

Dihydroxybenzene - eine neue Generation von Herbiziden?

David Sauer (17, Rheinland-Pfalz)
Life-Science-Lab Heidelberg, Gymnasium am Kaiserdom Speyer

Kurzfassung

Herbizide sind für die Landwirtschaft unerlässlich, da eine immer weiterwachsende Weltbevölkerung mit Nahrung versorgt werden muss. Allerdings führt die Nutzung von Herbiziden zu Umwelt- und Gesundheitsschäden sowie Resistzenzen. Daher sind Herbizide mit neuen Wirkungsweisen vonnöten. In einem vorhergehenden Projekt fand ich heraus, dass Brennnesseljauche herbizid wirksam ist. Um den ursächlichen Mechanismus näher zu beleuchten, ermittelte ich in diesem Projekt die Zusammensetzung der Brennnesseljauche mittels chemischer Analytik. Die Hauptkomponenten waren Catechol, Phloretinsäure und Dihydrokaffeesäure. Eine herbizide Wirkung der Derivate Catechol, Hydrochinon und Resorcinol (Dihydroxybenzene - DHB) konnte ich nachweisen. Bei der Untersuchung der Wirkmechanismen und Interaktionen zeigte sich, dass DHB Trockenstress in den Pflanzen auslösen. Meine vorläufigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein potentiell neuer Wirkmechanismus den Beobachtungen zugrunde liegt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Methoden	2
2.1 Materialien	2
2.2 Zubereitung der Brennnesseljauche	2
2.3 Chemische Analytik der Brennnesseljauche	3
2.3.1 Probenaufbereitung	3
2.3.2 HPLC/MS	3
2.3.3 Aufreinigung und nukleare Magnetresonanzspektroskopie	3
2.4 Spektrophotometrie	3
2.5 Untersuchung der herbiziden Wirksamkeit	4
2.5.1 Screening der Derivate	4
2.5.2 Überlebensraten von <i>A. thaliana</i>	4
2.5.3 Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Verhältnisse	5
2.5.4 Bestimmung des relativen Wassergehalts	5
2.5.5 Untersuchung von möglichen Synergismen	6
2.6 Statistische Auswertung	6
2.6.1 Hill-Modell	7
2.6.2 Statistische Analyse von Synergismen	7
3 Ergebnisse	8
3.1 Chemische Analytik	8
3.1.1 HPLC/MS	8
3.1.2 Nukleare Magentresonanzspektroskopie	8
3.2 Screening der Derivate	8
3.3 Überlebensraten von <i>A. thaliana</i>	9
3.4 Dosis-Wirkungs-Verhältnisse	9
3.5 Synergismen	10
3.6 Bestimmung des relativen Wassergehalts	10
3.7 Spektrophotometrie	11
4 Ergebnisdiskussion	12
4.1 Bedeutung und mögliche Anwendungen	15
5 Zusammenfassung	15
6 Danksagungen	16
Literatur	16

1 Einleitung

Herbizide sind für die industrielle Landwirtschaft von herausragender Bedeutung. Ihre Nutzung erhöht den Ertrag um bis zu 30 % [1]. Für die Zukunft sind Herbizide auch weiterhin unerlässlich, da die industrielle Landwirtschaft die immer weiter wachsende Weltbevölkerung versorgen muss [2]. Allerdings stellt diese intensive Nutzung von Herbiziden uns vor einige Herausforderungen. Zunächst ist aus dem öffentlichen Diskurs der letzten Jahre bekannt, dass die Nutzung einiger Herbizide durch Rückstände und Persistenz in der Umwelt womöglich zu gesundheitlichen Schäden bei Menschen und Tieren führen kann [3, 4]. Weiter hat die Nutzung von Herbiziden schwere Auswirkungen auf Ökosysteme. Herbizide wirken oft neben ihrem eigentlichen Wirkungsbereich weiter und stören so durch das Töten von Flora und Fauna auch andere Biotope. Es wird auch von Auswirkungen auf die Mikroflora der Böden berichtet [5], was das Ökosystem nachhaltig stören kann. Neben all diesen ökologischen Bedenken gibt es auch aus ökonomischer Sicht große Probleme bei Resistenzbildungen. Da Herbizide in den letzten Jahren in sehr großen Mengen eingesetzt werden und auch immer wieder die selben Herbizide verwendet werden, bilden sich sogenannte Superweeds [6]. Diese können nicht oder nur mit für die Umwelt sehr schädlichen Herbiziden bekämpft werden. Die Problematik wird durch den Fakt, dass in den letzten Jahrzehnten keine neuen bedeutsamen Herbizide entwickelt wurden, weiter verstärkt [7, 8]. Daher ist es nötig, Forschung an neuen Herbiziden mit neuen Wirkmechanismen und Methoden zur Reduktion der nötigen Dosis an Herbiziden zu betreiben. Genau dies ist Bestandteil meiner Arbeit.

In meinem Schüler-experimentieren-Projekt 2016 untersuchte ich aus einer ähnlichen Motivation die herbizide Wirkung des Naturmittels Brennnesseljauche. Ich untersuchte außerdem welchen Effekt Malonsäure als bekanntes Cytotoxikum auf Pflanzen hat. Dabei zeigten sich zwei spannende Ergebnisse: Zum Einen wirkte die Malonsäure in Konzentrationen von 30 g L^{-1} innerhalb von sieben Tagen auf alle Pflanzen (*Poa annua*) giftig. Zum Anderen beobachtete ich zwischen Malonsäure und Brennnesseljauche additive Effekte. Eine genaue Beurteilung, ob der Effekt hyperadditiv, also synergistisch ist, war aufgrund des gewählten Versuchaufbaus nicht möglich. Zuletzt stellte ich unter denselben Bedingungen fest, dass die flüssige Phase der Brennnesseljauche bis zu 40 % der Pflanzen tötete. Ich schlussfolgerte also, dass in ihr womöglich Stoffe enthalten sind, die potentielle Kandidaten für die Suche nach neuen Wirkstoffen für Herbizide sein könnten. Daher entschloss ich mich, in diesem Folgeprojekt diese herbizid wirksamen Stoffe näher

zu betrachten.

Um die Bestandteile der Brennnesseljauche zu identifizieren und zu charakterisieren, untersuchte ich zunächst die chemische Zusammensetzung der Brennnesseljauche und identifizierte so drei Hauptkomponenten. Die herbizide Wirkung dieser Komponenten und ihrer Derivate testete ich im Anschluss. So ermittelte ich, dass die Brennnesseljauche mit Catechol einen Stoff enthält, der eine herbizide Wirkung zeigt und dessen Isomere (Resorcinol und Hydrochinon) ebenfalls herbizid wirksam sind. Bei diesen drei Isomeren (Catechol, Resorcinol und Hydrochinon) handelt es sich um die drei Dihydroxybenzene (DHB). Diese stellen einen möglichen neuen herbiziden Wirkstoff dar. Für Catechol wurde dieses Potential auch bereits von Topal *et al.* (2006) beschrieben [9]. Allerdings sind die DHB für den Menschen gesundheitlich bedenklich und in Teilen auch für die Umwelt schädlich [10, 11, 12, 13]. Auch wenn es in epidemiologischen Studien noch keine Hinweise hierfür gab, zeigen einige DHB in Mausstudien ein karzinogenes Potential [10].

Ich entschloss mich dennoch aus drei Gründen die herbizide Wirkung der DHB näher zu untersuchen. Erstens halte ich es für möglich, dass die herbizide Wirkung auf einem neuartigen Wirkmechanismus basiert, der bisher in Herbiziden noch nicht genutzt wurde. Dann wäre es möglich, strukturverwandte Stoffe auf Basis des Wirkungswegs zu identifizieren, die auch so wirken, aber nicht die negativen Eigenschaften der DHB teilen. Zweitens besitzen nicht alle DHB diese negativen Eigenschaften und womöglich stellt niederkonzentriertes Resorcinol eine wenig umwelt- und gesundheitsschädliche Option dar. Die Literatur zeigt, dass die Zugabe von Allelochemikalien zu konventionellen Herbiziden durch additive oder synergistische Effekte die benötigte Menge des konventionellen Herbizids reduziert [14, 15, 16, 17]. Da die DHB in der Literatur auch als Allelochemikalien klassifiziert werden [9, 18], ist es möglich, dass dieser Effekt auch bei der Kombination von konventionellen Herbiziden und DHB auftritt. Dies wäre insbesondere im Hinblick auf die Reduktion von Resistenzen wünschenswert und könnte auch bei niedrigen Konzentrationen von DHB eine Wirkung erzielen.

In der Literatur gibt es bereits Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der Wirkung von DHB, allerdings nur in humanen oder murinen Zellen. Hier ist mein Ziel die Wirkungsweise der DHB in Pflanzen näher zu beleuchten, insbesondere im Hinblick auf für Pflanzen spezifische Mechanismen (z.B. Phytotoxizität). Die Wirkung in humanen und murinen Zellen basiert im Grunde auf zwei Mechanismen. Es werden mit Quinonen und Semiquinonen hochreaktive Metabolite gebildet. Diese können

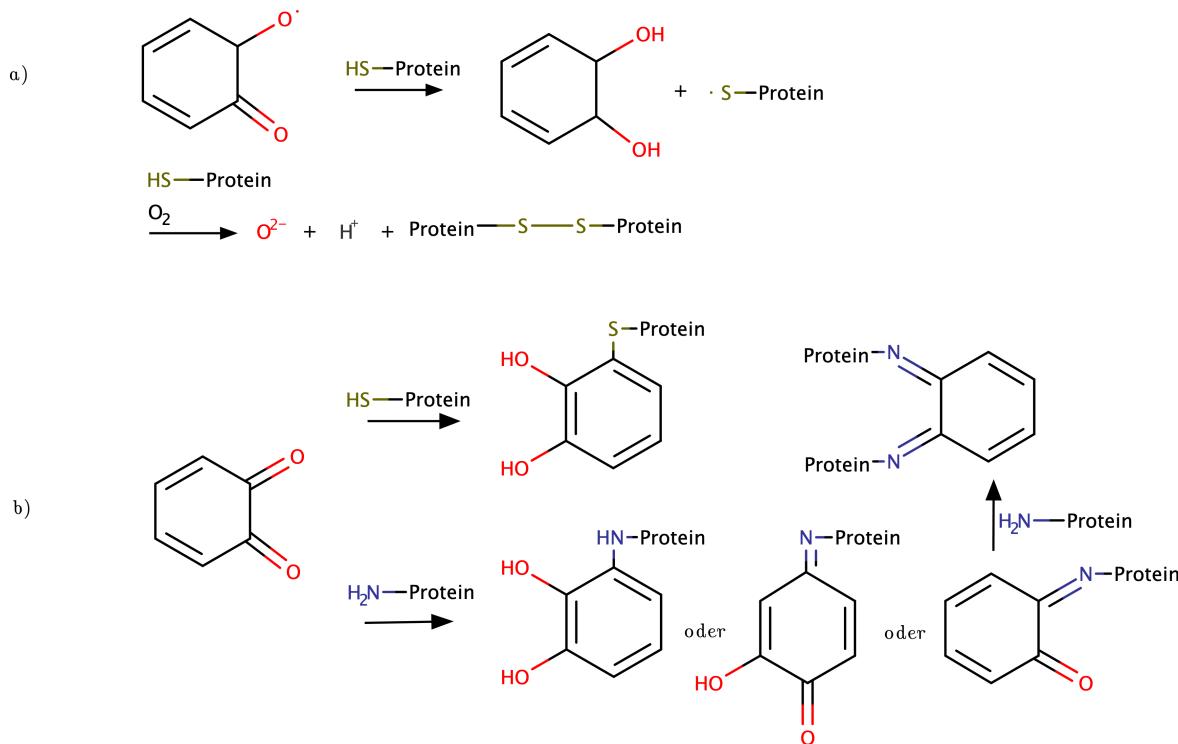


Abbildung 1: Verschiedene Mechanismen der Interaktion der DHB, bzw. derer Metabolite (Semiquinone und Quinone) mit Sulfhydrylgruppen oder Aminresten von Proteinen, die zu Crosslinking (a) oder zur Bildung von Addukten (b) führen können. Basierend auf den von Stoyanovsky *et al.* (1995), Bolt und Kappus (1974) und Gottlieb und Wurzel (1974) beschriebenen Mechanismen [25, 26, 27].

