<i>Ancistrocladus congolensis</i>	HB 54, Zaire	Mudogo	0.13	0.15
<i>Ancistrocladus congolensis</i>	HB 55, Zaire	Mudogo	0.07	0.08
<i>Ancistrocladus congolensis</i>	HB 56, Zaire	Mudogo	0.11	0.13
<i>Ancistrocladus ealaensis</i>	HB 43, Gabon	Louis	0.09	0.10
<i>Ancistrocladus ealaensis</i>	HB 21, Zaire	Babady-Bila	0.16	0.18
<i>Ancistrocladus cf. guineensis</i>	HB 9, Nigeria	Alo	0.21	0.24
<i>Ancistrocladus korupensis</i>	HB 40, Kamerun	Ayafor	1.48	1.70
<i>Ancistrocladus cf. letestui</i>	HB 45, Zaire	Hangi & Mudogo	0.10	0.11
<i>Ancistrocladus cf. letestui</i>	HB 57, Zaire	Mudogo	0.22	0.25
<i>Ancistrocladus likoko</i>	HB 16, Zaire	Tentula	0.32	0.37
<i>Ancistrocladus cf. pachyrhachis</i>	HB 6, Sierra Leone	Dumbuya	0.00	0.00

<i>Ancistrocladus robertsoniorum</i>	HB 8, Kenia	Haller	0.02	0.02
<i>Ancistrocladus tanzaniensis</i>	HB 42, Tansania	Mbago	0.02	0.02

Tab. 29. Dimerenscreening von asiatischen Ancistrocladaceen

Taxon	Ort bzw. Herbarnummer	Sammler (Nr.)	$\Delta E_{525}$	Geschätzte Dimerkonzentration im Extrakt [mM]
<i>Ancistrocladus griffithii</i>	Khao Prang, Thailand	Meimberg (1184)	1.20	1.38
<i>Ancistrocladus griffithii</i>	Khao Prang, Thailand	Meimberg (2184)	1.09	1.25
<i>Ancistrocladus griffithii</i>	Khao Prang, Thailand	Meimberg (3184)	1.32	1.51
<i>Ancistrocladus griffithii</i>	Khao Sok, Thailand	Meimberg (KS2)	0.92	1.06
<i>Ancistrocladus griffithii</i>	Khao Lak, Thailand	Rischer	0.73	0.84
<i>Ancistrocladus hamatus</i>	HB 25, Sri Lanka	Aruna & Vajra	0.00	0.00
<i>Ancistrocladus heyneanus</i>	kult. Gewächshausmaterial, orig. Indien	Ketkar	0.11	0.13
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	Khong Chiam, Thailand	Meimberg (3214)	0.06	0.07
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	Khong Chiam, Thailand	Meimberg (4214)	0.09	0.10
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	kult. Botanical Garden Ubon Ratchathani, Thailand	Meimberg (1234)	0.03	0.04
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	kult. Botanical Garden Ubon Ratchathani, Thailand	Meimberg (1244)	0.06	0.07
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	kult. Botanical Garden Ubon Ratchathani, Thailand	Meimberg (3244)	0.08	0.09
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	kult. Botanical Garden Ubon Ratchathani, Thailand	Meimberg (4244)	0.11	0.12
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	Khao Yai, Thailand	Rischer (P1)	0.05	0.06
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	Khao Kitchakut, Thailand	Rischer (P4)	0.44	0.51
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	Nam Tok Pliu, Thailand	Rischer (P2)	0.11	0.13
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	Nam Tok Sapanhin, Thailand	Rischer (P3)	0.04	0.05
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	Khao Prang, Thailand	Meimberg (4184)	0.09	0.10
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	Khao Prang, Thailand	Meimberg (5184)	0.07	0.08
<i>Ancistrocladus aff. tectorius</i>	Khao Prang, Thailand	Meimberg (6184)	0.03	0.04

<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Sok, Thailand	Meimberg (KS1)	0.11	0.13
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Sok, Thailand	Meimberg (KS4)	0.07	0.08
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Sok, Thailand	Meimberg (KS5)	0.11	0.13
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Sok, Thailand	Meimberg (3114)	0.06	0.07
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Sok, Thailand	Meimberg (5116)	0.04	0.05
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Sok, Thailand	Meimberg (8114)	0.05	0.06
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Sok, Thailand	Meimberg (1124)	0.02	0.03
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Sok, Thailand	Meimberg (3124)	0.03	0.03
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Lak, Thailand	Rischer (tectoriu4)	0.06	0.07
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Lak, Thailand	Meimberg (KL1)	0.21	0.24
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Chong, Thailand	Meimberg (KC1)	0.08	0.09
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Chong, Thailand	Meimberg (KC2)	0.07	0.08
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Chong, Thailand	Meimberg (KC3)	0.05	0.06
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Chong, Thailand	Meimberg (KC4)	0.06	0.07
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Khao Chong, Thailand	Meimberg (KC6)	0.08	0.09
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	kult. Botanical Garden Trang, Thailand	Meimberg	0.13	0.15
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Dungun, Malaysia	Hadi (P7)	0.00	0.00
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Taman Negara, Malaysia	Rischer (P5)	0.10	0.11
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	G. Benom, Malaysia	Rischer (tectoriu2)	0.04	0.05
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	Johor Bahru, Malaysia	Rischer (tectoriu3)	0.06	0.07
<i>Ancistrocladus</i> <i>aff. tectorius</i>	HB 5, Indonesien	Meijer	0.00	0.00

*Feldbedingungen:* Auch auf Exkursionen, ohne ein Photometer, konnte auf ein eventuelles Vorhandensein von Dimeren geschlossen werden. Eine einfache Probe führte man durch, indem die Blattbasen frisch abgebrochener *Ancistrocladus*-Blätter mit einer  $Pb(OAc)_4$ -Lösung in Eisessig (10 mg/ml) beträufelt wurden. Nur eine stark dunkelblau-violette Färbung zumindest der Leitbündel, meist aber der ganzen Fläche, deutet auf Dimere hin. Orange und rötliche Färbungen gehen vermutlich auf Reaktionen von Naphthochinonen zurück und haben keine Bedeutung in diesem Test.

## 9 Fütterungsversuche mit stabilisotopenmarkierten Vorstufen

Die stabilisotopenmarkierten Vorstufen [ $^{15}\text{N}$ ]-Ammonium- $^{15}\text{N}$ -Nitrat, Kalium- $^{15}\text{N}$ -Nitrat,  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -Natriumacetat,  $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ -Natriumacetat, (D)- $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glucose,  $[\text{1-}^{13}\text{C}_1]$ -Glycin,  $[\text{U-}^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}]$ -Glycin, (L)- $[\text{U-}^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}]$ -Alanin, (L)- $[\text{U-}^{13}\text{C}_4]$ -Asparaginsäure und (L)- $[\text{Methyl-}^{13}\text{C}_1]$ -Methionin mit mindestens 99% Isotopenanreicherung wurden von Promochem (Wesel) bezogen.

### 9.1 Verfütterung an *Triphyophyllum peltatum*

*Kulturen in Flüssigmedium:* Für die Markierungsexperimente von Droseron (**43**) wurden wäßrige Lösungen von 4 mg/ml  $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ -Natriumacetat und 1 mg/ml unmarkiertem Natriumacetat angesetzt und anschließend sterilfiltriert. Nach dem Umsetzen der Kalli in 50 ml frisches Medium wurden 0.25 ml der markierten Natriumacetatlösung und 2 ml der unmarkierten Natriumacetatlösung zugegeben und für 8 d inkubiert. Tabelle 30 zeigt die NMR-Daten für 0.7 mg isoliertes Droseron (**43**).<sup>[191]</sup>

Tab. 30.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Droseron (**43**) nach der Verfütterung von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ -Natriumacetat

C-Atom	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	2-CH <sub>3</sub>
$^1J_{\text{C-C}}$ [Hz]	51.3 <sup>d</sup>	44.4 <sup>b</sup>	nd <sup>c</sup>	56.5 <sup>a</sup>	66.1	66.6	54.8	54.8	52.7	57.4	44.4
$I_s$ [%]	167 <sup>d</sup>	97 <sup>b</sup>	nd <sup>c</sup>	122 <sup>d</sup>	131	145	138	134	129	114	218

<sup>a</sup>Überlappung mit C-4; <sup>b</sup>line broadening' = 4 Hz; <sup>c</sup>nd = nicht detektiert; <sup>d</sup>Überlappung mit C-1

*Kulturen auf Festmedium:* Von einer sterilfiltrierten  $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ -Natriumacetatlösung mit einer Konzentration von 4 mg/ml wurden pro Verfütterungsintervall 0.5 ml pro Kolben direkt auf die Kalli pipettiert. Über einen Zeitraum von zwei Monaten wurden so 250 mg markiertes Natriumacetat an 832 mg (TG) Kallus verfüttert. Wie oben beschrieben wurde auch bei der Applikation von  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -Natriumacetat an 6.08 g (TG) Kallus vorgegangen, die zur Isolierung von 1.7 mg unmarkiertem Dioncophyllin A (**4**) (Tab. 32)<sup>[168, 223]</sup> und 2.2 mg markiertem Droseron (**43**) führten (Tab. 31).<sup>[168]</sup>

Tab. 31.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Droseron (**43**) nach der Verfütterung von  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -Natriumacetat

C-Atom	1	2	3	4	5 <sup>a</sup>	6	7	8	9	10	2-CH <sub>3</sub>
rel. I <sub>P</sub>	2.3	0.7	2.8	0.8	1.0	6.2	1.1	5.8	0.7	2.2	5.1
rel. I <sub>R</sub>	0.4	0.7	0.7	0.6	1.0	1.4	1.0	1.3	0.7	0.6	1.3
I <sub>P</sub> / I <sub>R</sub>	5.8	1.0	4.0	1.3	1.0	4.4	1.1	4.5	1.0	3.7	3.9

<sup>3</sup>C-5 normiert auf relative Intensität 1.0

 Tab. 32.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Dioncophyllin A (**4**) nach der Verfütterung von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ -Natriumacetat

C-Atom	1-CH <sub>3</sub>	2'-CH <sub>3</sub>	3-CH <sub>3</sub>	4	3	1	5'-OCH <sub>3</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>
<sup>1</sup> J <sub>C-C</sub> [Hz]	-	44.7	38.2	41.7	37.5	44.0	-	-
I <sub>s</sub> [%]	-	n.b. <sup>a</sup>	59	38	52	48	-	-
C-Atom	6'	3'	10'	8'	5	7	1'	9
<sup>1</sup> J <sub>C-C</sub> [Hz]	70.8	-	66.8	60.0	57.4	67.1	56.4	n.b. <sup>b</sup>
I <sub>s</sub> [%]	45	-	n.b. <sup>b</sup>	47	33	n.b. <sup>b</sup>	n.b. <sup>b</sup>	n.b. <sup>b</sup>
C-Atom	7'	6	10	2'	9'	8	4'	5'
<sup>1</sup> J <sub>C-C</sub> [Hz]	59.3	57.0	43.1	44.7	56.4	65.5	67.5	71.4
I <sub>s</sub> [%]	47	39	n.b. <sup>b</sup>	n.b. <sup>c</sup>	n.b. <sup>c</sup>	40	48	37

<sup>a</sup>Nicht bestimmbar wegen Signalüberlappung; <sup>b</sup>Nicht bestimmbar wegen zu niedriger Signalintensität; <sup>c</sup>Nicht bestimmbar wegen Signalüberlappung

## 9.2 Verfütterung an *Nepenthes insignis*

(L)-[U- $^{13}\text{C}_3$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-Alanin und [U- $^{13}\text{C}_2$ ]-Natriumacetat wurden als wäßrige Lösungen mit einer Konzentration von 4 mg/ml angesetzt. Im Falle von [U- $^{13}\text{C}_2$ ]-Natriumacetat stellte man die Lösung mit HCl auf pH 5.8 ein. Nach Sterilfiltration ersetzte man in wöchentlichem Abstand die absorbierte Flüssigkeit in den Kannen der *Nepenthes*. Dies geschah, indem man die jeweilige Lösung in einer sterilen Einwegspritze aufzog und über eine Kanüle in die Kannen füllte. Die Deckel der Kannen hatte man zuvor entfernt, um den Zugang zu erleichtern. Kontrollpflanzen wurden nicht gefüttert.