DNA-Addukte bilden und führen durch die Depletion von Glutathion (GSH) zu oxidativem Stress. Außerdem können die DHB mit freien Sulfhydrylgruppen oder Stickstoffgruppen von Proteinen reagieren und so Addukte bilden oder zu Crosslinking innerhalb der Proteine führen [19, 20, 21, 22, 23, 24]. (Abbildung 1)

Zusammenfassend ist Ziel dieses Projekts die Untersuchung von drei Fragestellungen. Was ist die chemische Komposition der Brennnesseljauche, wie sind die DHB herbizid wirksam und was ist der Wirkmechanismus der DHB?

2 Methoden

Diese Arbeit baut auf meinem vorherigen Projekt auf. Während die bisherigen Versuche größtenteils an *Poa annua*, eine der am weitesten verbreiteten Unkrautarten, durchgeführt wurden, wechselte ich zu *Lepidium sativum*, da aufgrund der geringeren Keimungsdauer und der höheren Sensitivität die Durchführung der Versuche vereinfacht wurde. Wichtige Ergebnisse wurden aber immer auch mit *P. annua* qualitativ bestätigt, insofern der jeweilige Versuchsaufbau dies zugelassen hat. Genaue quantitative Unterschiede der Wirkung zwischen diesen beiden Arten oder auch zur Wirkung an *Arabidopsis*

thaliana habe ich bisher nie durchgeführt, da es nie die Situation gab, dass ein Effekt bei einer Art überhaupt nicht beobachtet werden konnte. Stattdessen habe ich zusätzlich an *A. thaliana* die Überlebensrate untersucht.

2.1 Materialien

Malonsäure wurde von Subolab (Pfinztal-Söllingen) bezogen. Catechol, Resorcinol, Phloretinsäure, Kaffeesäure, Hydrochinon, Protocatechusäure, Ferulasäure, Natriumcinnamat und Tropasäure wurden von Sigma Aldrich (Darmstadt) bezogen.

2.2 Zubereitung der Brennnesseljauche

Zur Herstellung der Brennnesseljauche wurde 1 kg getrocknete Brennnesseln mit 8 L Leitungswasser für 14 Tage bei 28 °C inkubiert. Das Gemisch wurde täglich für 5 Minuten gerührt, um dem Gemisch Sauerstoff zuzuführen. Nach 8 Tagen Inkubation wurden nochmals 2 L hinzugegeben. Nach der erfolgten Inkubation wurde die Jauche durch ein Baumwolltuch abgesieht, um grobe Schwebstoffe und Reste der Brennnesseln zu entfernen. Nach der Zubereitung wurde die Brennnesseljauche bei einer Temperatur von 4 °C lichtgeschützt gelagert.

2.3 Chemische Analytik der Brennnesseljauche

Für die weiteren Versuche war es erforderlich, dass ich die Inhaltsstoffe der Brennnesseljauche identifizierte und charakterisiere. Als Erstes führte ich testweise eine wie in Abschnitt 2.3.1 und 2.3.2 beschriebene HPLC durch, um einen Überblick über alle enthaltenen Stoffe zu bekommen. (Daten nicht gezeigt) Hier hatte sich bereits die Polarität und somit auch Retentionszeit der Hauptkomponenten abschätzen lassen. Daraufhin bestimmte ich die genauen Hauptkomponenten in den aufgereinigten Proben der Brennnesseljauche mittels einer erneuten HPLC/MS. Anschließend reinigte ich die einzelnen Fraktionen der Brennnesseljauche mittels einer Säulenchromatografie auf. Die Strukturen der Inhaltsstoffe der Fraktionen bestätigte ich dann mit einer *nuclear magnetic resonance spectroscopy* (NMR). Im Folgenden wird die genaue Durchführung der einzelnen Verfahren und ihre allgemeine Funktionsweise näher erläutert.

2.3.1 Probenaufbereitung

Zunächst wurde die durch Zentrifugieren (5000 rpm, 5 Minuten) gewonnene flüssige Phase gefriergetrocknet. Das hier gewonnene Lipophilisat wurde in Methanol gelöst ($\beta = 50 \frac{mg}{mL}$). Um die Inhaltsstoffe nach der Polarität getrennt zu untersuchen, wurde diese Lösung erneut zentrifugiert (13000 rpm, 5 Minuten). Der so gewonnene Überstand wurde nun als Probe für die Analyse der polaren Inhaltsstoffe genutzt. Für die Analyse der unpolaren Inhaltsstoffe wurde das Pellet in DMSO gelöst und der nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 5 Minuten) gewonnene Überstand genutzt.

2.3.2 HPLC/MS

Als ersten Schritt innerhalb der chemischen Analytik wollte ich einen Überblick über die Inhaltsstoffe meiner Proben gewinnen. Hierzu setzte ich die *high performance liquid chromatography* (HPLC) mit gekoppelter Massenspektrometrie (MS) ein. Bei der HPLC setzte ich eine reverse phase (C18) ein, da die eine Probe polar war und ich bei der anderen Probe auch nicht ausschließen konnte, dass noch Reste von polarem Lösungsmittel enthalten waren. Um dennoch sowohl polare als auch apolare Stoffe eluieren zu können, wurde als mobile Phase ein Acetonitril-Methanol-Gradient eingesetzt. So mit wurden schrittweise die Stoffe nach ihrer Polarität eluiert.

Bei der Durchführung wurden jeweils $10 \mu L$ in die HPLC (Hewlett-Packard 1090 LC) eingespritzt. Vor der MS (Agilent Technologies LC/MSD SL) befand sich in der HPLC noch ein UV/VIS-Sensor, der neben der Elutionszeit weitere Daten zur Identifizierung der Stoffe lieferte.

2.3.3 Aufreinigung und nukleare Magnetresonanzspektroskopie

Um die mittels der HPLC/MS gewonnenen Erkenntnisse über die Hauptinhaltsstoffe zu bestätigen, wurden die Fraktionen nochmals aus der Brennnesseljauche isoliert und anschließend die Struktur mittels einer NMR bestätigt. Zur Isolation der Fraktionen wurde anstatt der üblichen semi-präparativen HPLC eine Säulenchromatografie genutzt, da die einzelnen Peaks weit genug voneinander lagen, um die Fraktionentrennung von Hand vorzunehmen. Als stationäre Phase wurde Silicat gewählt. Die mobile Phase bestand aus einem Dichlormethan-Methanol-Gradienten, sodass direkt die bei der Probenaufbereitung gewonnene Methanollösung genutzt werden konnte. Im Anschluss wurde in einer erneuten HPLC nochmals bestätigt, dass die aufgefangenen Fraktionen die selben Stoffe beinhalteten, die bei der ursprünglichen HPLC gefunden wurden. Danach wurde jede Fraktion in der NMR mittels der Methoden Proton, APT (attached proton test), gCOSY (gradient selected correlation spectroscopy) und HSQC (heteronuclear single quantum coherence) untersucht. Proton ist eine NMR-Methode, die für 1H spezifisch ist, während APT für ^{13}C spezifisch ist und erlaubt zwischen sekundären oder quartärem und primären oder tertiären Kohlenstoffen zu unterscheiden. Hier wurden Frequenzen von 300 MHz (Proton), bzw. 75 MHz (APT) eingesetzt. gCOSY hilft dabei zuzuordnen welche Signale von benachbarten Protonen stammen. HSQC ermöglicht es die Kopplung zwischen einem Proton und einem Heteronukleus (z.B. ^{13}C) zu messen und vereinfacht so die Bestimmung komplexerer Molekülstrukturen.

2.4 Spektrophotometrie

Die geplante Untersuchung des molekularen Wirkmechanismus wird an vielen Stellen ein Bestimmen der Konzentration von DHB auch in Pflanzenproben erfordern. Aus Kostengründen plane ich hier spektrophotometrische Assays einzusetzen. Als Grundlage hierfür bestimmte ich die Standardkurven der DHB. Ich maß zunächst die Spektrogramme der DHB und untersuchte anschließend, ob die Stoffe dem Lambert-Beerschen-Gesetz folgen.

Hierzu setzte ich eine Verdünnungsreihe der Dihydroxybenzene von $10 \mu M$ bis $60 \mu M$ in Zehnerschritten an, da sich die Absorption in diesem Bereich im linearen Bereich des Spektrophotometers befand. Die Absorption wurde jeweils an den im Spektrogramm bestimmten Maxima gemessen. Da die Peaks im UV-Spektrum lagen, wurden Quartz-Küvetten verwendet.

2.5 Untersuchung der herbiziden Wirksamkeit

In der Landwirtschaft gibt es zahlreiche Applikationsverfahren und Anwendungsfälle für Herbizide [1]. Daher gibt es auch keine einzelne Metrik, die zur Bestimmung der herbiziden Wirksamkeit genutzt werden kann. In den Versuchen wurde daher die jeweils passendste Metrik gewählt. So ist nicht eine umfassende Beurteilung der herbiziden Wirksamkeit möglich, diese ist allerdings für die Untersuchung des Wirkungswegs nicht relevant, sondern nur für die finale Optimierung einer möglichen herbiziden Mischung für den Einsatz.

Bei allen Versuchen im Gewächshaus wurden die Pflanzen unter Kurztagbelichtung angepflanzt. Die Pflanzen wurden bis zur Behandlung regelmäßig gegossen. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Pflanzen immer für zwei Tage nicht gegossen, um eine Beeinflussung der Wirkung zu verhindern, im Anschluss wurden alle Pflanzen wieder regelmäßig gegossen.

2.5.1 Screening der Derivate

Nachdem die Hauptkomponenten der Brennnesseljauche identifiziert wurden, wollte ich überprüfen, welche der Hauptkomponenten, bzw. ob überhaupt Hauptkomponenten, eine herbizide Wirkung zeigen. Weiter wollte ich durch das Screening von einigen Derivaten untersuchen, ob die herbizide Wirkung der Hauptkomponenten auf bestimmte Struktur motive zurückzuführen ist und die Verwendung eines Derivats zu einer signifikant besseren Wirkung führt.