Tab. 33. Ausbeuten der Verfütterungsexperimente im Vergleich zum Kontrollversuch

Experiment	FG [g]	TG [g]	Roh-	Fraktion	<b>65</b>	<b>66</b>	Fraktion	<b>13</b>	<b>13/66</b>
			extrakt	2			4		
			[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]
			[%TG]	[%TG]	[%TG]	[%TG]	[%TG]	[%TG]	
Kontrolle	7.04	0.71	313	87.5	6.1	7.7	5.5	1.7	
			44.7	12.3	0.9	1.1	0.8	0.2	0.2
[U- $^{13}\text{C}_2$ ]- Natriumacetat	6.30	1.01	336	92.5	5.1	5.3	19.9	4.7	
			33.3	9.1	0.5	0.5	2.0	0.3	0.5
(L)-[U- $^{13}\text{C}_3$ , $^{15}\text{N}$ ]- Alanin	1.66	1.51	529	65.7	1.7	2.8	11.3	5.2	
			35.2	4.4	0.1	0.2	0.8	0.3	1.9

Tab. 34.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von markiertem Plumbagin (**13**), das nach der Verfütterung von (L)-[U- $^{13}\text{C}_3$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-Alanin an die Kannen von *N. insignis* isoliert wurde

C-Atom	2-CH <sub>3</sub>	2	1	9	8	7	6	5	10	4	3
$^1J_{C-C}$ [Hz]	43.7	43.7	55.2	55.2	55.2	55.2	66.7	65.9	54.4	53.7	-
$I_s^a$ [%]	38.9	40.4	49.7	60.5	47.7	47.2	50.4	42.2	46.4	47.0	30.0

<sup>a</sup> Intensitätsverhältnis der Satellitenpeaks im Vergleich zum Zentralpeak

### 9.3 Verfütterung an *Antidesma membranaceum*

Von den stabilisotopenmarkierten Vorstufen wurden wäßrige Lösungen angesetzt. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 4 mg/ml Natriumacetat (einfach und zweifach markiert), 8.6 mg/ml Glucose, 3.5 mg/ml Glycin (einfach und zweifach markiert), 5 mg/ml Alanin, 5 mg/ml Asparaginsäure und 4 mg/ml Methionin (Tab. 35). Die Acetatlösung wurde mit HCl auf pH 5.8 eingestellt. Nach dem vollständigen Lösen wurde sterilfiltriert und je 0.5 ml der Lösung wurde im zweitägigen Abstand pro Petrischale an die im Dunkeln kultivierten Kalli verfüttert. Für die Verfütterung von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Ammonium- und Kaliumnitrat wurden die entsprechenden Salze im Flüssigmedium (vgl. Kap. 2.2.4) durch die markierten ersetzt.

Tab. 35. Eingesetzte Vorstufenmengen und Antidesmon-Ausbeuten der Fütterungsversuche

Vorstufe	Versuchs-dauer	Verfütterte Menge	Kallus FG	Kallus TG	Ausbeute an <b>5</b>
[U- $^{13}\text{C}_2$ ]-Natriumacetat	13 d	64 mg	129.68 g	9.68 g	1.62 mg
(D)-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-Glc	38 d	1.16 g	134.23 g	35.80 g	1.31 mg
[ $^{15}\text{N}$ ]- $\text{KNO}_3$ + [U- $^{15}\text{N}_2$ ]- $\text{NH}_4\text{NO}_3^{\text{a}}$	63 d, alle 9 d gewechselt	2.19 g + 1.90 g	1.05 l Medium (54.44 g)	- (2.83 g)	2.06 mg
(L)-[U- $^{13}\text{C}_3$ , $^{15}\text{N}$ ]-Ala	21 d	200 mg	112.67 g	6.03 g	1.89 mg
(L)-[U- $^{13}\text{C}_4$ ]-Asp	25 d	100 mg	83.35 g	5.36 g	1.75 mg
[U- $^{13}\text{C}_2$ , 2- $^{15}\text{N}$ ]-Gly	23 d	70 mg	75.00 g	4.05 g	1.11 mg
[1- $^{13}\text{C}_1$ ]-Gly	35 d	137 mg	89.23 g	5.60 g	1.01 mg
(L)-[ $^{13}\text{C}_1$ ]-Met	14 d	70 mg	-	-	0.30 mg

<sup>a</sup> Das Medium enthielt dafür kein  $\text{K}^{14}\text{NO}_3$  und  $^{14}\text{NH}_4^{14}\text{NO}_3$

Tabelle 36 stellt die von Wohlfarth<sup>[168]</sup> ermittelten NMR-Daten für alle Fütterungsversuche zusammen.

Tab. 36. NMR-Daten von **5** nach der Verfütterung verschiedener markierter Vorstufen

C-Atom	$^1J$ ( $^{13}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$ ) [Hz] <sup>a</sup>	$I_s$ [%] <sup>b</sup>						$I_P/I_R$
		[U- $^{13}\text{C}_2$ ]- Acetat	(D)- [U- $^{13}\text{C}_6$ ]- Glc	(L)- [U- $^{13}\text{C}_3$ , $^{15}\text{N}$ ]- Ala	(L)- [U- $^{13}\text{C}_4$ ]- Asp	[U- $^{13}\text{C}_2$ , $^{15}\text{N}$ ]- Gly	(L)- [ $^{13}\text{C}_1$ ]- Met	
2	46.4 <sup>g</sup>	-	n.d. <sup>d</sup>	-	n.d. <sup>d</sup>	n.d. <sup>f</sup>	-	1.1
3	64.9	177	n.d. <sup>d</sup>	97	n.d. <sup>d</sup>	n.d. <sup>d</sup>	-	0.8
4	65.8	111	n.d. <sup>d</sup>	98	n.d. <sup>d</sup>	n.d. <sup>d</sup>	-	1.0
5	33.6	141	50	91	29	60	-	1.0
6	33.4	163	58	91	23	72	-	1.1
7	42.9	132	56	91	21	68	-	1.1
8	42.7	131	58	91	n.d. <sup>d</sup>	n.d. <sup>d</sup>	-	1.0
9	64.2 <sup>c</sup>	n.d. <sup>d</sup>	n.d. <sup>d</sup>	98	n.d. <sup>d</sup>	n.d. <sup>d</sup>	-	0.9
10	64.8 <sup>c</sup>	n.d. <sup>d</sup>	n.d. <sup>d</sup>	106	n.d. <sup>d</sup>	n.d. <sup>d</sup>	-	1.2
11	34.3	162	50	102	32	65	-	1.1
12	34.6	151	38	107	30	60	-	1.0
13 <sup>c</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	-	n.d. <sup>f</sup>
14 <sup>c</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	n.d. <sup>f</sup>	-	n.d. <sup>f</sup>
15	34.6	126	40	100	16	55	-	1.1
16	34.6	129	41	91	25	66	-	1.0
17	34.6	162	58	101	19	63	-	1.0
18	34.6	198	52	111	23	78	-	1.0
2-CH <sub>3</sub>	46.5 <sup>g</sup>	-	20	-	90	454	-	1.1 <sup>h</sup>
3-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	18 <sup>i</sup>	15.2 <sup>j</sup>	-

<sup>a</sup> Werte vom [ $^{13}\text{C}_2$ ]-Acetat-Fütterungsexperiment; <sup>b</sup> Intensität der  $^{13}\text{C}$ -Satelliten in Bezug auf die Intensität des Zentralpeaks im  $^{13}\text{C}$ -NMR; <sup>c</sup> Überlappende Signale; <sup>d</sup> Nicht bestimmt wegen schwacher Signalintensität; <sup>e</sup> Werte aus dem Alanin-Fütterungsexperiment; <sup>f</sup> Nicht bestimmt wegen überlappender Signale; <sup>g</sup> Wert aus dem Glycin-Fütterungsexperiment;

<sup>h</sup> C-18 normiert auf auf relative Intensität 1.0; <sup>i</sup> 3-OCH<sub>3</sub> zeigte einen Markierungsgrad von 18%  $^{13}\text{C}$  im  $^1\text{H}$ -NMR; <sup>j</sup> 3-OCH<sub>3</sub> zeigte einen Markierungsgrad von 15.2%  $^{13}\text{C}$  im  $^1\text{H}$ -NMR

## 10 Statistische Methoden

Alle statistisch ausgewerteten Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Zur Auswertung wurden die Programme Excel 2000 und SPSS 10.0 benutzt. Bei nicht normal verteilten Mittelwerten wurden zwei Proben mittels des U-Tests nach Mann und Whitney verglichen.<sup>[377]</sup> Multiple Vergleiche wurden mittels einfaktorier Varianzanalyse (ANOVA) *a posteriori* (Duncan's Test bei 5% Irrtumswahrscheinlichkeit) durchgeführt.<sup>[378]</sup> Prozentwerte wurden vor der Varianzanalyse einer arcsin-Transformation unterworfen.

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ACP	Acylcarrier-Protein
ATP/ADP <sub>i</sub>	Adenosintri-/di-phosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
CC	Column Chromatography
CD	Circular Dichroism
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DCI	Chemische Ionisation bei Direkteinführung der Probe
EIMS	Electron Impact Mass Spectroscopy
FG	Frischgewicht
GTP/GDP	Guanosintri-/di-phosphat
HB	Herbarium Bringmann
HMBC	Hetero Multinuclear Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
IBA	Indol-3-buttersäure
INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer
MS	Murashige and Skoog Medium
NAA	1-Naphthyllessigsäure
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (ox.)/(red.)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PEP	Phosphoenolpyruvat
2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
PLP	Pyridoxalphosphat
ROESY	Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
SAH	S-Adenosyl-homocystein
SAM	S-Adenosyl-methionin
TDZ	Thidiazuron
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
THF	Tetrahydrofolat
WPM	Woody Plant Medium



## LITERATUR

- [1] N.R. Farnsworth, Screening Plants for new Medicines in *Biodiversity* (Hrsg.: E.O. Wilson), National Academy Press, Washington, DC, **1988**, 83-97.
- [2] M.J. Balick, P.A. Cox, *Drogen, Kräuter und Kulturen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1997**.
- [3] G.M. Cragg, D.J. Newman, K.M. Snader, Natural Products in Drug Discovery and Development, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52-60.
- [4] D. Heß, *Pflanzenphysiologie*, 9. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **1991**.
- [5] R.M. May, How many Species are there on Earth? *Science* **1988**, *241*, 1441-1449.
- [6] E.O. Wilson, *Ende der biologischen Vielfalt?*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1992**.
- [7] K.S. Jayaraman, India set to end 'Gene Robbery', *Nature* **1994**, *370*, 587.
- [8] G.M. Cragg, S.A. Scheppartz, M. Suffness, M.R. Grever, The Taxol Supply Crisis, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1657-1668.
- [9] J.W. Sheldon, M.J. Balick, S. Larid, *Medicinal Plants: Can Utilization and Conservation coexist?*, The New York Botanical Garden, New York, **1997**.
- [10] M.H. Malone, The pharmacological Evaluation of Natural Products – General and specific Approaches to Screening Ethnopharmaceuticals, *Journal of Ethnopharmacology* **1983**, *8*, 127-147.
- [11] R. Ubillas, S.D. Jolad, R.C. Bruening, M.R. Kernan, S.R. King, D.F. Sesin, M. Barrett, C.A. Stoddart, T. Flaster, SP-303, an antiviral oligomeric Proanthocyanidin from the Latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago), *Phytomedicine* **1994**, *1*, 77-106.
- [12] L. Wagner, Medizin, die aus der Wildnis kommt, *Stern* **1998**, *13*, 58-66.
- [13] G. Bringmann, The Naphthylisoquinoline Alkaloids in *The Alkaloids* (Hrsg.: A. Brossi), Bd. 29, Academic Press, New York, **1986**, 141-184.
- [14] D.W. Thomas, R.E. Gereau, *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae): A new Species of Liana from Cameroon, *Novon* **1993**, *3*, 494-498.
- [15] K.P. Manfredi, J.W. Blunt, J.H. Cardellina, J.B. McMahon, L.L. Pannell, G.M. Cragg, M.R. Boyd, Novel Alkaloids from the Tropical Plant *Ancistrocladus abbreviatus* inhibit Cell Killing by HIV-1 and HIV-2, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3402-3405.
- [16] M.R. Boyd, Y.F. Hallock, J.H. Cardellina, K.P. Manfredi, J.W. Blunt, J.B. McMahon, R.W. Buckheit, G. Bringmann, M. Schäffer, G.M. Cragg, D.W. Thomas, J.G. Jato, Anti-HIV Michellamines from *Ancistrocladus korupensis*, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1740-1745.
- [17] E.L. White, L.J. Ross, P.D. Hobbs, V. Upender, M.I. Dawson, Antioxidant Activity of Michellamine Alkaloids, *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 1033-1036.
- [18] E.L. White, W. Chao, L.J. Ross, D.W. Borhani, P.D. Hobbs, V. Upender, M.I. Dawson, Michellamine Alkaloids inhibit Protein Kinase C, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 25-30.
- [19] G. Mattheé, A.D. Wright, G.M. König, HIV Reverse Transcriptase Inhibitors of Natural Origin, *Planta Med.* **1999**, *65*, 493-506.
- [20] K. Hostettmann, O. Potterat, J.-L. Wolfender, The Potential of Higher Plants as a Source of new Drugs, *Chimia* **1998**, *52*, 10-17.
- [21] D.W. Thomas, M.R. Boyd, R.E. Gereau, J. Jato, P. Symonds, Sustainable Harvest of *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae) Leaf Litter for Research on HIV, *Econ. Bot.* **1994**, *48*, 413-414.