Bei der Auswahl der Derivate musste ich mich allerdings einschränken, da ansonsten die Anzahl der durchzuführenden Versuche zu groß geworden wäre. Unter anderem schränkte ich mich dahingehend ein Substanzen, die als Metabolit eines anderen Derivats auftauchen nur aus besonderen Gründen (z.B. bereits in Literatur beschrieben) zu untersuchen. Ich entschied mich daher neben den identifizierten Hauptkomponenten Catechol (100 mM), Phloretinsäure (10 mM) und Kaffeesäure (10 mM), auch Natriumcinnamat (1 mM), Ferulasäure (10 mM), Tropasäure (100 mM), Resorcinol (100 mM), Hydrochinon (100 mM) und Protocatechusäure (100 mM) auf ihre herbizide Wirkung zu untersuchen (Abbildung 2). Unter diesen Stoffen wurden neben Catechol bisher meiner Kenntnis nach ausschließlich Ferulasäure, Kaffeesäure und Zimtsäure explizit auf ihre herbizide Wirkung hin untersucht. [28, 29, 30] Allerdings wurden zum Beispiel Kaffeesäure und Zimtsäure bereits von Putnam als potentiell herbizid wirksam beschrieben. [14] Als Negativkontrolle wurden die Pflanzen mit Leitungswasser behandelt. Basierend auf der Löslichkeit der Stoffe und Vor-

versuchen (Daten nicht gezeigt), entschied ich mich die oben genannten Konzentrationen zu nutzen.

Da das Ziel des Experiments darin bestand, zu überprüfen, ob die Stoffe überhaupt eine herbizide Wirkung haben und ich davon ausging, dass dies nur bei einigen Stoffen der Fall sein würde, wählte ich eine sehr sensitive Metrik, nämlich die Keimungsrate bei *L. sativum*. Hierzu wurden jeweils ungefähr 20 Samen in Töpfe ausgesät. Im Anschluss wurden mittels einer Spritze 3 mL der jeweiligen Lösung gleichmäßig auf der Erde verteilt. Nach einem und nach sechs Tagen wurde die Anzahl der gekeimten Pflanzen, als die Zahl der Samen, bei denen das Keimblatt sichtbar war, bestimmt. Die Metrik der Keimungsrate berechnet sich als der Quotient von gekeimten und ausgesäten Pflanzen. Für das Experiment wurden Quadruplikate verwendet.

Für die statistischen Auswertungen wurde jeweils der Durchschnitt der Keimungsraten mit dem der Kontrolle mittels des Welsh's-Test, da die verschiedenen Gruppen nicht dieselbe Varianz zeigten, verglichen.

2.5.2 Überlebensraten von *A. thaliana*

Nachdem die wirksamen Stoffe für meine weiteren Experimente identifiziert waren, entschied ich mich auch zu untersuchen, ob sie auch die Überlebensraten von *A. thaliana* reduzieren würden. So bestand die Möglichkeit das breite Wirksamkeitsspektrum meiner Wirkstoffe darzustellen.

Es wurden Lösungen von Catechol (90 mM), Resorcinol (120 mM), Tropasäure (50 mM und Hydrochinon (120 mM) untersucht. Als Negativkontrolle diente Wasser. Die Konzentrationen wurden auf Basis von Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) ausgewählt. Die Pflanzen wurden zunächst für vier Wochen angezogen, da *A. thaliana* in diesem Entwicklungsstadium am besten für physiologische Untersuchungen geeignet ist. Im Rahmen dessen wurden die Pflanzen in der zweiten Woche nach der Aussaat pikiert. Hierbei wurden in jeden Topf zwischen 8 und 12 Pflanzen pikiert. Es wurden jeweils Quadruplikate untersucht. Nach der Anzucht wurden die Pflanzen behandelt. Hierzu wurden analog zu den vorherigen Versuchen (Kapitel 2.5.1) 3 mL der Lösungen aufgetragen. Nach zwei und sieben Tagen wurde anhand von fotografischen Aufnahmen die Anzahl an lebenden und an toten Pflanzen bestimmt. Die Überlebensrate ergab sich als der Quotient aus der Anzahl der toten Pflanzen und der absoluten Anzahl an Pflanzen.

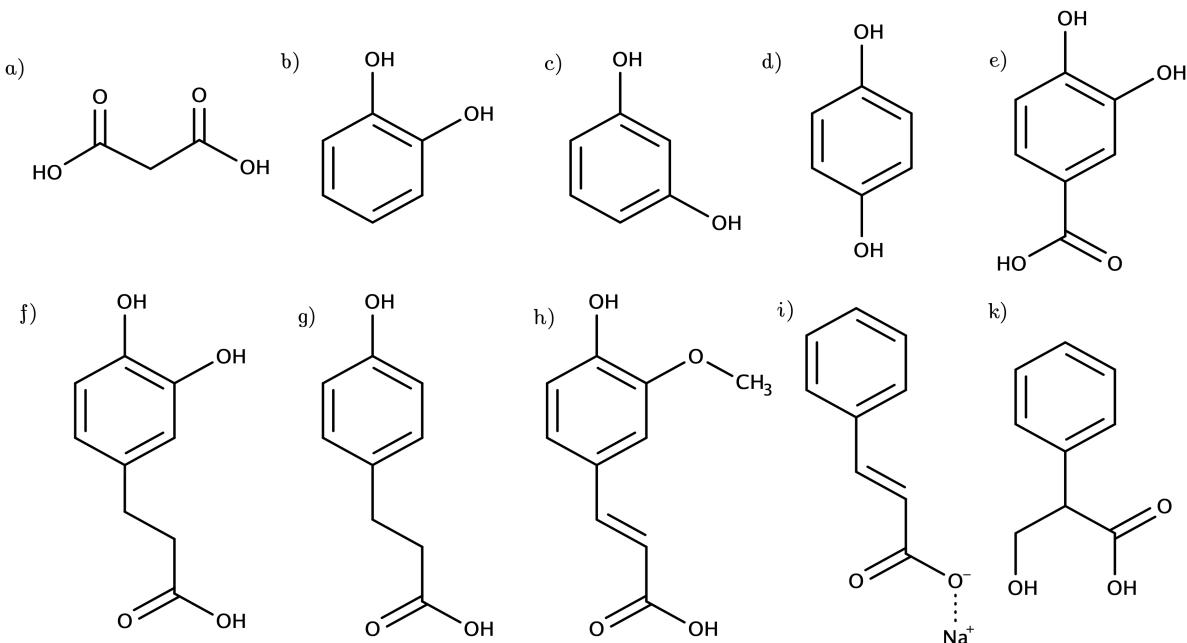


Abbildung 2: Strukturformeln der Derivate, Hauptkomponenten und Malonsäure. a) Malonsäure, b) Catechol, c) Resorcinol, d) Hydrochinon, e) Protocatechusäure, f) Dihydrokaffeesäure, g) Pholretinsäure, h) Ferulasäure, i) Natriumcinnamat, k) Tropasäure

2.5.3 Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Verhältnisse

Nachdem klar wurde, dass ausschließlich vier Stoffe, nämlich die DHB (Catechol, Resorcinol und Hydrochinon) und Tropasäure eine statistisch signifikante Wirkung zeigten, fokussierte ich mich auf die genaue Charakterisierung der Dosis-Wirkungs-Beziehung dieser Stoffe. In dieser Charakterisierung bestimmte in diesem Experiment die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}). Die Ergebnisse dieses Experiments sollten auch als Basis für die Untersuchungen zu möglichen Synergismen dienen (siehe 2.5.5).

Als Metrik zur Untersuchung der herbiziden Wirksamkeit wurde erneut die Keimungsrate von *L. sativum* gewählt, da dies eine direkte Vergleichbarkeit zu den vorherigen Versuchen ermöglichte und erlaubte die Daten für die Untersuchung der Synergismen zu verwenden (siehe 2.5.5). Vorversuche (Daten nicht gezeigt), bestätigten, dass *L. sativum* sensitiver als *P. annua* und *A. thaliana* ist, die Stoffe aber bei allen eine Wirkung auf die Keimungsrate haben.

Von Malonsäure (Daten nicht gezeigt), untersuchte ich Konzentrationen von 10, 48, 96, 192, 288, 384 und 480 mM, von Catechol, Resorcinol und Hydrochinon Konzentrationen von 10, 30, 50, 70, 90 und 120 mM und von Tropasäure von 5, 10, 20, 30, 40 und 50 mM. Die Konzentrationslevel wurden auf Basis von Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) und dem Screening der Derivate (2.5.1) so gewählt, dass

ein Bereich zwischen einer sehr niedrigen Wirkung und einer maximalen Wirkung abgedeckt wurde.

Für jede Lösung, wurden Versuche mit Duplikaten dreimal wiederholt (d.h. insgesamt $n = 3$). Außerdem wurde die Anzahl der gekeimten Pflanzen nach sechs Tagen gezählt. Die Versuchsdurchführung erfolgte ansonsten analog zum Screening der Derivate. (siehe Kapitel 2.5.1)

2.5.4 Bestimmung des relativen Wassergehalts

Die Beobachtungen bei den vorherigen Versuchen zeigten, dass die DHB phänotypisch Trockenstress auslösen. Daher war die Absicht näher zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt nach der Applikation der Trockenstress auftritt. Als Indikator für den Trockenstress wählte ich den in der Literatur üblichen relativen Wassergehalt (RWC) [31]. Die Versuche führte ich mit *A. thaliana* durch, da für diese als Modellpflanze zahlreiche Protokolle bereits existierten. Dies war von Bedeutung, da ich plante am und vor dem Zeitpunkt, zu dem Trockenstress auftritt, auch den Glutathiongehalt in den Pflanzen zu messen, um so zu ergründen, welcher von beiden Vorgängen den anderen verursacht, bzw. ob tatsächlich eine Änderung des GSH-Gehalts auftritt. Letzten Endes wurden keine GSH-Messungen vorgenommen, da sich die bisherigen Daten zum RWC als inkonklusiv darstellten (Kapitel 3.6). Die Bestimmung des RWC erfolgte auf Basis des von Linster *et al.* (2015) beschriebenen Protokolls [32].

Es wurden Lösungen von Catechol (90 mM), Resorcinol (120 mM) und Hydrochinon (120 mM) untersucht. Als Negativkontrolle diente Wasser. Die Konzentrationen wurden auf Basis von Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) so gewählt, dass sie jeweils zu einer deutlichen Dehydrierung der Pflanzen innerhalb einer Woche führten.

Anzucht und Behandlung der Pflanzen erfolgte analog zur Untersuchung der Überlebensraten von *A. thaliana* (2.5.2). Der einzige Unterschied bestand darin, dass in jeden Topf nur zwei Pflanzen pikiert wurden und die hier beschriebenen Lösungen zur Behandlung eingesetzt wurden. Anschließend wurden nach 3, 6, 24, 27 und 30 Stunden Pflanzenproben entnommen, da die Vorversuche (Daten nicht gezeigt) zeigten, dass ein Austrocknen je nach Wirkstoff spätestens nach 3 Tagen begann und somit der dafür kausale Zeitraum abgedeckt werden konnte. Für jeden Zeitpunkt wurden Triplicate verwendet. Von der restlichen Probe wurde nun das Gewicht (FW) bestimmt. Anschließend wurden diese Proben für mindestens 12 Stunden mit destilliertem Wasser im Dunkeln rehydratiert. Dann wurde das rehydratierte Gewicht (HW) bestimmt. Nach mindestens 72 Stunden Trocknen bei 70 °C wurde das Trockengewicht bestimmt (DW). Der RWC berechnete sich als $RWC = \frac{FW - DW}{RW - DW} \times 100$.