- [22] J.S. Miller, Ensuring Community based Benefits in multinational Bioprospecting, *Am. J. Bot.* **1997**, *84 (Suppl.)*, 112-113.
- [23] A.L. Thomas, L.A. Carpenter-Boggs, Mycorrhizal Colonization of *Ancistrocladus korupensis*, a new tropical Forest Species with Anti-HIV Activity, *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* **1995**, *3*, 51-54.
- [24] P.F. Foster, V.L. Sork, Population and genetic Structure of the West African Rain Forest Liana *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae), *Am. J. Bot.* **1997**, *84*, 1078-1091.
- [25] G. Bringmann, G. François, L. Aké Assi, J. Schlauer, The Alkaloids of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae), *Chimia* **1998**, *52*, 18-28.
- [26] G. Bringmann, F. Pokorny, The Naphthylisoquinoline Alkaloids in *The Alkaloids* (Hrsg. G.A. Cordell), Bd. 46, Academic Press, New York, **1995**, 127-271.
- [27] T.M. Kutchan, H. Dittrich, D. Bracher, M.H. Zenk, Enzymology and Molecular Biology of Alkaloid Synthesis, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5945-5954.
- [28] G. Bringmann, S. Schlauer, H. Rischer, M. Wohlfarth, R. Haller, S. Bär, R. Brun, Antidesmone, a novel antitrypanosomal Alkaloid, *Pharm. Pharmacol. Lett.* **2002**, im Druck.
- [29] T.R. Govindachari, P.C. Parthasarathy, Ancistrocladine, a novel Isoquinoline Alkaloid from *Ancistrocladus heyneanus* Wall., *Indian J. Chem.* **1970**, *8*, 567-569.
- [30] J. Bruneton, A. Bouquet, A. Fournet, A. Cavé, La Triphyophylline, nouvel Alcaloïde isolé du *Triphyophyllum peltatum*, *Phytochemistry* **1976**, *15*, 817-818.
- [31] G. Bringmann, M. Rübenacker, J. Jansen, D. Scheutzow, L. Aké Assi, On the Structure of the Dioncophyllaceae Alkaloids Dioncophylline A ('Triphyophylline') and 'O-Methyl-Triphyophylline', *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 639 - 642.
- [32] T.R. Govindachari, P.C. Parthasarathy, J.D. Modi, Structure and Synthesis of Ancistroquinone, *Indian J. Chem.* **1971**, *9*, 1042-1044.
- [33] H.K. Desai, D.H. Gawad, T.R. Govindachari, B.S. Joshi, P.C. Parthasarathy, K.S. Ramachandran, K.R. Ravindranath, A.R. Sidhaye, N. Viswanathan, Chemical Investigation of some Indian Plants, *Indian J. Chem.* **1976**, *14*, 473.
- [34] G. Bringmann, C. Schneider, L. Aké Assi, Direct and modified bicyclic Moieties of Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus barberi*: First biosynthetic Indicators? *Planta Med.* **1991**, *57 (Suppl. 2)*, 10.
- [35] G. Bringmann, F. Pokorny, M. Stäblein, T.R. Govindachari, M.R. Almeida, S.M. Ketkar, On the Biosynthesis of acetogenic Tetrahydroisoquinoline Alkaloids: First *in vivo* feeding Experiments, *Planta Med.* **1991**, *57 (Suppl. 2)*, 98.
- [36] G. Bringmann, C. Kehr, U. Daur, K.-P. Gulden, R.D. Haller, S. Bär, M.A. Isahakia, S.A. Robertson, K. Peters, *Ancistrocladus robertsoniorum* 'produces' pure crystalline Droserone when wounded, *Planta Med.* **1993**, *59 (Suppl.)*, 622-623.
- [37] A.H. Nguyen, H. Ripperger, A. Porzel, T.V. Sung, G. Adam, Tetralones from *Ancistrocladus cochinchinensis*, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 549-551.
- [38] Y.F. Hallock, K.P. Manfredi, J.W. Blunt, J.H. Cardellina, M. Schäffer, K.-P. Gulden, G. Bringmann, A.Y. Lee, J. Clardy, G. François, M.R. Boyd, Korupensamines A-D, novel antimalarial Alkaloids from *Ancistrocladus korupensis*, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6349-6355.
- [39] Y.F. Hallock, J.H. Cardellina, T. Kornek, K.-P. Gulden, G. Bringmann, M.R. Boyd, Gentrymine B, the first quaternary Isoquinoline Alkaloid from *Ancistrocladus korupensis*, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4753-4756.

- [40] A. Montagnac, A.H. Hadi, F. Remy, M. Païs, Isoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*, *Phytochemistry* **1995**, 39, 701-704.
- [41] M. Lavault, J. Bruneton, Alcaloides du *Dioncophyllum thollonii*, *Planta Med.* **1980**, (Suppl.), 17-21.
- [42] M. Rückert, Entwicklung von Verfahren zur Charakterisierung komplexer Stoffgemische mittels HPLC-NMR und HPLC-ESI-MS/MS am Beispiel tropischer Lianen, *Dissertation, Universität Würzburg*, **1998**.
- [43] J.B. Harborne, H. Baxter, *Phytochemical Dictionary – a Handbook of bioactive Compounds from Plants*, Taylor & Francis, London, **1993**.
- [44] R.B. Herbert, The Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids in *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids* (Hrsg.: J.D. Phillipson, M.F. Roberts, M.H. Zenk), Springer Verlag, Berlin, **1985**, 213-228.
- [45] A. Pictet, T. Spengler, Über die Bildung von Isochinolin-Derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-Äthylamin, Phenyl-Alanin und Tyrosin, *Chem. Ber.* **1911**, 44, 2030-2036.
- [46] A.R. Battersby, R. Binks, R. Huxtable, Biosynthesis of *Cactus* Alkaloids, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 6, 563-565.
- [47] A.R. Battersby, R. Binks, R. Huxtable, Biosynthesis of Pellotin, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 58, 6111-6115.
- [48] B.Z. Ahn, F. Zymalkowski, Siamin, ein neues Isochinolon-Derivat aus *Cassia siamea*, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 11, 821-824.
- [49] S.M. El-Sayyad, S.A. Ross, H.M. Sayed, New Isoquinolone Alkaloids from the Leaves of *Cassia siamea*, *J. Nat. Prod.* **1984**, 47, 708-710.
- [50] T.R. Govindachari, P.C. Parthasarathy, Alkaloids of *Ancistrocladaceae*, *Heterocycles* **1977**, 7, 661-684.
- [51] G. Bringmann, Isochinoline und Naphthaline aus  $\beta$ -Polyketonen: Modellreaktionen zu einer außergewöhnlichen Alkaloid-Biosynthese, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 205-206.
- [52] G. Bringmann, Aufbau und Cyclisierung zentral modifizierter  $\beta$ -Pentaketone: Synthese monocyclischer Isochinolinalkaloid-Vorstufen, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 2105-2115.
- [53] G. Bringmann, J.R. Jansen, Einfache Synthesen nützlicher Diketo-Bausteine für biomimetische Isochinolin- und Naphthalin-Synthesen, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 2116-2125.
- [54] G. Bringmann, Biomimetische Synthesen beider Molekülhälften der *Ancistrocladus*- und der *Triphyophyllum*-Alkaloide aus gemeinsamen Vorstufen, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 2126-2134.
- [55] G.A. Cordell, *Introduction to Alkaloids – a biogenetic Approach*, John Wiley & Sons, New York, **1981**.
- [56] A.J. Birch, Some Pathways in Biosynthesis, *Proc. Chem. Soc.* **1962**, 3, 3-13.
- [57] N. Collie, W.S. Myers, The Formation of Orcinol and other Condensation Products from Dehydracetic Acid, *J. Chem. Soc.* **1893**, *Transactions* 63, 122-128.
- [58] J.N. Collie, Derivatives of the multiple Ketene Group, *Proc. Chem. Soc.* **1907**, 23, 230-231.
- [59] M. Luckner, *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals*, Springer Verlag, Berlin, **1984**.
- [60] F. Pokorny, *In-vivo*-Studien zur Biosynthese von Naphthylisochinolin-Alkaloiden und Isolierung und Strukturaufklärung von *Ancistrobrevin C*, einem neuartigen Alkaloid aus

- Ancistrocladus abbreviatus*, *Dissertation, Universität Würzburg*, **1992**.
- [61] K. Wurm, Versuche zur Isolierung von Ancistrin aus *Ancistrocladus tectorius* und Untersuchungen zur Aufklärung der Biosynthese von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus *Ancistrocladus heyneanus*, *Diplomarbeit, Universität Würzburg*, **1993**.
- [62] G. Bringmann, F. Pokorny, M. Wenzel, K. Wurm, C. Schneider, Labelled Precursors for biosynthetic Studies on Naphthylisoquinoline Alkaloids, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1997**, *39*, 29-38.
- [63] G. Bringmann, C. Schneider, F. Pokorny, H.J. Lorenz, H. Fleischmann, A.S. Sankaranayanan, M.R. Almeida, T.R. Govindachari, L. Aké Assi, The Cultivation of tropical Lianas of the Genus *Ancistrocladus*, *Planta Med.* **1993**, *59* (Suppl.), 623-624.
- [64] G. Bringmann, M. Wenzel, H. Bringmann, J. Schlauer, L. Aké-Assi, Die 'Teilzeit-fleischfressende' Pflanze *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae): Nutzung der Fangorgane zur Erforschung der Alkaloidbildung, *Der Palmengarten* **1996**, *60*, 32-37.
- [65] B.E. Juniper, R.J. Robins, D.M. Joel, *The Carnivorous Plants*, Academic Press Ltd., London, **1989**.
- [66] M. Wenzel, *In-vivo*-Untersuchungen zur Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide und Darstellung eines vereinfachten Michellamin-Analogons, *Dissertation, Universität Würzburg*, **1999**.
- [67] G. Bringmann, M. Wenzel, H. Bringmann, L. Aké Assi, F. Haas, J. Schlauer, Uptake of the Amino Acid Alanine by digestive Leaves: Proof of Carnivory of the Tropical Liana *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae), *Carnivorous Plant Newsletter* **2001**, *30*, 15-21.
- [68] M. Wohlfarth, Synthese von Stabilisotopen-markierten Naphthylisochinolin-Alkaloid-Vorstufen und Biogeneseexperimente an Zellkulturen von *Ancistrocladus heyneanus*, *Diplomarbeit, Universität Würzburg*, **1997**.
- [69] D.A. Hopwood, Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2465-2497.
- [70] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Rückert, J. Schlauer, The Polyketide Folding Mode in the Biogenesis of Isoshinanolone and Plumbagin in *Ancistrocladus heyneanus* (Ancistrocladaceae), *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8445-8448.
- [71] R. Durand, M.H. Zenk, Biosynthesis of Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) via the Acetate Pathway in Higher Plants, *Tetrahedron Lett.* **1971**, *32*, 3009-3012.
- [72] R. Durand, M.H. Zenk, The Homogentisate Ring-cleavage Pathway in the Biosynthesis of Acetate-derived Naphthoquinones of the Droseraceae, *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1483-1492.
- [73] J. de Loureiro, Genus XXVII. *Bembix* in: *Flora Cochinchinensis*, Bd. 1, Ulyssipone, Typis et expensis Acad. **1790**, 282-283.
- [74] H.K. Airy Shaw, On the Dioncophyllaceae, a remarkable new Family of Flowering Plants, *Kew Bull.* **1951**, *341*, 327-347.
- [75] C.E. Parkinson, Fam. 13. Ancistrocladaceae in: *A Forest Flora of the Andaman Islands – an Account of the Trees, Shrubs and Principal Climbers of the Islands*, Government Central Press, **1938**.
- [76] M.I. Maurice, *Handbook of African Medicinal Plants*, CRC Press, Boca Raton, **1993**.
- [77] W.G. Boorsma, Onderzoek naar de Plantenstoffen van Nederlandsch-Indië III., *Mededeelingen uit 's Lands Plantentuin*, **1899**, 31.

- [78] G.W.H. Davison, *Endau-Rompin: a Malaysian Heritage*, Malayan Nature Society, Kuala Lumpur, **1988**, 80.
- [79] H. Ruanrunsi, V. Wongpanich, P. Tantivatana, H.J. Cowe, P.J. Cox, S. Funayama, G.A. Cordell, Traditional Medicinal Plants of Thailand, V. Ancistrotoectorine, a new Naphthaleneisoquinoline Alkaloid from *Ancistrocladus tectorius*, *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 529-535.
- [80] A. Bouquet, R. Paris, Note sur le *Dioncophyllum thollonii* Baill., *Plant. Méd. Phytothér.* **1967**, *1*, 214-220.
- [81] S.W. Hanson, M. Crawford, D.P.J. Tanasingh, (+)-Isoshinanolone and 2-Methylbenzofuran-4-carbaldehyde from the Fish-stunning Plant *Habropetalum dawei*, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1162-1164.
- [82] S.C. Sharma, Y.N. Shukla, J.S. Tandon, Alkaloids and Terpenoids of *Ancistrocladus heyneanus*, *Sagittaria sagittifolia*, *Lyonia formosa* and *Hedychium spicatum*, *Phytochemistry* **1975**, *14*, 578-579.
- [83] J.B. McMahon, M.J. Currens, R.J. Gulakowski, R.W. Buckheit, C. Lackman-Smith, Y.F. Hallock, M.R. Boyd, Michellamine B, a novel Plant Alkaloid, inhibits Human Immunodeficiency Virus-induced Cell killing by at least two distinct Mechanisms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, *39*, 484-488.
- [84] Y.F. Hallock, K.P. Manfredi, J.-R. Dai, J.H. Cardellina, R.J. Gulakowski, J.B. McMahon, M. Schäffer, M. Stahl, K.-P. Gulden, G. Bringmann, G. François, M.R. Boyd, Michellamines D-F, new HIV-inhibitory dimeric Naphthylisoquinoline Alkaloids, and Korupensamine E, a new antimalarial Monomer, from *Ancistrocladus korupensis*, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 677-683.
- [85] G. François, G. Bringmann, J.D. Phillipson, L. Aké Assi, C. Dochez, M. Rübenacker, C. Schneider, M. Wéry, D.C. Warhurst, G.C. Kirby, Activity of Extracts and Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Triphyophyllum peltatum*, *Ancistrocladus abbreviatus* and *A. barberi* against *Plasmodium falciparum* in vitro, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1461-1464.
- [86] G. François, G. Timperman, J. Holenz, L. Aké Assi, T. Geuder, L. Maes, J. Dubois, M. Hanocq, G. Bringmann, Naphthylisoquinoline Alkaloids exhibit strong growth-inhibiting Activities against *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* in vitro, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1996**, *90*, 115-123.
- [87] G. François, G. Timperman, W. Eling, L. Aké Assi, J. Holenz, G. Bringmann, Naphthylisoquinoline Alkaloids against Malaria: Evaluation of the curative Potential of Dioncophylline C and Dioncopeltine A against *P. berghei* in vivo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2533-2539.
- [88] G. Bringmann, A. Hamm, C. Günther, M. Michel, R. Brun, V. Mudogo, Ancistrocalines A and B, two new bioactive Naphthylisoquinolines, and related Naphthoic Acids from *Ancistrocladus ealaensis*, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1465-1470.
- [89] G. Bringmann, J. Holenz, L. Aké Assi, C. Zhao, K. Hostettmann, Molluscicidal Activity of Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Triphyophyllum* and *Ancistrocladus* Species, *Planta Med.* **1996**, *62*, 556-557.
- [90] G. Bringmann, J. Holenz, L. Aké Assi, K. Hostettmann, Molluscicidal Activity (*Biomphalaria glabrata*) of Dioncophylline A – Structure Activity Investigations, *Planta Med.* **1998**, *64*, 485-486.
- [91] G. François, M. van Looveren, G. Timperman, B. Chimanuka, L. Aké Assi, J. Holenz, G. Bringmann, Larvicidal Activity of the Naphthylisoquinoline Alkaloid Dioncophylline A

- against the Malaria Vector *Anopheles stephensi*, *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *54*, 125-130.
- [92] C. Grimm, P. Proksch, S. Gramatzki, C. Schneider, G. Bringmann, Deleterious Effects of Naphthylisoquinoline Alkaloids on Survival and Growth of *Spodoptera littoralis*, *Planta Med.* **1992**, *58* (Suppl. 1), 630.
- [93] G. Bringmann, S. Gramatzki, C. Grimm, P. Proksch, Feeding Deterrency and Growth retarding Activity of the Naphthylisoquinoline Alkaloid Dioncophylline A against *Spodoptera littoralis*, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3821-3825.
- [94] G. Bringmann, S. Gramatzki, C. Müller, P. Proksch, Structure-Activity Relationships of Naphthylisoquinoline Alkaloids: feeding Experiments with the herbivorous Insect *Spodoptera littoralis*, *Planta Med.* **1993**, *59* (Suppl.), 624.
- [95] G. Bringmann, J. Holenz, B. Wiesen, B.W. Nugroho, P. Proksch, Dioncophylline A as a growth-retarding Agent against the herbivorous Insect *Spodoptera littoralis*: Structure-Activity Relationships, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 342-347.
- [96] G. Bringmann, M. Rübenacker, E. Ammermann, G. Lorenz, L. Aké Assi, Dioncophyllines A and B as Fungicides, Europäisches Patent EP 0515 856 A1, Offenlegung 02.12.1992.
- [97] S.E. Williams, V.A. Albert, M.W. Chase, Relationships of Droseraceae: a cladistic Analysis of rbcL Sequence and morphological Data, *Am. J. Bot.* **1994**, *81*, 1027-1037.
- [98] K.M. Cameron, M.W. Chase, S. M. Swensen, Molecular Evidence for the Relationships of *Triphyophyllum* and *Ancistrocladus*, *Am. J. Bot.* **1995**, *82*, 335.
- [99] M.F. Fay, K.M. Cameron, G.T. Prance, M.D. Lledo, M.W. Chase, Familial Relationships of *Rhabdodendron* (Rhabdodendraceae): plasmid rbcL Sequences indicate a Caryophyllid Placement, *Kew Bull.* **1997**, *52*, 923-932.
- [100] C.R. Metcalfe, The anatomical Structure of the Dioncophyllaceae in Relation to the taxonomic Affinities of the Family, *Kew Bull.* **1951**, *341*, 351-368.
- [101] R. Schmid, Die systematische Stellung der Dioncophyllaceen, *Bot. Jb.* **1964**, *83*, 1-56.
- [102] H. Gottwald, N. Parameswaran, Das sekundäre Xylem und die systematische Stellung der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae, *Bot. Jb.* **1968**, *88*, 49-69.
- [103] V.A. Albert, D.W.M. Stevenson, Morphological Cladistics of the Nepenthales, *Am. J. Bot.* **1996**, *83*, 135.
- [104] G. Erdtman, A Note on the Pollen Morphology in the Ancistrocladaceae and Dioncophyllaceae, *Veröff. Geobot. Inst. Rübel Zürich* **1958**, *33*, 47-49.
- [105] G. Walker-Arnott, Malpighiaceae, *Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Germanicae* **1836**, *18*, 325-326.
- [106] S. Endlicher, *Genera Plantarum*, Fasc. 14, Wien, **1840**.
- [107] M.J.-E. Planchon, Essai monographique d'une nouvelle Famille de Plantes proposée sous le nom d'Ancistrocladacées, *Ann. Sci. Nat. Bot.* **1849**, *13*, 316-320.
- [108] M.P. van Tieghem, Sur les Ancistrocladacées, *Journal de Botanique* **1903**, *17*, 151-168.
- [109] H. Hallier, Beiträge zur Kenntnis der Linaceae, *Beih. Botan. Centralbl.* **1923**, *39*, 1-178.
- [110] E. Gilg, Ancistrocladaceae in: *Die natürlichen Pflanzenfamilien* (Hrsg.: A. Engler) 2. Aufl., Bd. 21, Leipzig, **1925**, 589-592.
- [111] J. Hutchinson, *Evolution and Phylogeny of Flowering Plants*, Academic Press, London, **1969**.
- [112] A. Cronquist, *An integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press, New York, **1988**.
- [113] G. Dahlgren, The last Dahlgrenogram. System of Classification of the Dicotyledons in

- Plant Taxonomy, Phytogeography and related Subjects* (Hrsg.: K. Tan), University Press, Edinburgh, **1989**.
- [114] A.L. Takhtajan, *Diversity and Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press, New York, **1997**.
- [115] H. Baillon, Observations sur quelques nouveaux Types du Congo, *Bull. Soc. Linn. Paris* **1890**, 109, 870.
- [116] O. Warburg, Flacourtiaceae in *Die natürlichen Pflanzenfamilien* (Hrsg.: A. Engler, K. Prantl) Bd. III 6a, W. Engelmann, Leipzig, **1894**, 29-30.
- [117] H. Meimberg, P. Dittrich, G. Bringmann, J. Schlauer, G. Heubl, Molecular Phylogeny of Caryophyllidae *s.l.* based on matK Sequences with special Emphasis on carnivorous Taxa, *Plant Biol.* **2000**, 2, 218-228.
- [118] R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 3, Birkhäuser Verlag, Basel, **1964**, 115.
- [119] R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 4, Birkhäuser Verlag, Basel, **1966**, 39-42 u. 388-389.
- [120] M. Vahl, *Wormia, Skrifter af Naturhistorie-Selskabet* **1810**, 6, 104-107.
- [121] J. Massart, Sur le Morphologie du Bourgeon, *Ann. Jard. Bot.* **1896**, 13, 121-136.
- [122] N. Hallé, Crochets de Lianes du Gabon: *Ancistrocladus et Anacolosa* (Ancistrocladacées et Olacacées), *Adansonia* **1973**, 13, 299-306.
- [123] H. Keng, Further Observations on *Ancistrocladus tectorius* (Ancistrocladaceae), *Gard. Bull. Straits Settle.* **1970**, 25, 235-237.
- [124] G. H. K. Thwaites, Note on the Genus *Ancistrocladus* of Wallich, *Trans. Linn. Soc.* **1854**, 21, 225-226.
- [125] J. Léonard, *Ancistrocladus robertsoniorum* J. Léonard (Ancistrocladaceae), Espèce nouvelle du Kenya, *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* **1984**, 54, 465-470.
- [126] V.S. Rao, The floral Anatomy of *Ancistrocladus*, *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B* **1969**, 70, 215-222.
- [127] H. Keng, Observations on *Ancistrocladus tectorius* (Ancistrocladaceae), *Gard. Bull. Straits Settle.* **1967**, 22, 113-121.
- [128] R.E. Gereau, Typification of Names in *Ancistrocladus* Wallich (Ancistrocladaceae), *Novon* **1997**, 7, 242-245.
- [129] A. de Candolle, Ancistrocladeae in *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* (Hrsg.: A. de Candolle), Bd. 16, Victoris Masson et Filii, Paris, **1864**, 601-603.
- [130] M. Cheek, A synoptic Revision of *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae) in Africa, with a new Species from Western Cameroon, *Kew Bull.* **2000**, 55, 871-882.
- [131] M. Cheek, C. Frimodt-Møller, V. Hørlyck, A new submontane Species of *Ancistrocladus* from Tanzania, *Kew Bull.* **2000**, 55, 207-212.
- [132] R. Freson, Note sur la Distribution Africaine du Genre *Ancistrocladus* Wall. (Ancistrocladaceae), *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* **1967**, 37, 73-76.
- [133] C.G.G.J. van Steenis, Ancistrocladaceae in *Flora Malesiana*, Bd. 4, **1948**, 8-10.
- [134] H.K. Airy Shaw, '*Ancistrocladus barteri*', *Kew Bull.* **1949**, 4, 67-69.
- [135] M. Scott-Elliot, Mr. Scott-Elliot on the botanical Results of the Sierra Leone Boundary Commission, *J. Linn. Soc. Bot.* **1894**, 30, 73-74.
- [136] J. Léonard, Une nouvelle et curieuse Famille pour la Flore Phanérogamique du Congo Belge: les Ancistrocladaceae, *Bull. Soc. Bot. Belg.* **1949**, 82, 27-40.