2.5.5 Untersuchung von möglichen Synergismen

In meinem vorherigen Projekt gaben mehrere Versuche Anzeichen, dass zwischen der Brennnesseljauche und der damals als zytotoxischer Stoff hinzugegebenen Malonsäure ein Synergismus besteht. Dies erschien insbesondere angesichts der in der Einleitung beschriebenen möglichen Anwendungsmöglichkeiten von DHB als Zusätze neben konventionellen Herbiziden interessant. Aber auch Studien zur mechanistischen Wirkung von DHB auf eukaryotische Zellen zeigten Interaktionen zwischen den einzelnen DHB [33, 34]. Daher wollte ich diese Interaktionen näher untersuchen. Außerdem wurden Interaktionen zwischen herbiziden Wirkstoffen in der Literatur bereits ausführlich untersucht, weshalb eine Untersuchung auch für neue Wirkstoffe sinnvoll erscheint. [35]

Der Begriff des Synergismus ist in den Naturwissenschaften nicht einheitlich definiert. Quantitative Modelle sind häufig fehlerhaft oder zu aufwendig durch eine exponentiell steigende Zahl an nötigen Versuchen bei mehr als zwei Stoffen. Vorhergehende Probleme trafen auch auf die wenigen in der Literatur explizit für Herbizide beschriebenen Modelle zu. [36, 37] Daher entschied ich mich das von Zimmer *et al.* (2016) beschriebene Modell einzusetzen

[38] (siehe Kapitel 2.6.2). Ich entschloss mich für jede Zweierkombination der vier Stoffe fünf Kombinationen von Konzentrationen zu testen. Hierbei wählte ich jeweils eine Kombination von zwei hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationen, sowie die beiden Kombinationen einer mittleren und niedrigen Konzentration, da dies auf Basis des Reviews von Chou [39] sinnvoll schien.

Als niedrige (l), mittlere (m) und hohe (h) Konzentration wurden bei Catechol 20 mM, 50 mM und 90 mM, bei Resorcinol 20 mM, 60 mM und 120 mM, bei Hydrochinon 20 mM, 80 mM und 120 mM und bei Malonsäure 15 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ und 50 g L⁻¹ gewählt. Diese Werte basierten auf den Ergebnissen aus den vorherigen Versuchen (siehe Kapitel 2.5.3). Die so getesteten Kombinationen sind nochmals in der Tabelle 1 dargestellt.

Bei den Versuchen wurden jeweils fünf Replikate untersucht. Die Pflanzen wurden mit Lösungen, die die beiden Stoffe enthielten, behandelt. Ansonsten erfolgte die Versuchsdurchführung analog zu dem Screening der Derivate (siehe Kapitel 2.5.1). Somit wurde als Metrik erneut die Keimungsrate bei *L. sativum* genutzt. Diese wurde hier gewählt, da sie durch ihre hohe Sensitivität am einfachsten ermöglichte den kompletten Effektbereich abzudecken, was für die anschließende statistische Analyse wünschenswert war. Außerdem lagen bereits die Daten von den einzelnen Stoffen (siehe Kapitel 2.5.3) vor, was die Anzahl der nötigen Versuche reduzierte. Zuletzt war aus den vorherigen Versuchen und den jeweiligen Vorversuchen bekannt, dass die herbizide Wirksamkeit zwischen den einzelnen Stoffen bei der Verwendung der Keimungsrate als Metrik weniger schwankte, als bei anderen Metriken (z.B. Überlebensrate, Wassergehalt oder phänotypische Klassifizierung), weshalb sie wahrscheinlich den größtmöglichen Anteil der womöglich beobachtbaren Wirkung abdecken würde.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Abbildungen erfolgte größtenteils mit Hilfe von selbstgeschriebenem Code. Eine Ausnahme bildete das Dose-Modell, hier wurde der Code von Zimmer *et al.* (2016) [38] verwendet. Der verwendete Code, sowie auch alle Daten können unter <https://github.com/biotungsten/Jufo2021> gefunden werden. Im Folgenden werden die statistischen Methoden beschrieben, die verwendet wurden.

Wenn nicht anders angegeben wurde als Signifikanzniveau $\alpha = 0.05$ gewählt. Wenn multipel getestet wurde, wurde eine Bonferroni-Korrektur oder eine Bonferroni-Holm-Korrektur angewendet. Die dann jeweils berechneten Signifi-

Stoff 1/Stoff 2	RE (l)	RE (m)	RE (h)	HQ (l)	HQ (m)	HQ (h)	MA (l)	MA (m)	MA (h)
CA (l)	x	x		x	x		x	x	
CA (m)	x	x		x	x		x	x	
CA (h)			x			x			x
RE (l)				x	x		x	x	
RE (m)				x	x		x	x	
RE (h)						x			x
HQ (l)	x	x					x	x	
HQ (m)	x	x					x	x	
HQ (h)			x						x

Tabelle 1: Untersuchte Kombinationen von Catechol (CA), Resorcinol (RE), Hydrochinon (HQ) und Malonsäure (MA). Die Buchstaben l, m und h geben jeweils die Konzentration an (siehe Kapitel 2.5.5). Die Kombinationen von RE-HQ sind aufgrund des Aufbaus der Tabelle zweifach angegeben.

kanzniveaus sind bei den jeweiligen Ergebnissen zu finden.

2.6.1 Hill-Modell

Zur Beschreibung der Dosis-Wirkungs-Beziehung (siehe Kapitel 2.5.3) benötigte ich ein Modell, um die Daten zu fitten. Ein übliches Modell um monophasische sigmoidale Beziehungen, wie sie hier vorgenommen, zu beschreiben, ist das Hill-Modell [40, 41]. Folgende Gleichung wurde für das Hill-Modell verwendet:

$$E = \frac{1}{1 + \frac{[A]}{EC_{50}}^n} \quad (1)$$

Hierbei beschreibt E den beobachteten Effekt, $[A]$ die Konzentration des untersuchten Stoffs, EC_{50} die Konzentration bei der die Hälfte des maximal möglichen Effekts auftritt und n als sogenannter Hill-Parameter die Form der Kurve. Die Parameter wurden auf Basis der ermittelten Keimungsraten geschätzt. Hierzu wurde der Levenberg-Marquardt-Algorithmus eingesetzt.

2.6.2 Statistische Analyse von Synergismen

Der Begriff des Synergismus ist in der Literatur sehr umstritten und häufig werden fehlerhafte und widersprüchliche Definitionen benutzt. Eine weitgehend anerkannte Definition ist synergistische Effekte als hyperadditiv zu beschreiben [39]. Bei der Kombination zweier Wirkstoffe wird der Effekt, auch bei nicht synergistischen Wirkstoffen, die jeweilige ursprüngliche Wirkung häufig überschritten. Man beobachtet daher bei vielen Stoffen eine additive Wirkung. Die entscheidende Frage ist somit die Definition der additiven Wirkung. Dessen Definition liegt den Missverständnissen in der Literatur häufig zu Grunde. Diese ist, insbesondere wenn der Wirkmechanismus nicht bekannt ist, schwierig zu definieren, da dann keine mechanistischen Modelle der Wirkstoffinteraktion eingesetzt werden können, die auf den molekularen Wirkungsvorgängen und den zu Grunde liegenden Naturgesetzen basieren.

Neben der Aufgabe zu beurteilen, ob ein Synergismus vorliegt, besteht immer die Problematik, dass sich aufgrund der exponentiell steigenden Anzahl an nötigen Versuchen nicht einmal ansatzweise alle möglichen Kombinationen von Konzentrationen und Wirkstoffen testen lassen. Daher existieren verschiedene Modelle die Wirkung mittels weniger Datenpunkte abzuschätzen. Häufig sind dies auch Modelle, die zur Berechnung der additiven Wirkung verwendet werden, es existiert also keine Möglichkeit Synergismen oder Antagonismen mit zu berücksichtigen. Daher setzte ich ein neues Modell, das 2016 von Zimmer et al. beschrieben wurde [38], ein. Das Modell simuliert, dass jeder Stoff in der Lösung die effektiv wirksame Menge der anderen enthaltenen Stoffen herabsetzt oder vergrößert. Wie stark dies der Fall ist, wird von einem Interaktionsparameter beschrieben (siehe Gleichung 2, $D_{i\text{eff}}$ ist die effektiv wirksame Dosis des i-ten Stoffs, D_i die tatsächlich verwendete Dosis des i-ten Stoffs, a_{ij} der Interaktionsparameter zwischen dem i-ten und j-ten Stoff, D_{j0} der EC_{50} Parameter des j-ten Stoffs aus dem Hill-Modell und $D_{j\text{eff}}$ die effektive des j-ten Stoffs. Das Produkt wird über alle Stoffe, die sich neben dem i-ten Stoff in der Lösung befinden, gebildet). Diese Interaktionsparameter werden aus den ermittelten Daten mittels der MATLAB Funktion `fmincon` abgeschätzt. Ein negativer Interaktionsparameter korrespondiert mit einer synergistischen Wirkung, ein positiver mit einer antagonistischen Wirkung. Der Betrag des Parameters entspricht der Stärke der Interaktion.

$$D_{i\text{eff}} = D_i \prod_{j \neq i} 1 + a_{ij} \frac{D_{j\text{eff}}/D_{j0}}{1 + D_{j\text{eff}}/D_{j0}} \quad (2)$$

Mittels dieses Modells mache ich aufgrund weniger Datenpunkte eine Vorhersage über den kompletten Wirkungsraum der meiner Wirkstoffkombinationen. Pro Kombination von Wirkstoffen teste ich fünf Kombinationen an Konzentrationen (Kapitel 2.5.5). Unter der Annahme, dass sich bisherige Erfahrungen mit diesem Modell auf mei-

nen Anwendungsfall übertragen lassen, ist so nur ein Verlust von 1-2 % an Präzision im Vergleich zur Verwendung einer optimalen Anzahl an Kombinationen an Konzentrationen zu erwarten [38]. Auf Basis der vorhergesagten Interaktionsparameter des Modells konnte ich Aussagen darüber treffen, ob zwischen zwei Stoffen ein syn- oder ein antagonistischer Effekt besteht. Die vom Dose-Modell erhaltenen Werte wurden außerdem mit den vom Bliss-Independence Modell [42] vorhergesagten verglichen, um einen Eindruck für die Güte der Vorhersage im Vergleich zu älteren Methoden zu geben.

3 Ergebnisse

3.1 Chemische Analytik

Im Folgenden sind die verschiedenen Ergebnisse der chemischen Analytik, die der Identifizierung der Hauptkomponenten der Brennnesseljauche und der Bestätigung ihrer Struktur im Anschluss dienten, aufgelistet. Nicht gezeigt sind die Ergebnisse aus der Säulenchromatografie zum Auffangen der Fraktionen für die NMR und der entsprechenden bestätigenden HPLC, da diese Ergebnisse nur nochmals die erste HPLC bestätigten.

3.1.1 HPLC/MS

Die HPLC-Versuche (Abbildung 3, Tabellen 2 und 3) zeigten jeweils drei Peaks. Diese ließen sich auf Grund der Retentionszeiten den Stoffen Catechol, Phloretinsäure und Dihydrokaffeesäure zuordnen. Diese Zuordnung wurde auch von den weiteren Ergebnissen bestätigt. Außerdem zeigte die HPLC klar, dass die Hauptkomponenten in deutlich verschiedenen Größenordnungen enthalten waren. Die integrierte Fläche unter den Peaks unterschied sich bis zu einem Faktor von 21, obwohl keine quantitative Methode durchgeführt wurde (Tabelle 2). Auch konnte beobachtet werden, dass die Signale in der HPLC der apolaren Lösung deutlich schwächer als die der polaren Lösung sind, da die ursächlichen Stoffe selbst polar sind. Das Chromatogramm der apolaren HPLC ist nicht aufgeführt, da hier keine relevanten neuen Informationen enthalten sind.