- [137] Oliver, *Ancistrocladus guineensis*, *Fl. Trop. Afr.* **1868**, 1.
- [138] F. Pellegrin, Deux Plantes Congolaises à Affinités Asiatiques, *Bull. Soc. Bot. France* **1951**, 98, 17-18.
- [139] H.K. Airy Shaw, Further Notes on West African *Ancistrocladus*, *Kew Bull.* **1950**, 5, 147-150.
- [140] J. Hutchinson, J.M. Dalziel, Ancistrocladaceae, *Bull. Misc. Inform. Kew* **1928**, 218-219.
- [141] W.T. Thiselton Dyer., *Ancistrocladus* in *Flora of British India* (Hrsg.: J.D. Hooker) Bd. 1, L. Reeve & Co. Ltd., Kent, **1874**, 299-300.
- [142] W.G. Craib, *Ancistrocladus carallioides*, *Kew Bull.* **1925**, 19-20.
- [143] F. Gagnepain, Plantes nouvelles d'Indo-Chine in *Notulae Systematicae* (Hrsg.: H. Lecomte), Bd. 4, J. Dumoulin, Paris, **1909**, 114-116.
- [144] B. Hayata, Dipterocarpaceae,  *Ic. Pl. Formos.* **1913**, 3, 46-47.
- [145] E. Gilg, Ancistrocladaceae in *Die natürlichen Pflanzenfamilien* (Hrsg.: A. Engler) Bd. 3, Leipzig, **1895**, 276.
- [146] J. Graham, *Ancistrocladus heyneanus*, *Cat. Pl. Bombay* **1839**, 28.
- [147] O. Warburg, Beiträge zur Kenntnis der papuanischen Flora, *Bot. Jahrb. Syst.* **1891**, 13, 383.
- [148] E.D. Merrill, Hainan Plants, *Lignan Science Journal* **1928**, 6, 329.
- [149] D. Brandis, Order 18. Ancistrocladaceae in *Indian Trees*, Dehra Dun, **1906**, 73-74.
- [150] H.H. Hu, Ancistrocladaceae, *Contributions from the Biological Laboratory of the Science Society of China* **1929**, 5, 43-45.
- [151] W.G. Craib, Ancistrocladaceae in *Florae Siamensis Enumeratio – A List of Plants known from Siam with Records of their Occurrence*, Bd. 1, Siam Society, Bangkok, **1931**, 148-149.
- [152] T.P. Ramamoorthy, 46. Ancistrocladaceae in *Flora of Hassan District, Karnataka, India* (Hrsg.: C.J. Saldanha, D.H. Nicolson), Amerind Publishing, New Delhi, **1976**, 171-172.
- [153] S-L. Mo, Y.-C. Ye, Plantae novae Guangxiensis, *Guihaia* **1987**, 7, 287-291.
- [154] N.A. Harriman, Ancistrocladaceae in *A revised Handbook to the Flora of Ceylon* (Hrsg.: M.D. Dassanayake), Bd. 6, A.A. Balkema, Rotterdam, **1988**, 1-2.
- [155] H. Pham-Hoang, Cayco Vietnam, *An illustrated Flora of Vietnam*, Vol. 1, Mekong Printing, Santa Ana, Canada, **1991**, 555.
- [156] 22. Ancistrocladaceae in *Flora of Andaman and Nicobar Islands* (Hrsg.: P.K. Hajra, P.S.N. Rao, V. Mudgal), Vol. 1, Calcutta, **1999**.
- [157] J.P. Foucher, J.L. Poussel, A. Cavé, R.R. Paris, Sur les Alcaloïdes de l'*Ancistrocladus tectorius* Loureiro du Laos, *Plant. Méd. Phytothér.* **1975**, 9, 26-31.
- [158] N. Ruangrunsi, V. Wongpanich, P. Tantivatana, H.J. Cowe, P.J. Cox, S. Funayama, G.A. Cordell, Ancistrotectorine, a new Naphthalene-Isoquinoline Alkaloid from *Ancistrocladus tectorius*, *J. Nat. Prod.* **1985**, 48, 529-535.
- [159] K.P. Manfredi, M. Britton, V. Vissieche, L.K. Pannell, Three new Naphthylidihydroisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*, *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 854-859.
- [160] Z. Chen, B. Wang, K. Qin, B. Zhang, Q. Su, Q. Lin, Isolation and Identification of the Alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*, *Yaoxue Xuebao* **1981**, 16, 519-522.
- [161] G. Bringmann, L. Kinzinger, (+)-Ancistrocline, a Naphthylisoquinoline Alkaloid from *Ancistrocladus tectorius*, *Phytochemistry* **1992**, 31, 3297-3299.
- [162] C.-P. Tang, Y.-P. Yang, Y. Zhong, Q.-X. Zhong, H.-M. Wu, Y. Ye, Four new Naphthyliso-

- quinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1384-1387.
- [163] A.H. Nguyen, A. Porzel, H. Ripperger, G. Bringmann, M. Schäffer, R. God, T.V. Sung, G. Adam, Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus cochinchinensis*, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1287-1291.
- [164] A.H. Nguyen, T.V. Sung, H. Ripperger, G. Adam, Some Results from chemical Study on Vietnamese *Ancistrocladus cochinchinensis*, *Tap Chi Hoa Hoc* **1996**, *34*, 89-93.
- [165] G. Bringmann, K. Messer, M. Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, HPLC-CD on-line Coupling in Combination with HPLC-NMR and HPLC-MS/MS for the Determination of the full absolute Stereostructure of new Metabolites in Plant Extracts, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2678-2686.
- [166] M. Dreyer, Isolierung und Strukturaufklärung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus südostasiatischen Ancistrocladaceen und der Versuch der chemotaxonomischen Einordnung in bestehende genetische und morphologische Systeme, *Dissertation, Universität Würzburg*, in Bearbeitung.
- [167] H. Meimberg, *Dissertation, Universität München*, voraussichtlich **2002**.
- [168] M. Wohlfarth, Aufklärung der Biogenese von strukturell ungewöhnlichen Metaboliten aus tropischen Pflanzen und phytochemische Analytik on-line mit der 'Triade' HPLC-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD, *Dissertation, Universität Würzburg*, voraussichtlich **2001**.
- [169] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Heubes, W. Saeb, S. Diem, M. Herderich, J. Schlauer, A photometric Screening Method for dimeric Naphthylisoquinoline Alkaloids and complete on-line structural Elucidation of a novel-type Dimer in crude Plant Extracts, by the LC-MS/LC-NMR/LC-CD triad, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2571-2577.
- [170] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, J. Schlauer, R. Brun, Extract Screening by HPLC coupled to MS-MS, NMR, and CD: a novel dimeric and three monomeric Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus griffithii*, *Phytochemistry*, eingereicht.
- [171] J. Schlauer, M. Rückert, B. Wiesen, M. Herderich, L. Aké Assi, R.D. Haller, S. Bär, K.-U. Fröhlich, G. Bringmann, Characterization of Enzymes from *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae) and *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae) catalyzing oxidative Coupling of Naphthylisoquinoline Alkaloids to give Michellamines, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *350*, 87-94.
- [172] G. Bringmann, S. Tasler, Oxidative aryl Coupling Reactions: A biomimetic Approach to configurationally unstable or axially chiral Biaryl Natural Products and related bioactive Compounds, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 331-343.
- [173] O. Hoshino, B. Umezawa, Lead Tetraacetate Oxidation in Alkaloid Synthesis in *The Alkaloids* (Hrsg.: A. Brossi), Bd. 36, **1989**, 69-134.
- [174] H. Rischer, Sekundärmetabolismus von Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen *in vitro* und *in vivo*, *Diplomarbeit, Universität Würzburg*, **1998**.
- [175] G. Bringmann, H. Rischer, J. Schlauer, L. Aké Assi, *In vitro* Propagation of *Ancistrocladus abbreviatus* Airy Shaw (Ancistrocladaceae), *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **1999**, *57*, 71-73.
- [176] T. Noll, Untersuchungen der Biosynthese acetogener Inhaltstoffe in Zellkulturen von *Ancistrocladus* – und anderen tropischen Pflanzenarten, *Diplomarbeit, Universität Würzburg*, voraussichtlich **2002**.
- [177] S. Bajaj, M.V. Rajam, Efficient Plant Regeneration from long-term Callus Cultures of Rice by Spermidine, *Plant Cell Rep.* **1995**, *14*, 717-720.

- [178] R.P. Niedz, Using Isothiazolone Biocides to control microbial and fungal Contaminants in Plant Tissue Cultures, *HortTechnology* **1998**, 8, 598-601.
- [179] J. Hutchinson, J.M. Dalziel, Dioncophyllaceae in *Flora of West Tropical Africa* (Hrsg.: R.W.J. Keay), Bd. 1, Teil 1, Crown Agents for Oversea Governments and Administrations, London, **1954**, 191-194.
- [180] I. Kaliangile, D.F. Grabe, Seed Maturation in *Cuphea*, *J. Seed Tech.* **1988**, 12, 107-113.
- [181] J.E. Marburger, Glandular Leaf Structure of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae): A 'Fly-Paper' Insect Trapper, *Am. J. Bot.* **1979**, 66, 404-411.
- [182] S. Carlquist, E.J. Wilson, Wood Anatomy of *Drosophyllum* (Droseraceae) – ecological and phylogenetic Considerations, *Bull. Torrey Bot. Club* **1995**, 122, 185-189.
- [183] S. Green, T.L. Green, Y. Heslop-Harrison, Seasonal Heterophylly and Leaf Gland Features in *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae), a new Carnivorous Plant Genus, *Bot. J. Linn. Soc.* **1979**, 78, 99-116.
- [184] G. Bringmann, J. Schlauer, K. Wolf, H. Rischer, U. Buschbom, A. Kreiner, F. Thiele, M. Duschek, L. Aké Assi, Cultivation of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae), the Part-Time Carnivorous Plant, *Carnivorous Plant Newsletter* **1999**, 28, 7-13.
- [185] G. Bringmann, H. Rischer, J. Schlauer, K. Wolf, A. Kreiner, M. Duschek, L. Aké Assi, The tropical Liana *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae): Formation of carnivorous Organs is only a facultative Prerequisite for Shoot Elongation, *Carnivorous Plant Newsletter* **2002**, im Druck.
- [186] C.P. Wilkins, J.H. Dodds, The Application of Tissue Culture Techniques to Plant Genetic Conservation, *Sci. Prog.* **1983**, 68, 259-284.
- [187] G. Bringmann, H. Rischer, *In vitro* Propagation of the Alkaloid-producing rare African Liana, *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae), *Plant Cell Rep.*, **2001**, 20, 591-595.
- [188] T. Gaspar, M. Coumans, Root Formation in *Cell and Tissue Culture in Forestry* (Hrsg.: J.M Bonga, D.J. Durzan), Bd. 2, Martinus Nijhof, Dordrecht, **1987**, 202-217.
- [189] B. Fratello, Enhanced Interpretation of Tissue Protease Activity by use of photographic Colour Film as a Substrate, *Stain Technol.* **1968**, 43, 125-128.
- [190] Y. Heslop-Harrison, R.B. Knox, A cytochemical Study of the Leaf-Gland Enzymes of Insectivorous Plants of the Genus *Pinguicula*, *Planta* **1971**, 96, 183-211.
- [191] G. Bringmann, H. Rischer, M. Wohlfarth, J. Schlauer, L. Aké Assi, Droserone from Cell Cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and its biosynthetic Origin, *Phytochemistry* **2000**, 53, 339-343.
- [192] H.K. Desai, D.H. Gawad, T.R. Govindachari, B.S. Joshi, N. Kamat, J.D. Modi, P.C. Parthasarathy, J. Radhakrishnan, M.N. Shanbhag, A.R. Sidhaye, N. Viswanathan, Chemical Investigation of Indian Plants, *Indian J. Chem.* **1973**, 11, 840.
- [193] J.R. Cannon, V. Lojanapiwatna, C.L. Raston, W. Sinchai, A.H. White, The Quinones of *Nepenthes rafflesiana*, *Aust. J. Chem.* **1980**, 33, 1075-1093.
- [194] K. Likhitwitayawuid, R. Kaewamatawong, N. Ruangrungsi, J. Krungkrai, Antimalarial Naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*, *Planta Med.* **1998**, 64, 237-241.
- [195] M.H. Zenk, M. Furbringer, W. Steglich, Occurrence and Distribution of 7-Methyljuglone and Plumbagin in the Droseraceae, *Phytochemistry* **1969**, 8, 2199-2200.
- [196] T. Schölly, I. Kapetanidis, Flavonol and Naphthoquinone Glycosides of *Drosera rotundifolia*, *Planta Med.* **1989**, 55, 611.
- [197] V. Krishnamoorthy, R.H.A. Thomson, New Binaphthoquinones from *Drosera ramentcea*, *Phytochemistry* **1969**, 8, 1591-1594.