Außerdem zeichnete der angeschlossene UV/VIS-Detektor für die jeweiligen Peaks die UV-Spektren auf. Catechol zeigte hier bei 226 nm und 276 nm, bei Phloretinsäure bei 227 nm und 276 nm und bei Dihydrokaffeesäure bei 232 nm und 281 nm Peaks auf.

Bei der Massenspektrometrie wurden die folgenden Werte gemessen. Es ist jeweils das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) angegeben.

Catechol: 109 ($M - H^-$, 100 %), 219 (46, $2M - H^-$),

217 (6, $2M - 3H^-$), 93 (5)
 Phloretinsäure: 166 (M^+ , 10 %), 165 (100, $M - H^-$), 331 (18, $2M - H^-$), 352 (12)
 Dihydrokaffeesäure: 182 (M^+ , 2 %), 363 (100, $2M - H^-$), 181 (62, $M - H^-$), 218 (18, $M + Cl^- s$), 384 (7), 364 (4, $2M^+$)

Das berechnete Masse-Ladungs-Verhältnis des molekularen Kations war bei Catechol 110,112 (nicht gemessen), bei Phloretinsäure 166,063 (gemessen 166,2) und bei Dihydrokaffeesäure 182,085 (gemessen 182,1).

3.1.2 Nukleare Magentresonanzspektroskopie

Bei den NMR-Daten sind nur die chemischen Verschiebungen der verwendeten 1D-NMR Methoden aufgeführt. Die Daten der 2D-NMR waren jeweils kohärent mit diesen Daten. Eine Simulation der zu erwartenden NMR-Spektren in ChemDraw lieferte auch eine mit den Ergebnissen übereinstimmende Vorhersage.

Catechol: ^1H NMR (MeOH, 300 MHz): δ_H 4,9 (s, 2H, asymmetrisch); 6,62-6,68 (m, 2H); 6,72-6,78 (m, 2H); APT NMR (MeOH, 75 MHz): δ_C 116,4 (2C); 120,9 (2C); 146,3 (2C)

Phloretinsäure: ^1H NMR (MeOH, 300 MHz): δ_H 2,56-2,50 (m, 2H, $J = 7,6$ Hz); 2,83-2,78 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz); 6,71-6,67 (m, 2H); 7,04-7,01 (d, 2H); APT NMR (MeOH, 75 MHz): δ_C 31,2 (2C); 37,2 (2C); 116,2 (2C); 130,2 (2C); 132,9 (2C); 156,7 (1C); 176,9 (1C)

Dihydrokaffeesäure: ^1H NMR (MeOH, 300 MHz): δ_H 2,52-2,49 (t, 2H); 2,78-2,73 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz); 6,52 (dd, 1H, $J = 8,02$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz); 6,68-6,64 (t, 1H); APT NMR (MeOH, 75 MHz): δ_C 31,2 (2C); 37,2 (2C); 116,3 (1C); 116,4 (1C); 120,5 (1C); 144,6 (1C); 146,2 (1C); 176,9 (1C)

Bei der vorhergehenden Säulenchromatografie zur Isolation der Fraktionen wurden diese zwischen 30% und 50% Methanol aufgefangen.

3.2 Screening der Derivate

Es zeigte sich, dass vier Derivate, bzw. Hauptkomponenten herbizid wirksam waren (Abbildung 4). Diese Effekte sind besonders nach sechs Tagen deutlich sichtbar. Hier erreichen Catechol und Resorcinol jeweils eine Reduktion der Keimungsrate in Bezug auf die Kontrolle um ungefähr absolut 70%, Hydrochinon um 50% und Tropasäure um 40 %. Bei Tropasäure ist allerdings eine sehr große Streuung der Ergebnisse zu beobachten. Die Ergebnisse aller anderen untersuchten Stoffe liegen im Bereich einer

#	Retentionszeit [min]	Intensität [mAU]	Weite [min]	Fläche [mAU s]
1	14,865	8,374	0,105	62,73
2	14,940	9,406	0,163	118,276
3	15,235	1,986	0,117	13,980
4	18,595	83,328	0,216	1306,900
5	23,795	24,804	0,183	354,85

Tabelle 2: Daten zu den Peaks, die bei der HPLC im polaren Lösungsmittel aufgezeichnet wurden und nicht auf das Lösungsmittel zurückzuführen sind. Peaks 1 bis 3 stammen von Catechol, Peak 4 von Dihydrokaffeesäure und Peak 5 von Phloretinsäure. Das Chromatogramm ist in Abbildung 3 zu sehen.

#	Retentionszeit [min]	Intensität [mAU]	Weite [min]	Fläche [mAU s]
1	14,981	0,887	0,286	15,251
2	18,603	17,297	0,171	178,297
3	23,763	2,519	0,219	2,519

Tabelle 3: Daten zu den Peaks, die bei der HPLC im apolaren Lösungsmittel aufgezeichnet wurden und nicht auf das Lösungsmittel zurückzuführen sind. Peak 1 stammt von Catechol, Peak 2 von Dihydrokaffeesäure und Peak 3 von Phloretinsäure. Das Chromatogramm ist hier nicht gezeigt, da es im Vergleich zu Abbildung 3 keine neuen Informationen enthält.

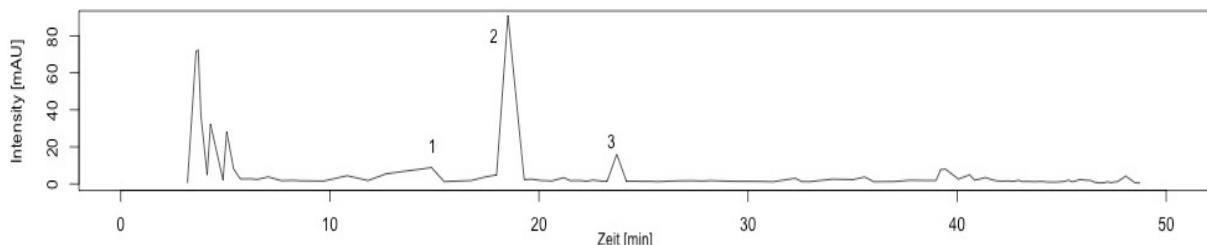


Abbildung 3: Chromatogramm von der polaren HPLC. Die drei Peaks entsprechen den jeweiligen Hauptkomponenten. Peak 1 stammt von Catechol, Peak 2 von Dihydrokaffeesäure und Peak 3 von Phloretinsäure. Unter Peak 1 sind hier eigentlich mehrere nahe an einander liegende Peaks zusammengefasst, die alle von Catechol stammen (siehe Tabelle 2), aber hier aufgrund der Auflösung nicht von einander getrennt sind.

Standardabweichung von der Kontrolle. Die Ergebnisse der DHB waren jeweils signifikant ($p < 0.002$).

3.3 Überlebensraten von *A. thaliana*

Bei der Untersuchung der Überlebensraten von *A. thaliana* zeigte sich, dass alle untersuchten Substanzen wirksam waren (Abbildung 5). Ein Effekt war jeweils bereits nach 2 Tagen feststellbar, fiel aber nach 7 Tagen stärker aus. Außerdem lies sich beobachten, dass die Reduktion durch Catechol mit ca. 80% stärker ausfällt, als bei den anderen Stoffen mit zwischen 20% und 40%. Letztere Ergebnisse sind aber auch mit größeren Fehlern behaftet. Phänotypisch konnte ich Austrocknungen an den Blättern der abgestorbenen Pflanzen feststellen, die mit den üblichen Beobachtungen bei Trockenstress übereinstimmen. Dies lies sich auch an vereinzelten Stellen von Blättern noch lebender Pflanzen beobachten.

3.4 Dosis-Wirkungs-Verhältnisse

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass die Wirkung von Catechol, Resorcinol und Hydrochinon

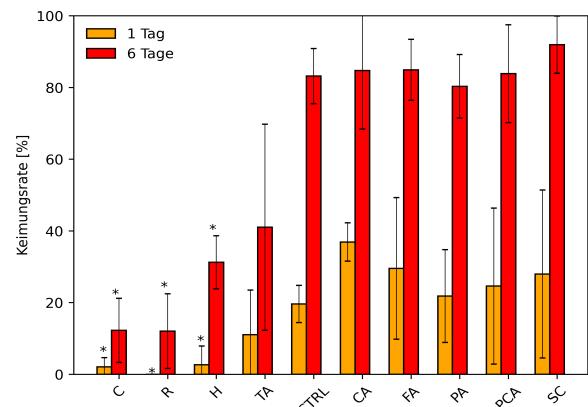


Abbildung 4: Keimungsraten von *L. sativum* nach dem Auftrag von Catechol (C, 100 mM), Phloretinsäure (PA, 10 mM) und Kaffeesäure (CA, 10 mM), auch Natrium-cinnamat (SC, 1 mM), Ferulasäure (FA, 10 mM), Tropasäure (TA, 100 mM), Resorcinol (RE, 100 mM), Hydrochinon (H, 100 mM) und Protocatechusäure (PCA, 100 mM). Die Kontrolle (CTRL) zeigt die Keimungsraten nach der Behandlung mit Wasser. Angegeben ist $\mu\pm SD$, $n = 4$. Mit einem Stern sind Werte markiert, die nach Bonferroni-Holm Korrektur signifikant waren. Es wurde ein einseitiger Welsh-Test (lower tail) verwendet.

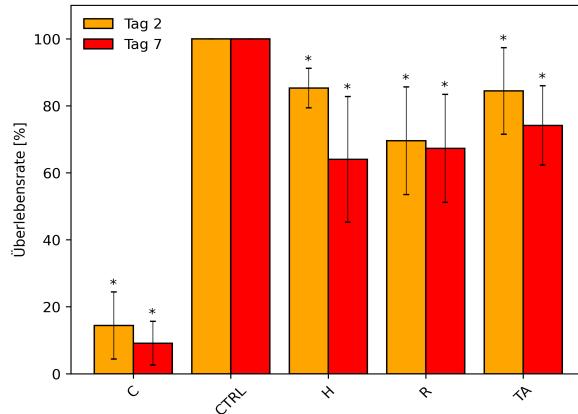


Abbildung 5: Überlebensraten von *A. thaliana* nach dem Auftrag von Catechol (C, 90 mM), Resorcinol (RE, 120 mM), Hydrochinon (H, 120 mM) und Tropasäure (TA, 50 mM). Die Kontrolle (CTRL) zeigt die Überlebensrate nach der Behandlung mit Wasser. Angegeben ist $\mu \pm SD$, $n = 4$. Mit einem Stern sind Werte markiert, die nach Bonferroni-Holm Korrektur signifikant waren. Es wurde ein einseitiger Welsh-Test (lower tail) verwendet.

durch eine sigmoidale Kurve gut beschrieben werden konnte (Abbildung 6). Im Falle der Tropasäure gelang zwar auch ein Anpassen der Kurve, allerdings mit dem schlechtesten root mean square error (0,26; RMSE). Außerdem hatten die geschätzten Parameter hier eine sehr große Standardabweichung. Der Hill-Parameter der DHB lag jeweils in einem ähnlichen Bereich (1,4 bis 1,5), was sich in einer ähnlichen Form der Wirkungskurven widerspiegelt. Weiter war der EC_{50} der Stoffe kohärent mit den bisherigen Beobachtungen zur Stärke des Effekts, nämlich, dass Hydrochinon (17,6 mM) und Catechol (27,3 mM) am stärksten vor Resorcinol (54,8 mM) wirken. Weiter war zu beobachten, dass keiner der Stoffe eine komplett Keimungsinhibition erreichte. Während Catechol bei der höchsten Konzentration die Keimung fast komplett inhibierte (1,4 %), erreichte Resorcinol nur 12,8 % und Hydrochinon nur 25,6 %. Tropasäure zeigte mit über 50 % bei der maximalen Konzentration nur eine schwache Wirkung.