- [198] R. Paris, P. Delaveau, Recherches sur les Droséras. Isolement de la Plumbagone du *D. auriculata* Backh. ex Planch. et de Ramentaceone du *D. ramentacea* Burch, *Ann. Pharm. Fr.* **1959**, 17, 585-592.
- [199] G. Bendz, G. Lindberg, Naphthoquinones and Anthocyanins from two *Drosera* Species, *Acta Chem. Scand.* **1968**, 22, 2711-2713.
- [200] R. Caniato, R. Filippini, E.M. Cappelletti, Naphthoquinone Contents of cultivated *Drosera* Species *Drosera binata*, *Drosera binata* var. *dichotoma* and *Drosera capensis*, *Intl. J. Crude Drug Res.* **1989**, 27, 129-136.
- [201] H. Dieterle, E. Kruta, Über einen Inhaltstoff aus *Drosera rotundifolia*, *Arch. Pharm.* **1936**, 274, 457-461.
- [202] A. Culham, R.J. Gornall, The taxonomic Significance of Naphthoquinones in the Droseraceae, *Biochem. Syst. Ecol.* **1994**, 22, 507-515.
- [203] B. Kreher, A. Neszmelyi, H. Wagner, Naphthoquinones from *Dionaea muscipula*, *Phytochemistry* **1990**, 29, 605-606.
- [204] M. Asano, J. Hase, Pigment of *Drosera peltata*, *J. Pharm. Soc. Japan* **1943**, 63, 410-411.
- [205] E.H. Rennie, The colouring Matter of *Drosera whittakeri*, *J. Chem. Soc.* **1887**, 51, 371-377.
- [206] J.B. Harborne, Correlations between Chemistry, Pollen Morphology and Systematics in the Family Plumbaginaceae, *Phytochemistry* **1967**, 6, 1415-1428.
- [207] J.-M. Yue, J. Xu, Y. Zhao, H.-D. Sun, Z.-W. Lin, Chemical Components from *Ceratostigma willmottianum*, *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 1031-1033.
- [208] L.M. van der Vijver, Distribution of Plumbagin in the Plumbaginaceae, *Phytochemistry* **1972**, 11, 3247-3248.
- [209] R.H. Thomson, *Naturally occurring Quinones II*, Academic Press, London, **1971**.
- [210] J. Bhattacharyya, V.R. de Carvalho, Epi-Isoshinanolone from *Plumbago scandens*, *Phytochemistry* **1986**, 25, 764-765.
- [211] B. Dinda, S.K. Das, A.K. Hajra, Naphthoquinones from the Roots of *Plumbago rosea* Linn., *Indian J. Chem.* **1995**, 34, 525-528.
- [212] A.V.B. Sankaram, A. Srinivasarao, G.S. Sidhu, Chitranone – a new Binaphthaquinone from *Plumbago zeylanica*, *Phytochemistry* **1976**, 15, 237-238.
- [213] G.M.K.B. Gunaherath, A.A.L. Gunatilaka, M.U.S. Sultanbawa, S. Balasubramaniam, 1,2(3)-Tetrahydro-3-3'-biplumbagin: a Naphalenone and other Constituents from *Plumbago zeylanica*, *Phytochemistry* **1983**, 22, 1245-1247.
- [214] U.V. Mallavadhani, A.K. Panda, Y.R. Rao, Pharmacology and Chemotaxonomy of *Diospyros*, *Phytochemistry* **1998**, 49, 901-951.
- [215] G.S. Sidhu, A.V.B. Sankaram, S.M. Ali, New Naphthoquinones and Naphthols from the Heartwood of *Diospyros melanoxylon* Roxb., *Indian J. Chem.* **1968**, 6, 681-691.
- [216] M. Higa, K. Himeno, S. Yogi, K. Hokama, A new brominated Naphthoquinone from *Diospyros maritima* Blume, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 4366-4367.
- [217] S.-M. Zhong, P.G. Waterman, J.A.D. Jeffreys, Naphthoquinones and Triterpenes from African *Diospyros* Species, *Phytochemistry* **1984**, 23, 1067-1072.
- [218] M. Tezuka, C. Takahashi, M. Kuroyanagi, M. Satake, K. Yoshihira, S. Natori, New Naphthoquinones from *Diospyros*, *Phytochemistry* **1973**, 12, 175-183.
- [219] P. Richomme, B. Papillon, P. Cabalion, J. Bruneton, Naphthoquinones de *Diospyros samoensis*, *Pharm. Acta Helv.* **1991**, 66, 88-89.
- [220] M.B. Zakaria, J.A.D. Jeffreys, P.G. Waterman, S.-M. Zhong, Naphthoquinones and

- Triterpenes from some Asian *Diospyros* Species, *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1481-1484.
- [221] V. Kumar, K.M. Meepagala, S. Balasubramaniam, Quinoid and other Constituents of *Aristea ecklonii*, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1118-1119.
- [222] C.A. Williams, J.B. Harborne, P. Goldblatt, Correlations between phenolic Patterns and tribal Classification in the Family Iridaceae, *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2135-2154.
- [223] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Grüne, J. Schlauer, Ein neuer Biosyntheseweg zu Alkaloiden in Pflanzen: Acetogenine Isochinoline, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1253-1255; A new biosynthetic Pathway to Alkaloids in Plants: Acetogenic Isoquinolines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1464-1466.
- [224] G. Bringmann, M. Münchbach, K. Messer, D. Koppler, M. Michel, O. Schupp, M. Wenzel, A.M. Louis, *Cis*- and *trans*-Isoshinanolone from *Dioncophyllum thollonii*: Absolute Configuration of two 'known', Wide-Spread Natural Products, *Phytochemistry* **1999**, *51*, 693-699.
- [225] G. Bringmann, K. Messer, W. Saeb, E.-M. Peters, K. Peters, The absolute Configuration of (+)-Isoshinanolone and *in situ* LC-CD Analysis of its Stereoisomers from crude Extracts, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 387-391.
- [226] K. Messer, persönliche Mitteilung **2000**.
- [227] J.A. Bailey, J.W. Mansfield, *Phytoalexins*, Blackie, Glasgow, **1982**.
- [228] R. Endreß, *Plant Cell Biotechnology*, Springer Verlag, Berlin, **1994**.
- [229] E.E. Farner, C.A. Ryan, Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid activate the Synthesis of Wound-inducible Proteinase Inhibitors, *Pl. Cell* **1992**, *4*, 129-134.
- [230] S.F. Yang, N.E. Hoffman, Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1984**, *35*, 155-189.
- [231] T. Kartnig, C. Gratzner, Production of 1,4-Naphthoquinones and Flavonoids in *in vitro* cultivated *Drosera madagascariensis* DC. in *Book of Abstracts: 2000 Years of Natural Products Research – Past, Present and Future* (Hrsg.: T. Luijendijk, P. de Graaf, A. Remmelzwaal, R. Verpoorte), Division of Pharmacognosy, Leiden, **1999**, 323.
- [232] E.J. Szymkowiak, I.M. Sussex, What Chimeras can tell us about Plant Development, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, *47*, 451-476.
- [233] K. Wolf, *In-vivo*-NMR zur Metabolitendetektion an Pflanzen und quantenchemische Berechnungen, *Dissertation, Universität Würzburg*, **2000**.
- [234] G. Bringmann, T. Geuder, M. Rübenacker, R. Zagst, A facile Degradation Procedure for Determination of absolute Configuration in 1,3-Dimethyltetra- and Dihydroisoquinolines, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2067-2070.
- [235] G. Bringmann, T. Geuder, F. Pokorny, M. Schäffer, R. Zagst, The Determination of the absolute Configuration of *N*-methylated 1,3-Dimethyltetrahydroisoquinolines by oxidative Degradation, *Planta Med.* **1993**, *59* (Suppl.), 619-620.
- [236] G. Bringmann, R. God, M. Schäffer, An improved Degradation Procedure for Determination of the absolute Configuration in chiral Isoquinoline and  $\beta$ -Carboline Derivatives, *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1393-1403.
- [237] G. Bringmann, F. Pokorny, M. Stäblein, M. Schäffer, L. Aké Assi, Ancistrobrevine C from *Ancistrocladus abbreviatus*: the first mixed 'Ancistrocladaceae/Dioncophyllaceae-type' Naphthylisoquinoline Alkaloid, *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1511-1515.
- [238] O. Prakash, A. Sood, M. Sharma, P.S. Ahuja, Grafting micropropagated Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Shoots on Tea Seedlings – a new Approach to Tea Propagation, *Plant Cell Rep.* **1999**, *18*, 883-888.

- [239] J. Luo, J.H. Gould, *In vitro* Shoot-Tip Grafting improves Recovery of Cotton Plants from Culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **1999**, *57*, 211-213.
- [240] E.E. Mneney, S.H. Mantell, *In vitro* Micrografting of Cashew, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **2001**, *66*, 49-58.
- [241] D. Schlee, *Ökologische Biochemie*, Springer Verlag, Berlin, **1986**.
- [242] C.J. Soderquist, Juglone and Allelopathy, *J. Chem. Educ.* **1973**, *50*, 782-783.
- [243] C. Daglish, The Isolation and Identification of a Hydrojuglone Glycoside occurring in the Walnut, *Biochem. J.* **1950**, *47*, 452-457.
- [244] M. Higa, K. Ogihara, S. Yogi, Bioactive Naphthoquinone Derivatives from *Diospyros maritima* Blume, *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1189-1193.
- [245] F. Pokorny, Anzucht steriler Pflanzen und Pflanzenzellkulturen von *Ancistrocladus heyneanus* Wall. und Partialsynthese des Ancistrocladotoxins, *Diplomarbeit, Universität Würzburg*, **1988**.
- [246] B.N. Poul, D.S. Mukadam, L.B. Dama, B.V. Jadhav, Bio-active Spectra of Plumbagin, *Asian J. Chem.* **1999**, *11*, 144-148.
- [247] M. Jebb, M. Cheek, A sleletal Revision of *Nepenthes* (Nepenthaceae), *Blumea* **1997**, *42*, 1-106.
- [248] C.K. Frazier, The enduring Controversies concerning the Process of Protein Digestion in *Nepenthes* (Nepenthaceae), *Carnivorous Plant Newsletter* **2000**, *29*, 56-61.
- [249] H.F. Greeney, The Insects of Plant-held Waters: a Review and Bibliography, *J. Trop. Ecol.* **2001**, *17*, 241-260.
- [250] T.P. Owen, K.A. Lennon, M.J. Santo, A.N. Anderson, Pathways for nutrient Transport in the Pitchers of the Carnivorous Plant *Nepenthes alata*, *Ann. Bot.* **1999**, *84*, 459-466.
- [251] U. Lüttge, Über die Resorption verschiedener Substanzen, *Planta* **1965**, *66*, 331-344.
- [252] M.A. Rizzacasa, M.V. Sargent, The Structure and Synthesis of Nepenthone A, a Naphthoquinone from *Nepenthes rafflesiana*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 2017-2022.
- [253] G. Neamtu, C. Bodea, Carotenoid Pigments of Carnivorous Plants, *Stud. Cercet. Biochim.* **1972**, *15*, 181-185.
- [254] A.S. Wan, R.T. Aixel, R.B. Ramsey, H.J. Nicholas, Sterols and Triterpenes of the Pitcher Plant, *Phytochemistry* **1972**, *2*, 456-461.
- [255] M. Jay, P. Lebreton, Les Flavonoides des Sarraceniaceés, Nepenthacées, Droseracées et Cephalotacées; Étude critique de l'ordre des Sarraceniales, *Naturaliste Canad.* **1972**, *99*, 607-613.
- [256] H. Rischer, A. Hamm, G. Bringmann, *Nepenthes insignis* Danser (Nepenthaceae) uses a C<sub>2</sub>-Portion of the Carbon Skeleton of L-Alanine acquired via its carnivorous Organs, to build up the allelochemical Plumbagin, *Phytochemistry* **2002**, im Druck.
- [257] R.H. Thomson, *Naturally occurring Quinones III*, Chapman & Hall, New York, **1987**.
- [258] N. Sampara-Rumantir, Rossoliside, *Pharm. Weekblad* **1971**, *106*, 653-663.
- [259] J. Budzianowski, Naphthoquinones of *Drosera spatulata* from *in vitro* Cultures, *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1145-1148.
- [260] J. Budzianowski, Naphthoquinone Glucosides of *Drosera rotundifolia* and *D. intermedia* from *in vitro* Cultures, *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1145-1147.
- [261] B. Kreher, A. Neszmelyi, K. Polos, H. Wagner, Structure Elucidation of Plumbagin Analogues from *Dionaea muscipula* and their *in vitro* immunological Activity on

- human Granulocytes and Lymphocytes, *Planta Med.* **1989**, *55*, 112.
- [262] J. Vinkenborg, N. Sampara-Rumantir, O.F. Uffelle, De Aanwezigheid van Hydroplumbagine-Glucoside in *Drosera rotundifolia* L., *Pharm. Weekblad* **1969**, *104*, 45-49.
- [263] J. Budzianowski, Naphthoquinone Glucosides of *Drosera gigantea* from *in vitro* Cultures, *Planta Med.* **2000**, *66*, 667-669.
- [264] C.I. An, E.I. Fukusaki, A. Kobayashi, Plasma-Membrane H<sup>+</sup>-ATPases are expressed in Pitchers of the Carnivorous Plant *Nepenthes alata* Blanco, *Planta* **2001**, *212*, 547-555.
- [265] P.A. Rea, Evidence for the H<sup>+</sup>-Co-Transport of D-Alanine by the digestive Glands of *Dionaea muscipula* Ellis, *Plant, Cell and Environ.* **1984**, *7*, 363-366.
- [266] P.A. Rea, F.R. Whatley, The Influence of Secretion Elicitors and external pH on the Kinetics of D-Alanine Uptake by the Trap Lobes of *Dionaea muscipula* Ellis (Venus's Flytrap), *Planta* **1983**, *158*, 312-319.
- [267] S. Nakayama, S. Amagase, Acid Protease in *Nepenthes*: Partial Purification and Properties of the Enzyme, *Proc. Japan Acad.* **1968**, *44*, 358-362.
- [268] A.K.A. Chowdhury, K.C. Sushanta, A.K.A. Khan, Antifertility Activity of *Plumbago zeylanica* Root, *Indian J. Med. Res.* **1982**, *76*, 99-101.
- [269] Y. Noda, Y. Kawazoe, A. Hakura, Cytotoxicity of Naphthoquinones toward cultured resting murine Leukemia L1210 Cells in the Presence of Glutathione, Diethyl maleate, or Iodoacetamide, *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 1250-1256.
- [270] M.A. Villavicencio, B.E. Perez-Escadon, Concentracion de Plumbagina en *Plumbago pulchella* Boiss. (Plumbaginaceae) y su Efecto en la Seleccion de Alimento de Larvas de *Arachnis aulea* (Geyer)(Lepidoptera:Arctidae), *Folia Entomol. Mex.* **1994**, *90*, 17-24.
- [271] N.K. Joshi, F. Sehnaal, Inhibition of Ecdysteroid Production by Plumbagin in *Dysidercus cingulatus*, *J. Insect. Physiol.* **1989**, *35*, 737-741.
- [272] I. Kubo, M. Uchida, J.A. Klocke, An Insect Ecdysis Inhibitor from the African Medicinal Plant *Plumbago capensis* (Plumbaginaceae); a naturally occurring Chitin Synthetase Inhibitor, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 911-913.
- [273] M. Hering, Eine in den Kannen von *Nepenthes* minierende *Phyllocnistis* (Lepidopt.) und ihr Parasit, eine neue *Coprodiplosis* (Dipt. Cecidom.), *Arch. f. Hydrobiol.* **1931**, (Suppl. 8), 50-70.
- [274] C. Clarke, *Nepenthes of Borneo*, Natural History Publications (Borneo) Sdn. Bhd., Kota Kinabalu, **1997**.
- [275] E. Strasburger, *Lehrbuch der Botanik*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1983**, *32. Aufl.*
- [276] R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 4, Birkhäuser Verlag, Basel, **1966**, 103-140.
- [277] R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 8, Birkhäuser Verlag, Basel, **1989**, 440-474.
- [278] G.L. Webster, Synopsis of the Genera and suprageneric Taxa of Euphorbiaceae, *Ann. Mo. Bot. Gard.* **1994**, *81*, 33-144.
- [279] A. Radcliffe-Smith, Proposal to conserve 4318 *Hieronyma* with a conserved Spelling (Euphorbiaceae), *Taxon* **1994**, *43*, 485-486.
- [280] F.R. Pilar, The Genus *Hyeronima* (Euphorbiaceae) in South America, *Bot. Jahrb. Syst. Pflanzengesch. Pflanzengeogr.* **1990**, *111*, 297-346.
- [281] F. Pax, K. Hoffmann, Euphorbiaceae in *Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten, insbesondere den Nutzpflanzen* (Hrsg.: A. Engler),

- Bd. 19c, W, Engelmann, Leipzig, **1931**.
- [282] J. Léonard, Révision du Genre *Antidesma* L. (Euphorbiaceae) en Afrique Centrale, *Bull. Jard. Bot. Natl. Belg.* **1988**, 58, 3-46.
- [283] F. Pax, K. Hoffmann, Euphorbiaceae in *Das Pflanzenreich* (Hrsg.: A. Engler), W. Engelmann, Leipzig, **1922**, S. 141.
- [284] H.R. Arthur, A phytochemical Survey of some Plants in North Borneo, *J. Pharm. Pharmacol.* **1953**, 6, 66-72.
- [285] A.K. Garain, N.N. Chakravarti, T. Chakrabartty, Chemical Investigation of *Antidesma ghesaembilla* Gaertn., *Bull. Calcutta Sch. Trop. Med.* **1973**, 21, 26.
- [286] R. Tschesche, E.U. Kaufmann, The Cyclopeptide Alkaloids in *The Alkaloids* (Hrsg. Manske), Bd. XX, Academic Press, New York **1975**, S. 165-205.
- [287] W.H. Hui, M.L. Sung, The Occurrence of Epitaraxerol and other Triterpenoids, *Aust. J. Chem.* **1968**, 21, 2137-2140.
- [288] S.H. Rizvi, A. Shoeb, R.S. Kapil, S.P. Popli, Antidesmanol – a new pentacyclic Triterpenoid from *Antidesma menasu*, *Experientia* **1980**, 36, 146-147.
- [289] S.H. Rizvi, A. Shoeb, R.S. Kapil, S.P. Popli, Two diuretic Triterpenoids from *Antidesma menasu*, *Phytochemistry* **1980**, 19, 2409-2410.
- [290] H. Kikuchi, A. Tensho, I. Shimizu, H. Shiokawa, A. Kuno, S. Yamada, T. Fujiwara, K. Tomita, Lupeolactone, a new  $\beta$ -Lactone from *Antidesma pentandrum* Merr., *Chem. Lett.* **1983**, 4, 603-606.
- [291] G.L. Webster, Classification of the Euphorbiaceae, *Ann. Mo. Bot. Gard.* **1994**, 81, 3-32.
- [292] A. Buske, Phytochemische Untersuchungen der Afrikanischen Euphorbiaceen *Antidesma membranaceum* und *Antidesma venosum*, *Dissertation, Universität Halle-Wittenberg*, **2000**.
- [293] D.R. Misra, D.B. Naskar, T.K. Ray, H.N. Khastgir, Phytosterols in Plants, *Phytochemistry* **1973**, 12, 1819-1820.
- [294] A. Buske, Über Inhaltsstoffe der afrikanischen Euphorbiaceae *Antidesma membranaceum*, *Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg*, **1996**.
- [295] A. Hemalatha, M. Radhakrishnaiah, Taxonomy of Phyllanthaceae: A chemical Point of View, *Feddes Repert.* **1994**, 105, 1-2.
- [296] T. Yoshida, O. Namba, C.F. Lu, L.L. Yang, K.Y. Yen, T. Okuda, Antidesmin A, a new dimeric hydrolyzable Tannin from *Antidesma pentandrum* var. *barbatum*, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 338-342.
- [297] O. Namba, T. Yoshida, C.F. Lu, L.L. Yang, K.Y. Yen, T. Okuda, Antidesmin A: A new dimeric Ellagitannin from *Antidesma pentandrum*, *Planta Med.* **1992**, 57 (Suppl.), A 125.
- [298] A. Buske, J. Schmidt, A. Porzel, G. Adam, Benzopyranones and Ferulic Acid Derivatives from *Antidesma membranaceum*, *Phytochemistry* **1997**, 46, 1385-1388.
- [299] C.P. Garcia, F.C. Sumera, R.F. Toia, Discarine A from *Antidesma fructiferum* Elm., *Acta Manilana* **1988**, 37, 59-63.
- [300] D. Arbain, W.C. Taylor, Cyclopeptide Alkaloids from *Antidesma montana*, *Phytochemistry* **1993**, 33, 1263-1266.
- [301] W.C. Taylor, Constituents of some Asian Medicinal Plants, *Pure & Appl. Chem.* **1994**, 66, 2375-2378.
- [302] C.P. Garcia, F.C. Sumera, R.F. Toia, The major Alkaloid from *Antidesma fructiferum* Elm., *ACGC Chem. Res. Commun.* **1995**, 3, 1-4.

- [303] J.A. Beutler, A.B. Alvarado, T.G. McCloud, G.M. Cragg, Distribution of Phorbol Ester Bioactivity in the Euphorbiaceae, *Phytother. Res.* **1989**, *3*, 188-192.
- [304] A.M. Tessier, A. Bouquet, R.R. Paris, Sur quelques Euphorbiacées toxiques Africaines, *Plant. Méd. Phytothér.* **1975**, *9*, 238-249.
- [305] A.M. Tessier, R.R. Paris, Sur quelques Euphorbiacées toxiques Africaines à Cucurbitacines, *Toxicologie végétale*, **1978**, *1*, 329-336.
- [306] K. Heyne, *De Nuttige Planten Nederlandsch Indie*, **1927**, S. 915.
- [307] J.M. Watt, M.G. Breyer-Brandwijk, *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*, E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh, **1962**, S. 397.
- [308] A. Buske, S. Busemann, J. Mühlbacher, J. Schmidt, A. Porzel, G. Bringmann, G. Adam, Antidesmone, a novel Type Isoquinoline Alkaloid from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae), *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1079-1086.
- [309] T.M.A. Alves, C.L. Zani, New Tetrahydroisoquinolines from *Hyeronima oblonga* (Euphorbiaceae), *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 205-208.
- [310] G. Bringmann, J. Schlauer, H. Rischer, M. Wohlfarth, J. Mühlbacher, A. Buske, A. Porzel, J. Schmidt, G. Adam, Revised Structure of Antidesmone, an unusual Alkaloid from tropical *Antidesma* Plants (Euphorbiaceae), *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3691-3695.
- [311] W.F. Tinto, G. Blyden, W.F. Reynolds, S. McLean, Constituents of *Hyeronima alchorneoides*, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1309-1313.
- [312] A. Petit, C. David, G.A. Dahl, J.G. Ellis, P. Guyon, Further Extension of the Opine Concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for Opine Degradation, *Mol. Gen. Genet.* **1983**, *190*, 204-214.
- [313] L. Jouanin, Restriction Map of an Agropine-type Ri Plasmid and its Homologies with Ti Plasmids, *Plasmid* **1984**, *12*, 91-102.
- [314] P. Zambryski, J. Tempe, J. Schell, Transfer and Function of T-DNA Genes from *Agrobacterium* Ti and Ri Plasmids in Plants, *Cell* **1989**, *56*, 193-201.
- [315] S.B. Gelvin, *Agrobacterium* and Plant Genes involved in T-DNA Transfer and Integration, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2000**, *51*, 223-256.
- [316] M. Tepfer, F. Casse-Delbart, *Agrobacterium rhizogenes* as a Vector for transforming Higher Plants, *Microbiological Sciences* **1987**, *4*, 24-28.
- [317] P.M. Doran (Hrsg.), *Hairy Roots: Culture and Application*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1997**.
- [318] J.V. Shanks, J. Morgan, Plant 'Hairy Root' Culture, *Current Opinion in Biotechnology* **1999**, *10*, 151-155.
- [319] J.D. Hamill, A.J. Parr, M.J.C. Rhodes, R.J. Robins, N.J. Walton, New Routes to Plant Secondary Products, *Bio/Technology* **1987**, *5*, 800-804.
- [320] S.E. Stachel, E. Messens, M. van Montagu, P. Zambryski, Identification of the Signal Molecules produced by wounded Plant Cells that activate T-DNA Transfer in *Agrobacterium rhizogenes*, *Nature* **1985**, *318*, 624-629.
- [321] G. Bringmann, H. Rischer, M. Wohlfarth, J. Schlauer, Biosynthesis of Antidesmone in Cell cultures of *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae): An unprecedented Class of Glycine-derived Alkaloids, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9905-9910.
- [322] E. Leete, Biosynthesis of the Hemlock Alkaloids. The Incorporation of Acetate-1-C<sup>14</sup> into Coniine and Conhydrine, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2509-2513.
- [323] M.F. Roberts, The Formation of  $\gamma$ -Coniceine from 5-Ketoctanal by a Transaminase of

- Conium maculatum*, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 3057-3060.
- [324] D. Voet, J.G. Voet, *Biochemie* (Hrsg.: A. Maelicke, W. Müller-Esterl), VCH, Weinheim, **1992**.
- [325] S.K. Sinha, E.A. Cossins, The Metabolism of [<sup>14</sup>C]Glycine by Plant Tissues, *Biochem. J.* **1964**, *93*, 27-34.
- [326] J. Bourguignon, F. Rébeillé, R. Douce, Serine and Glycine Metabolism in Higher Plants in *Plant Amino Acids* (Hrsg.: B.J. Singh), Dekker, New York, **1999**.
- [327] G. Falsone, F. Cateni, F. Katusian, H. Wagner, O. Seligmann, G. Pellizer, F. Asaro, New Cerebrosides from *Euphorbia characias* L., *Z. Naturforsch.* **1993**, *48b*, 1121-1126.
- [328] K.P. Vollhardt, *Organische Chemie*, VCH, Weinheim, **1990**.
- [329] R. Robinson, A Theory of the Mechanism of the phytochemical Synthesis of certain Alkaloids, *J. Chem. Soc.* **1917**, *111*, 876-899.
- [330] E. Medina, G. Spiteller, Konstitutionsaufklärung des Melochinins, eines Pyridon-Alkaloids neuen Typus aus *Melochia pyramidata* L. (Sterculiaceae), *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 376-383.
- [331] F.J.A. Giner, J.B. del Castillo, P.V. Bueno, R.M.P. de Rivas, Dos Alcaloides de *Melochia pyramidata* L., *Bol. Soc. Quim. Peru* **1983**, *49*, 180-183.
- [332] E. Medina, G. Spiteller, Über Inhaltstoffe von *Melochia pyramidata* L., *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 538-545.
- [333] G. Spiteller, Notiz zur Nomenklatur von Alkaloiden aus *Melochia pyramidata* L., *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 2096.
- [334] G.J. Kapadia, B.D. Paul, J.V. Silvertown, H.M. Fales, E.A. Sokolowski, Melochinone, a novel Quinolinone from *Melochia tomentosa* L., *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6814-6819.
- [335] G.J. Kapadia, Y.N. Shukla, S.P. Basak, H.M. Fales, E.A. Sokolowski, Melovinone, an open Chain Analogue of Melochinone from *Melochia tomentosa*, *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1444-1445.
- [336] R. Tschesche, I. Reutel, Über Peptidalkaloide aus *Melochia corchorifolia*, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *35*, 3817-3818.
- [337] G.J. Kapadia, Y.N. Shukla, J.F. Morton, H.A. Lloyds, New Cyclopeptide Alkaloids from *Melochia tomentosa*, *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1431-1433.
- [338] R.S. Bhakuni, Y.N. Shukla, R.S. Thakur, Cyclopeptide Alkaloids from *Melochia corchorifolia*, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 324-325.
- [339] R.S. Bhakuni, Y.N. Shukla, R.S. Thakur, Phytoconstituents of *Melochia* Species: A Review, *Indian Drugs* **1992**, *29*, 292-298.
- [340] M. Yasue, N. Kawamura, Structure of Innovanamine, *Chem. Pharm. Bull.* **1966**, *14*, 1443-1444.
- [341] F. Moll, Fortschritte auf dem Gebiet der Pyridin- und Piperidin-Alkaloide, *Dtsch. Apoth.-Ztg.* **1967**, *107*, 784-788.
- [342] Q. Khuong-Huu, G. Ratle, X. Monseur, R. Gouterel, Nouveaux Alkaloides du *Prosopis africana* (Guill. et Perr.) Taub.: Isoprosopines A et B, Prosophylline, Prosafrine et Prosafrinine, *Bull. Soc. Chim. Belges* **1972**, *81*, 443-458.
- [343] Q. Khuong-Huu, G. Ratle, X. Monseur, R. Gouterel, Structures de la Prosopine et de la Prosopinine, Alkaloides du *Prosopis africana* (Guill. et Perr.) Taub., *Bull. Soc. Chim. Belges* **1972**, *81*, 425-442.
- [344] K. Jewers, M.J. Nagler, K.A. Zirvi, F. Amir, Lipids, Sterols, and a Piperidine Alkaloid