3.5 Synergismen

Die Rohdaten zur Untersuchung eines möglichen Synergismus zeigen zunächst keine klaren Interaktionen auf (Abbildung 7). Hierbei ist zu beachten, dass die Konzentrationen der Stoffe in den Einzellösungen (C-30, C-50, ...) von den Konzentrationen der Stoffe in den Kombinationen (ll, lm, ...) verschieden sind. Bei der Untersuchung dieser Ergebnisse mit dem Dose-Modell (Kapitel 2.6.2) zeigte sich, dass zwischen den einzelnen Stoffen keine synergistische, sondern viel mehr antagonistische Effekte bestehen. Dies äußerte sich im Dose-Modell in positiven Interaktionsparametern.

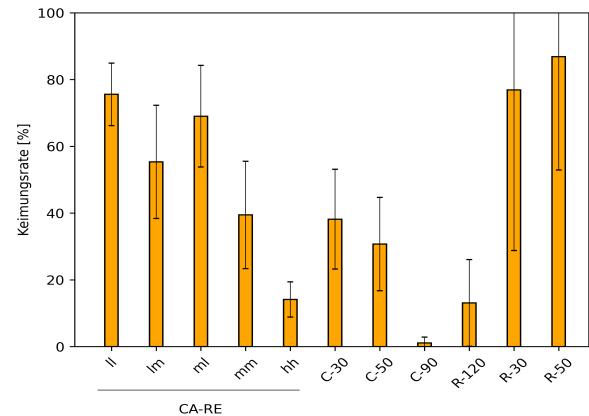


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der Keimungs-raten von *L. sativum* 6 Tage nach der Behandlung mit Catechol (C), Resorcinol (R) oder einer Kombination (CA-RE, Catechol-Resorcinol) der beiden Stoffe. Bei den einzelnen Stoffen sind die Konzentrationen in mM angegeben (C-30 entspricht 30 mM Catechol). Bei den Kombinationen sind die Konzentrationslevel der einzelnen Stoffe in der Reihenfolge CA-RE angegeben. Die den Buchstaben l (low), m (middle) und h (high) entsprechenden Konzentrationen sind im Methodenteil angegeben (Kapitel 2.5.5). Angegeben ist $\mu \pm SD$, $n = 5$, bzw. $n = 3$ für die einzelnen Stoffe.

In der Abbildung 8a ist der \log_{10} ebendieser Interaktionsparameter angegeben, da alle Parameter positiv waren, aber über einen großen Wertebereich gestreut waren. Man kann hier auch beobachten, dass allgemein Interaktionen mit Malonsäure besonders stark antagonistisch geprägt sind. Eine Reihe von Interaktionsparametern sind sehr niedrig ($< 10^{-5}$). Dies deutet darauf hin, dass die jeweiligen Interaktionen nur einseitig sind. Das heißt ein Stoff beeinflusst den Anderen, aber nicht umgekehrt. Insgesamt beschrieb das Modell die Daten hier ansatzweise gut ($R^2 = 0,75$) (siehe Abbildung 8b). Zwar war das Dose-Modell dem Bliss-Independence-Modell mit seinem R^2 -Wert von 0,04 weit überlegen, zeigte allerdings auch seine Schwächen, bei einzelnen schlecht vorhergesagten Experimentalergebnissen. Dies ist insbesondere bei bestimmten Kombinationen (z.B. CA-MA) von Wirkstoffen der Fall ($R^2=0,56$, Daten nicht gezeigt).

3.6 Bestimmung des relativen Wassergehalts

Bei der Untersuchung des RWC konnte ich zwischen den einzelnen Stoffen und der Kontrolle kaum Unterschiede feststellen (Abbildung 9). Der Ausgangswert des RWC schwankte zwischen und innerhalb der einzelnen Lösungen stark und lag jeweils zwischen 60 % und 70 %. Es ist kein einheitlicher Trend bei den einzelnen Stoffen zu beobachten. Auch nach 30 Stunden Beobachtungen ist kein RWC deutlich unter den Ausgangswert gefallen.

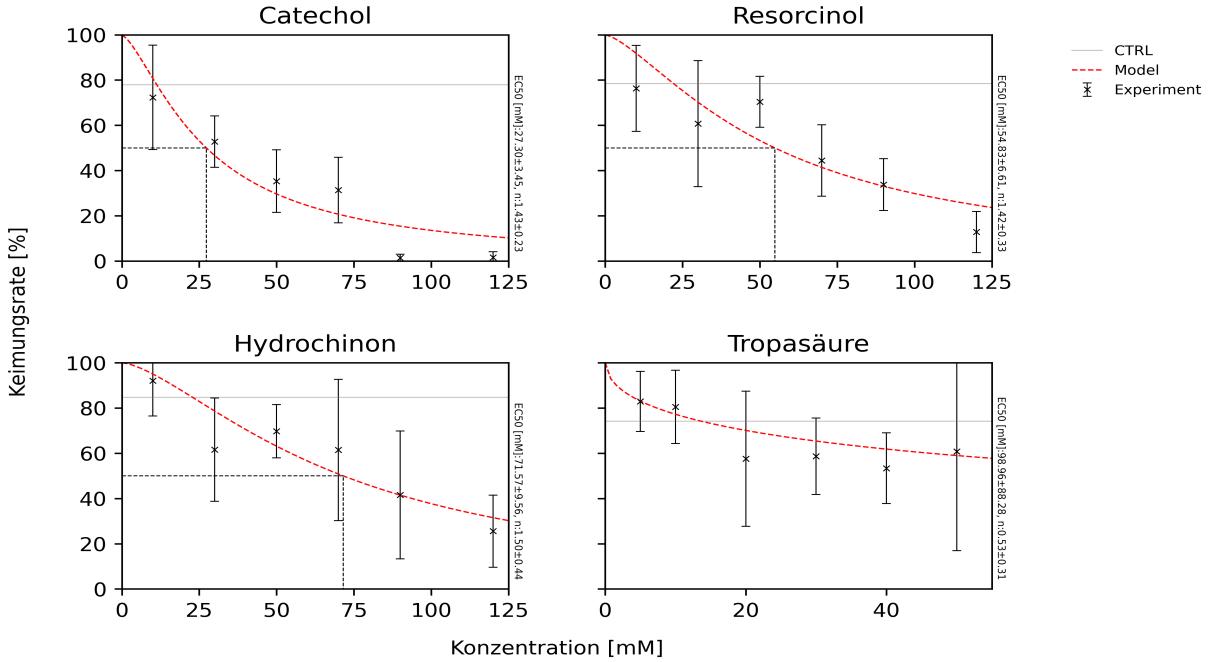


Abbildung 6: Die Keimungsraten von *L. sativum* nach Behandlung mit DHB und Tropasäure in Abhängigkeit von der Dosis. Angegeben ist bei den experimentellen Werten jeweils $\mu \pm SD$, $n = 3$. Für die Kontrolle (CTRL) ist der Mittelwert angegeben. Das Modell wurde an die Hill-Gleichung gefititet. Angegeben sind die geschätzten Parameter EC_{50} und n mit der jeweiligen Standardabweichung. Die EC_{50} -Werte sind jeweils eingezzeichnet (schwarz gestrichelt). Für die Modelle ergaben sich die folgenden RMSE: Catechol (0,16), Resorcinol (0,20), Hydrochinon (0,24) und Tropasäure (0,26).

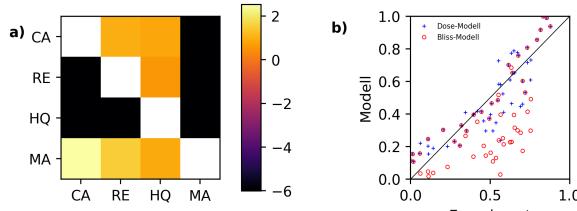


Abbildung 8: Ergebnisse der Modelle zur Beschreibung des Synergismus. a) Interaktionsparameter des Dose-Modells (als \log_{10}) zwischen den Stoffen (CA-Catechol, RE-Resorcinol, HQ-Hydrochinon und MA-Malonsäure). Alle ermittelten Interaktionsparameter waren positiv. b) Vergleich der experimentell beobachteten Effekte und der vom Dose-Modell ($R^2 = 0,75$) und vom Bliss-Independence-Modell ($R^2 = 0,04$) vorhergesagten Effekte. Die x-y Gerade entspräche einer perfekten Vorhersage.

Weiter zeigen die einzelnen Datenpunkte eine sehr große Standardabweichung. Das Ergebnis steht nicht in Einklang mit der phänotypischen Beobachtung während des Versuchs, bei der nach 30 Stunden bei allen behandelten Pflanzen klar Austrocknungen an den Blättern beobachtet werden konnten.

3.7 Spektrophotometrie

Es ergaben sich für alle drei DHB verschiedene Peaks im UV-Spektrum.

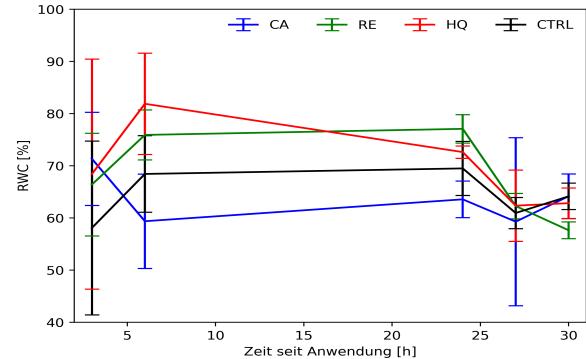


Abbildung 9: Änderung des relativem Wassergehalts in *A. thaliana* nach der Behandlung mit Lösungen von Catechol (CA, 90 mM), Resorcinol (RE, 120 mM) und Hydrochinon (HQ, 120 mM). Die Kontrolle (CTRL) zeigt den RWC nach Behandlung mit Wasser. Angegeben ist $\mu \pm SD$, $n = 3$. Nach Bonferroni-Holm Korrektur wichen kein Wert signifikant von der Kontrolle ab. Es wurde ein zweiseitiger Welsh-Test verwendet.

Nämlich für Catechol bei 275 nm, für Resorcinol bei 273 nm und für Hydrochinon bei 288 nm. Alle Stoffe zeigen in dem Konzentrationsbereich von $10 \mu\text{M}$ bis $60 \mu\text{M}$ einen linearen Anstieg der Absorption (Abbildung 10), folgen also dem Lambert-Beerschen-Gesetz. Diese Ergebnisse sind für die Entwicklung eines spektrophotometrischen Assays zur Konzentrationsbestimmung von DHB von Bedeutung (Kapitel 4).