- from *Prosopis spicigera* Leaves, *Phytochemistry* **1976**, *15*, 238-240.
- [345] V.S. Bolzani, A.A.L. Gunatilaka, D.G.I. Kingston, Bioactive and other Piperidine Alkaloids from *Cassia leptophylla*, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5929-5934.
- [346] J. Bruneton, A. Cavé, Cryptophorine et Cryptophorinine nouveaux Alcaloïdes Pipéridiniques isolés du *Bathiorhamnus cryptophorus*, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *10*, 739-742.
- [347] R.J. Highet, Cassine, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 471-474.
- [348] R.J. Highet, P.F. Highet, The Side Chain of Cassine, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1275-1276.
- [349] W.Y. Rice, J.L. Coke, Cassine, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1010-1012.
- [350] I. Christofidis, A. Welter, J. Jadot, Spectaline and Iso-6 cassine, two new Piperidine 3-ol Alkaloids from the Leaves of *Cassia spectabilis*, *Tetrahedron* **1977**, *33*, 977-979.
- [351] D. Lythgoe, A. Busch, N. Schvarzberg, M.J. Vernengo, Minor Alkaloids from *Cassia carnaval*, *Anales Asoc. Quim. Argentina* **1972**, *60*, 317-321.
- [352] D. Lythgoe, M.J. Vernengo, Alkaloids from *Cassia carnaval* Speg.: Cassine and Carnavoline, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *12*, 1133-1137.
- [353] I. Christofidis, A. Welter, J. Jadot, Spectaline and Iso-6-carnavoline, two unprecedented Piperidine Alkaloids from the Seeds of *Cassia spectabilis*, *Tetrahedron* **1977**, *33*, 3005-3006.
- [354] N.B. Mulchandani, S.A. Hassarajani, Cassinicine, a new Alkaloid and Anthraquinones from *Cassia spectabilis* and their biogenetic Relationship, *Planta Med.* **1977**, *32*, 357-361.
- [355] E. Medina, G. Spiteller, Korrelation von Melochinin mit Cassin, *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 814-817.
- [356] E.H. Garcia, A.C. Cahanap, M.P. Carbera, Organoleptic and chemical Properties of Philippine Fruit Wines, *Philipp. J. Plant Ind.* **1974**, *39*, 25-36.
- [357] J.D. Burkill, *A Dictionary of Economic Products of the Malay Peninsula*, Art Printing Works, Kuala Lumpur, **1966**.
- [358] E. Quisumbing, *Medicinal Plants of the Philippines*, Katha Publishing Co., Quezon, **1978**.
- [359] B.S. Aswal, D.S. Bhakuni, A.K. Goel, K. Kar, B.N. Mehrotra, Screening of Indian Plants for biological Activity, *Ind. J. Exp. Biol.* **1984**, *22*, 487-504.
- [360] <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/>, dann CropINDEX, 02.11.2000.
- [361] <http://www.herbweb.com>, 18.10.2000.
- [362] P. Hoffmann, The Genus *Antidesma* (Euphorbiaceae) in Madagascar and the Comoro Islands, *Kew Bull.* **1999**, *54*, 877-885.
- [363] N. Stäuble, Étude Éthnobotanique des Euphorbiacées d'Afrique de l'Ouest, *J. Ethnopharmacol.* **1986**, *16*, 23-103.
- [364] S.C. Chhabra, F.C. Uiso, E.N. Mshiu, Phytochemical Screening of Tanzanian Medicinal Plants I., *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *11*, 157-179.
- [365] I. Disengomoka, P. Delaveau, K. Sengele, Medicinal Plants used for Child's Respiratory Diseases in Zaire, *J. Ethnopharmacol.* **1983**, *8*, 257-263.
- [366] I. Disengomoka, P. Delaveau, K. Sengele, Medicinal Plants used for Child's Respiratory Diseases in Zaire, *J. Ethnopharmacol.* **1983**, *8*, 265-277.
- [367] H.K. Hoppe, *Drogenkunde*, Walter de Gruyter, Berlin, **1975**, *Bd. 1*, S. 93.
- [368] T. Murashige, F. Skoog, A revised Medium for rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473-497.
- [369] W.C. Anderson, A revised Tissue Culture Medium for Shoot Multiplication of *Rhododendron*,

- J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1984**, *109*, 343-347.
- [370] G. Lloyd, B.H. McCown, Commercially feasible Micropropagation of the Mountain Laurel, *Kalmia latifolia* Linn. by using Shoot-Tip Culture, *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* **1981**, *30*, 421-427.
- [371] P.G. Jones, J.M. Sutton, Transformation of *Agrobacterium* by High-Voltage Electroporation in *Plant Molecular Biology in Essential Techniques Series* (Hrsg.: D. Rickwood), John Wiley & Sons, Chichester, **1997**, S. 162.
- [372] J. Flügge, *Grundlagen der Polarimetrie*, Bd. 88, Zeiss, Oberkochen/Württ., **1965**, S. 62.
- [373] J. Bertram, Chemische Nachweise in *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis* (Hrsg. E. Nürnberg, P. Sturmman), 5. Auflage, Bd. 2, Springer, Berlin, **1991**, S. 143.
- [374] G. Bringmann, F. Teltschik, M. Schäffer, R. Haller, S. Bär, M.A. Robertson, M. Isahakia, Ancistrobertsonine A and related Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus robertsoniorum*, *Phytochemistry* **1998**, *47*, 31-35.
- [375] W. Gottwald, *RP-HPLC für Anwender* (Hrsg.: U. Gruber, W. Klein), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1993**.
- [376] V.R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main, **1992**.
- [377] F. Bärlocher, *Biostatistik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1999**.
- [378] J.C. Fry, One-way analysis of variance in biological data analysis in *Biological Data Analysis* (Hrsg.: J.C. Fry), IRL Press, Oxford, **1994**, 3-39.
- [379] M. Lavault, Contribution a l'Étude chimique des Dioncophyllacees, *Thèse, Université Angers*, **1979**.
- [380] I. Kubo, M. Taniguchi, A. Chapya, K. Tsujimoto, An Insect Antifeedant and Antimicrobial Agent from *Plumbago capensis*, *Planta Med.* **1980**, (Suppl.), 185-187.
- [381] E. Miyoshi, Y. Shizuri, S. Yamamura, Isolation and Structures of Diomuscine and Diomuscipulone from *Dionaea*, *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2385-2387.
- [382] A. Buske, J. Schmidt, A. Porzel, G. Adam, Alkaloidal, Megastigmane and Lignan Glucosides from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae), *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3537-3543.
- [383] <http://www.nybg.org/bsci/ih/ih.html>, 28.11.2001.
- [384] F. Teltschik, Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen tropischer Heilpflanzen und Etablierung neuer Methoden zur Isolierung von Naturstoffen, *Dissertation, Universität Würzburg*, **1999**.
- [385] M. Rübenacker, Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Naphthylisoquinolin-Alkaloiden aus *Triphyophyllum peltatum*, *Dissertation, Universität Würzburg*, **1991**.



## DANK

Die vorliegende Arbeit konnte nur mit der Unterstützung und Hilfe vieler Beteiligter entstehen. Im folgenden möchte ich in willkürlicher Reihenfolge und ohne Anspruch auf Vollständigkeit namentlich einige Personen hervorheben.

- Zunächst danke ich Michael Wohlfarth und Dr. Jan Schlauer für die sehr gute Zusammenarbeit während der letzten Jahre. Die Biosyntheseuntersuchungen konnten nur in diesem interdisziplinären Dreierteam erfolgreich durchgeführt werden.
- Dr. Kristina Wolf und Michael Wohlfarth danke ich für die genügsame Begleitung jeweils einer Expedition nach Thailand und Malaysia. Zum Gelingen der ersten Reise trug außerdem Andrew Hurrell maßgeblich bei.
- Dr. Michael Ochse und Kim Messer sei für die Bereitstellung von isolierten Referenzsubstanzen gedankt. Andreas Hamm danke ich für die Zusammenarbeit beim *Nepenthes*-Projekt.
- Herrn F. Thiele und Herrn A. Kreiner möchte ich ausdrücklich für ihren Einsatz bei der Kultur der empfindlichen Pflanzen im Gewächshaus sowie die stete Gesprächsbereitschaft danken. Herrn M. Kammerlander danke ich für die Durchführung der Pfropfversuche.
- Den technischen Assistentinnen Manuela Michel, Heike Endreß und Petra Henschel danke ich für die Betreuung der Erhaltungskulturen von *A. heyneanus*.
- Dr. Jan Schlauer, Dr. Doris Feineis und Siegfried und Franziska Keppler danke ich für das Korrekturlesen verschiedener Versionen dieser Arbeit. Eventuell verbliebene Restfehler habe ich selbst zu verantworten.
- Die Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern aus verschiedenen Erdteilen war immer wieder besonders motivierend. Im Inland möchte ich Prof. Dr. G. Heubl und Harald Meimberg sowie Prof. Dr. G. Adam und Dr. Alexander Buske danken. Dr. W. Federle sei für die Bestimmung der gesammelten Ameisen gedankt. In Malaysia wurde ich von Prof. Dr. A. Hamid A. Hadi und seinen Mitarbeitern herzlich empfangen und bei der Arbeit unterstützt. Von Prof. Dr. Virima Mudogo wurden in der Republik Kongo und von Prof. Dr. L. Aké Assi in der Elfenbeinküste in unwirtlichen Gegenden Pflanzen gesammelt und an uns geliefert.
- Dem ganzen AK Bringmann sei für die vielfältige fachliche Unterstützung und die vielen Feierabendbiere in gemütlicher Runde gedankt.
- Nicht zuletzt danke ich meiner Frau Kristine für ihre Geduld und die Unterstützung meiner Arbeit.



## LEBENS LAUF

<b>Persönliche Daten</b>	Heiko Michael Rischer Sohn von Kurt Rischer und Brigitte Rischer, geb. Schuon geb. am 26.02.1969 in Sindelfingen verheiratet
<b>Schul Ausbildung</b>	
1975-1979	Johannes-Kepler-Schule in Magstadt
1979-1989	Gymnasium Unterrieden in Sindelfingen
<b>Wehrdienst</b>	
06/89-08/90	Grundwehrdienst bei der Luftwaffe in Mengen und Landsberg a.L.
<b>Berufsausbildung</b>	
09/90-06/92	Ausbildung zum staatlich geprüften chemisch-technischen Assistenten am Berufskolleg Chemisches Institut Dr. Flad, Stuttgart
<b>Hochschulausbildung</b>	
10/92	Immatrikulation an der Universität Hohenheim für das Fach Biologie (Diplom)
08/95	Diplom-Vorprüfung
04/98	Abschluß des Biologiestudiums mit der extern unter Anleitung von Prof. Dr. G. Bringmann durchgeführten Diplomarbeit “Sekundärmetabolismus von Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> ”
05/98	Beginn der vorliegenden Arbeit
seit 05/98	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg und im Sonderforschungsbereich 251 “Ökologie, Physiologie und Biochemie pflanzlicher und tierischer Leistung unter Streß”
07/98-06/00	Stipendium der Max-Buchner Forschungsstiftung
02-03/99 und 03-04/00	Forschungsaufenthalte in Malaysia und Thailand

Würzburg, den



## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die Dissertation „Acetogenine Sekundärmetabolite und ihre Produzenten: Physiologie und Botanik ausgewählter Vertreter der Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae und Nepenthaceae sowie von *Antidesma* (Euphorbiaceae)“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den