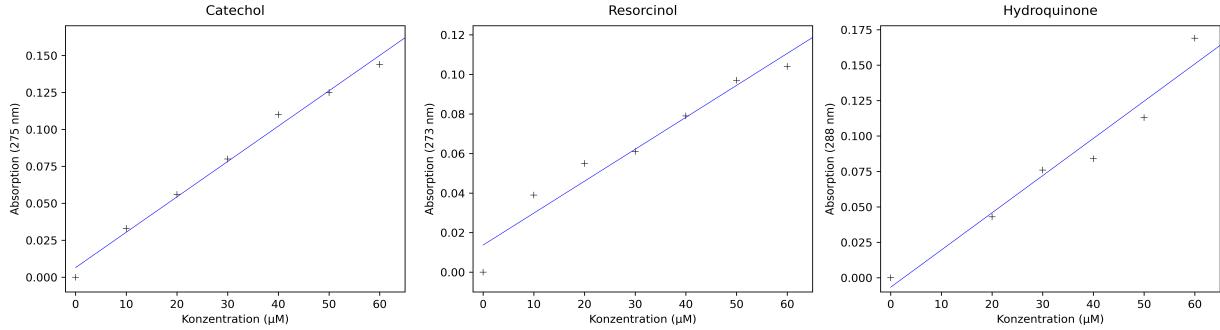


Abbildung 10: Standardkurven der DHB im UV-Spektrum. Diese Fits haben die folgenden R^2 Werte: 0,995 (Catechol), 0,973 (Resorcinol) und 0,978 (Hydrochinon)

4 Ergebnisdiskussion

In meinem Projekt ist es mir gelungen, die chemische Komposition der Brennnesseljauche aufzuklären und mit den DHB eine vielversprechende und herbizid wirksame Stoffgruppe zu identifizieren. Diese erreichen bei Konzentrationen von 120 mM eine maximale Reduktion der Keimungsrate auf zwischen 25 % und ungefähr 1 %.

Die chemische Analytik konnte die Hauptkomponenten Catechol, Phloretinsäure und Dihydrokaffeesäure klar identifizieren. Allerdings wurde nur eine qualitative Analytik und keine quantitative eingesetzt. Daher mussten die wirksamen Konzentrationen in den nachfolgenden Versuchen abgeschätzt und getestet werden. Bezugnehmend auf mein vorhergehendes Projekt habe ich hier nicht kausal, sondern viel mehr korrelativ, die Wirkung der identifizierten Hauptkomponenten der Brennnesseljauche zugeordnet. Es wäre auch möglich, dass ein in deutlich geringeren Mengen enthaltener Stoff die Wirkung verursacht oder dies über Interaktionen mit anderen Inhaltsstoffen tut. Weiter kann ich nicht gänzlich ausschließen, dass in der Präparation der Brennnesseljauche für die chemische Analytik der tatsächlich wirksame Stoff zerstört wurde. Dies scheint allerdings unwahrscheinlich, da es sich bei den eingesetzten Chemikalien nicht um reaktive Stoffe handelt und diese Präparation auch Standard für die Analyse von Pflanzenextrakten ist. Das Hauptziel, eine mögliche neue Stoffgruppe für Herbizide zu identifizieren wurde erreicht. Für den weiteren Projektverlauf ist die oben beschriebene Kausalität auch nicht von Relevanz, daher plane ich auch nicht, diese näher zu untersuchen.

Bei der Untersuchung der Hauptkomponenten und der Derivate hat sich klar gezeigt, dass die DHB im Gegensatz zu den anderen Stoffen eine statistisch signifikante herbizide Wirkung zeigen. Das Ergebnis der Tropasäure war zwar nach Bonferroni-Holm Korrektur nicht mehr signifikant, dennoch verfolgte ich im nächsten Versuch die Tropasäure weiter, da die Bonferroni-Holm Korrektur sehr konservativ ist

und die Typ-2-Fehlerrate erhöht und mit $p = 0.0282$ die Alternativehypothese nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Eine zuvor in der Literatur beschriebene Wirkung von Ferulasäure, Kaffeesäure und Zimtsäure [28, 29, 30] konnte ich, trotz deutlich höherer Konzentrationen nicht nachweisen. Hierfür könnte ursächlich sein, dass ein anderer Bioassay (Keimungsrate anstatt von Keimplingsgewicht) gewählt wurde und auch, dass die Versuche nicht auf Nährstoffmedium durchgeführt wurden. Insofern ist es mit gelungen, aufbauend auf diesen Untersuchungen zu zeigen, dass eine tatsächliche herbizide Wirkung in der Anwendung auf Erde im Bezug auf die Keimungsrate nicht zu erwarten ist und auch insgesamt unwahrscheinlich ist. Tatsächlich war die untersuchte Konzentration der bei mir wirksamen Stoffe mit 100 mM höher als bei den anderen Derivaten, mit Ausnahme der Protocatechusäure. Dies war allerdings durch die teils geringen Löslichkeit der anderen Derivate bedingt. Die ebenfalls mit der hohen Konzentration untersuchte Protocatechusäure zeigte auch keinen stärkeren Effekt als die anderen Stoffe. Daher gehe ich davon aus, dass die beobachteten Effekte nicht nur auf die verschiedenen Konzentrationen zurückzuführen sind. Interessant ist, dass auch die, strukturell von den anderen untersuchten Stoffen stark verschiedene, Tropasäure eine gewisse herbizide Wirkung zeigt, auch wenn diese äußerst gering ist. Falls es sich hierbei tatsächlich um eine herbizid wirksame Komponente handeln sollte, würde somit wahrscheinlich ein anderer Wirkungsweg als bei den DHB zu Grunde liegen. Ich untersuchte die Tropasäure nachdem sich die Schwäche der Wirkung ($EC_{50} = 99 \pm 88$ mM, keine komplette Keimungsinhibition beobachtet) auch in weiteren Versuchen bestätigte, nicht weiter und plane dies auch nicht für die Zukunft. Wie auch bei anderen Experimenten hätten anstelle von multiplen t-Tests mit Bonferroni-Holm Korrektur auch ANOVAs mit post-hoc Analysen in Form eines Dunnett-Tests gewählt werden können. So wäre vermutlich die Anzahl der Typ-2-Fehler geringer ausgefallen. Ich plane bis in Zukunft auch noch diese Analysen durchzuführen.

Die Untersuchung der Überlebensrate von *A. thaliana* konnte die herbizide Wirkung der DHB und auch der Tropasäure noch auf mehr Anwendungsfälle und auf mehr Spezies ausweiten. Die Wirkung fiel bei von Catechol klar am stärksten aus, was möglicherweise in Zukunft auch als Hinweis auf Wirkmechanismen dienen kann. Allerdings muss kritisch angemerkt werden, dass die Einordnung einer Pflanze als tot oder lebend nicht komplett objektiv und reproduzierbar ist. In Zukunft würden sich hier womöglich Computer Vision basierte Auswertungsverfahren anbieten, um eine objektivere Einordnung zu erreichen. Außerdem kann aufgrund der recht großen Anzahl an Pflanzen pro Topf (8 bis 12) nicht ausgeschlossen werden, dass es zu Konkurrenzeffekten kam, auch wenn die Kontrolle keinen Anlass zu dieser Vermutung bietet. Interessant ist allerdings die Beobachtung von Trockenstress, bzw. von Austrocknungen, die mit Trockenstress übereinstimmen. Diese Beobachtungen führten zu der späteren Untersuchung des relativen Wassergehalts.

Die genauere Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Kurven bestätigte meine Annahme, dass sich die Wirkung durch eine sigmoidale Kurve beschreiben lässt. Die unter den DHB ähnliche Form der Kurven steht im Einklang mit einem ähnlichen Wirkungsmechanismus, auch wenn sie diesen nicht bestätigt. Bei der Tropasäure kann man auch hier wieder sehen, wie schwach der verursachte Effekt ist. Die ermittelten RMSE-Werte für die Fits sind in einem akzeptablen Bereich aber auch nicht hervorragend. Diesbezüglich besteht zwischen den einzelnen Stoffen eine Varianz. Dies ist aber am ehesten mit der unterschiedlichen Varianz in den Experimentaldaten der Stoffe als mit der einer verschiedenen Eignung des Modells für die Stoffe zu erklären. Ein Problem bei der hier erfolgten Charakterisierung der Kurven mittels des Hill-Modells, ist, dass bei der maximal untersuchten Konzentration keine komplette Keimungsinhibition im Mittel beobachtet werden konnte. Außerdem ist es problematisch, dass die Kontrolle auch keine komplette Keimung aufweist, weshalb das Modell gezwungenermaßen im niedrigen Konzentrationsbereich konsistent zu hohe Werte vorhersagt. Dies erklärt womöglich auch die nur akzeptablen RMSE-Werte. Mögliche Lösungen wären über die Transformation der Daten nachzudenken oder aber ein gänzlich neues Modell zu wählen. Dies würde womöglich auch eine Anpassung des Synergismusmodells erfordern. Außerdem könnten auch alternative Metriken für die Regression neben dem RMSE betrachtet werden. Dies gestaltet sich aber schwierig, da das Modell nicht-linear ist.

Die Experimente zu synergistischen Effekten zeigten zwar Interaktionen zwischen den Stoffen, aber keine Synergismen, sondern viel mehr Antagonis-

men. Weder Dose- noch Bliss-Independence-Modell konnten eine sehr gute Beschreibung liefern. Mit einem R^2 Wert von 0,75 war der Fit des Dose-Modells aber akzeptabel. Bei einzelnen Wirkstoffkombinationen scheiterte das Modell allerdings, das es die Experimentaldaten nicht hinreichend beschreiben konnte. Dies war insbesondere bei den Kombinationen der Fall, für die hohe Interaktionsparameter vorhergesagt wurden, also ein starker Antagonismus vorhergesagt wurde. Mögliche Ursachen sind die geringe Anzahl an Dosis-Kombinationen pro Wirkstoffkombination, die Standardabweichung der Experimentaldaten oder aber die genaue Wahl der Dosiskombinationen. Die Kombination von hohen und niedrigen Dosen war in den Experimentaldaten nicht vorhanden und bei den Dosis-Wirkungsflächen die vorhergesagt werden, fallen bei den schlecht gefitteten Wirkstoffkombinationen genau in diesen Dosisbereichen unübliche Effekte auf. Ab einer sehr niedrigen Dosis hat nur noch einer der beiden Wirkstoffe (im Fall von CA-MA Malonsäure), laut dem Modell Auswirkungen auf die Gesamtwirkung. Dies erklärt dann auch wieder die starken vorhergesagten Antagonismen. Insgesamt sind alle Probleme, die bei der Modellierung der Dosis-Wirkungs-Verhältnisse auftraten, als mögliche Ursachen aufzulisten, da das zugrunde liegende Modell hier ebenfalls das Hill-Modell ist. Daher plane ich für die Zukunft diese Experimente nochmals zu wiederholen und andere Dosiskombinationen zu testen. Durch eine andere Auswahl der Konzentrationen können dann auch Isobologramme für die Analyse verwendet werden, welche syn- oder antagonistische Effekte deutlicher zeigen. Weiter sollte auch dieser Versuch mit einer neuen Metrik und auch an anderen Pflanzen (vor allem an *A. thaliana*) wiederholt werden. Zuletzt möchte ich in der Zukunft die Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen den DHB, da diese wahrscheinlich einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen, versuchen mittels der Loewe-Additivität zu modellieren. Dies wäre auch von Vorteil, weil in der Literatur schon eine Vielzahl an beschriebenen Methoden zur genauen Untersuchung synergistischer Effekte an diesem Modell vorhanden sind [43] und es für Interaktionen zwischen verschiedenen Wirkstoffen mit dem gleichen Wirkmechanismus die Analyse stark vereinfacht.

Eine generelle Schwäche der durchgeführten Experimente zur Bestimmung der herbiziden Wirksamkeit liegt in der Wahl der Metrik. Aus den im Methodenteil ausgeführten Gründen wählte ich die Keimungsrate als Metrik und führte die Experimente an *L. sativum* durch. Auch aufgrund der zusätzlich von mir durchgeführten Versuche ist davon auszugehen, dass die Wirkung nicht spezifisch für diese Art ist. Dies wurde insbesondere durch den Versuch zur Überlebensrate von *A. thaliana* (2.5.2) nachgewiesen. Allerdings beschränkt die Metrik der

Keimungsrate die Bedeutung auf eine Wirksamkeit als mögliches Vorlaufherbizid, d.h. ein Herbizid, das vor dem Keimen der Kulturpflanzen ausgebracht wird und so keimende oder junge Unkrautpflanzen angreift. Zwar konnte ich durch den Versuch zur Überlebensrate auch einen Einsatz als Nachlaufherbizid nicht ausschließen, allerdings blieb hier die beobachtete Wirkung auf Catechol begrenzt. Alle anderen Stoffe zeigten nur eine sehr schwache, wenn auch signifikante, Wirkung. Für die Auswahl der überhaupt wirksamen Derivate war die Metrik der Keimungsrate allerdings absolut ausreichend, da es sich insgesamt um eine sehr sensitive Metrik handelt, also eher eine Überschätzung der herbiziden Wirkung vorliegt. Aus besagten Gründen plane ich weitere Metriken, konkret das Auftreten von Austrocknungen, in die weiteren Experimente zur Charakterisierung der phänotypischen Wirkung der DHB mit einzubeziehen. Weiter plane ich zu untersuchen, inwiefern eine Wirkung durch andere Applikationsformen erzielt werden kann. Es scheint aufgrund der Literatur wahrscheinlich, dass die DHB auch durch eine Applikation auf die Blätter wirken können [9]. Dies kann womöglich weitere Hinweise auf die Wirkmechanismen geben. Außerdem plane ich insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Verwendung als Vorlaufherbizid zu untersuchen, wie lange die im Boden möglicherweise persistente Wirkstoffe noch eine Wirksamkeit entfalten. Hierzu bietet sich ein Kressetest an, bei dem die Keimungsfähigkeit von *L. sativum* einige Tage nach der Applikation gemessen wird.

Im Hinblick auf die Untersuchung des molekularen Wirkmechanismus standen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Ich entschied mich, zunächst dem phänotypisch beobachteten Trockenstress nachzugehen. Bei der Messung der RWC konnte ich im Laufe der Zeit zwar einen leichten abfallenden Trend beobachten, allerdings hatten die Messungen eine große Streuung der Werte. Daher und aufgrund der Tatsache, dass der zu Beginn auch in der Kontrolle gemessene RWC mit ungefähr 60 % bereits sehr niedrig für *A. thaliana* ist [44], gehe ich davon aus, dass bei den Messungen ein technischer Fehler unterlaufen ist. Die Daten deuten daraufhin, dass das Trockengewicht entweder systematisch überschätzt oder das Frischgewicht unterschätzt wurde. Daher können diese RWC-Daten nicht zur Beurteilung eines möglichen Wirkmechanismus herangezogen werden. Ich plane diesen Versuch sobald wie möglich erneut durchzuführen. Bei der erneuten Durchführung werde ich auch direkt die GSH-Messung inkludieren. Hierzu wird von jeder entnommenen Probe ein Teil eingefroren und im Anschluss mittels eines HPLC-Assays für Thiole analysiert. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass durch die mechanischen Schäden bei der Probennahme in der Pflanze oxidativer Stress entsteht,

der das Ergebnis leicht verfälschen kann.

Aus den Beobachtungen ergeben sich mehrere Ansätze für einen möglichen Wirkmechanismus. Phänotypisch konnte bei der Behandlung von bereits gekeimten Pflanzen Trockenstress beobachtet werden. Außerdem kam es zur Keimungsinhibition. Die zentrale Frage ist, ob der Trockenstress sekundär als Konsequenz von z.B. dem durch die DHB verursachten oxidativem Stress oder primär auftritt. Für ein primäres Auftreten gibt es prinzipiell zwei vorstellbare Mechanismen. Zum einen könnte die Konzentration der Wirkstoffe so hoch sein, dass osmotische Effekte zum Tragen kommen. Dies scheint aber eher unwahrscheinlich, da sich die aufgetragene Lösung im gesamten Topf, in dem sich die Pflanzen befinden, verteilt. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Wirkstoffe direkt zytotoxisch auf die für den Transport von Wasser sowie Nähr- und Mineralstoffen wichtigen Wurzelzellen wirken oder deren Transportvorgänge inhibieren. Für ein sekundäres Auftreten kommen zahlreiche Mechanismen in Frage, neben den bereits erwähnten vorstellbaren Mechanismen (GSH-Depletion, Adduktbildung mit Proteinen, ...) wäre auch eine direkt phytotoxische Wirkung vorstellbar. Dies plane ich in Zukunft neben der Frage, ob der Trockenstress auch primär verursacht wird, näher zu untersuchen. Hierzu werde ich, wie oben erwähnt, den RWC-Versuch erneut durchführen und diesmal auch den GSH-Gehalt bestimmen. Außerdem plane ich den Anteil freier Cysteinylgruppen der Proteine aus Pflanzenproben und auch den Grad der Adduktbildung mit DHB zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation zu untersuchen. Zuletzt möchte ich Versuche zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz (mittels *pulse amplitude modulated* Fluorometrie) durchführen. Hierdurch könnte indirekt die Aktivität des PSII bestimmt werden. Wenn Kontrollen für möglichen oxidativen Stress durchgeführt werden, würden diese Messungen einen ersten Ansatz zur Beurteilung einer direkten phytotoxischen Wirkung geben.

Es konnten gute Standardkurven mit R^2 Werten von jeweils über 0,97 erstellt werden. Daher ist davon auszugehen, dass die DHB in diesem Konzentrationsbereich dem Lambert-Beerschen Gesetz folgen. Die Messungen sollten allerdings nochmals neu vorgenommen werden, da die Absorption in weiten Teilen unter 0,1 lag, ab wo die Linearität von Spektrophotometern abnimmt. Die erstellten Standardkurven von den DHB sind insofern hilfreich, als dass sie für die weitere Untersuchung des Wirkmechanismus die Möglichkeit eröffnen an photometrischen Assays für die Bestimmung der Konzentration der DHB zu verwenden, wie sie teilweise bereits beschrieben wurden [45, 46, 47]. Die bisherigen Assays sind allerdings nicht geeignet die Konzentrationen zu bestimmen, wenn noch zahlreiche

andere Polyphenole und Phenole in der Testlösung enthalten sind, was bei der Analyse von Pflanzenproben auch nach Aufreinigung zweifelsohne der Fall sein wird. Zwar wäre auch die Verwendung einer HPLC-basierten Methode möglich, diese ist allerdings kosten- und zeitintensiver und daher insbesondere, wenn zahlreiche Messungen nötig sind, wie bei der Bestimmung des Wirkungsmechanismus, weniger sinnvoll zu verwenden.

4.1 Bedeutung und mögliche Anwendungen

Die Erkenntnisse über die herbizide Wirksamkeit der DHB öffnen eine Möglichkeit bei der Suche nach neuen herbiziden Wirkstoffen. Die Forschung an neuartigen herbiziden Wirkstoffen, insbesondere solchen, die neue Wirkmechanismen nutzen, ist für die Herbizidforschung von großer Bedeutung, insbesondere angesichts der Probleme mit Resistenzen, die für die industrielle Landwirtschaft eine große Bedrohung darstellen [1]. Da es sich bei den DHB um eine noch selten in der Literatur als Herbizid beschriebene Stoffklasse handelt, sind allerdings auch noch viele Fragen, bezüglich der Art der Wirkung und der damit einhergehenden Effizienz als Herbizid offen, die zuerst beantwortet werden müssen.

Da die DHB allerdings selbst nicht gesundheitlich unbedenklich sind, ist es unwahrscheinlich, dass sie als alleinige primäre Komponente eines Herbizids genutzt werden können. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus kann allerdings von anderen Stoffen, die gesundheitlich unbedenklich sind, genutzt werden. Hierzu würden sich, auch auf Basis der Literatur, funktionalisierte Derivate der DHB anbieten. (z.B. mittels Alkylierung oder Nitrierung) Weiter kann man womöglich durch Synergismen mit konventionellen Herbiziden, die benötigte Konzentration des konventionellen Herbizids gesenkt werden (Kapitel 1).

Womöglich zeigt sich auch, dass die Wirkungsweise der DHB in Teilen für Pflanzen spezifisch sind und auch andere Applikationsformen (z.B. über die Blätter, wo so schneller und effizienter ein phytotoxischer Effekt auftreten könnte sind) möglich sind. Beides würde zu einer Verringerung der nötigen Dosis führen.

Insgesamt geben die hier vorliegenden Ergebnisse eine großartige Möglichkeit für weitere Experimente zu den Wirkmechanismen und möglichen Nutzungsformen als Herbizid, die zu einer neuen Wirkstoffklasse an Herbiziden führen könnten.

5 Zusammenfassung

In diesem Projekt gelang es mir die Hauptkomponenten der Brennesseljauche zu isolieren und deren Struktur zu aufklären. Weiter konnte ich in verschiedenen Experimenten nachweisen, dass mit Catechol eine der identifizierten Hauptkomponenten eine herbizide Wirkung aufweist. Die anderen beiden Dihydroxybenzene Resorcinol und Hydrochinon, die als Derivate auch untersucht wurden, zeigten ebenfalls eine herbizide Wirkung. Mit Resorcinol zeigt auch ein DHB, das gesundheitlich recht unbedenklich ist [48, 12, 49, 10], eine herbizide Wirkung. Weiter konnte ich die herbizide Wirkung in Abhängigkeit von der Dosis aufklären und die EC_{50} -Werte bestimmen. Untersuchungen zu möglichen Interaktionen zwischen den Wirkstoffen blieben weitestgehend inkonklusiv, deuten aber auf antagonistische Effekte zwischen den DHB hin und werden in der Zukunft weitergeführt. Auch gelang es mir die ersten Grundlagen für die Untersuchung des zugrundeliegenden Wirkmechanismus zu schaffen. Zwar sind die Ergebnisse dieses ersten Versuchs quantitativ nicht nutzbar, in der qualitativen Betrachtung konnte aber klar Trockenstress beobachtet werden.

Für die Zukunft plane ich einerseits weitere Untersuchungen zur phänotypischen Wirkung bei verschiedenen Pflanzen und auch eine Variation der Applikationsart. Andererseits möchte ich mich hauptsächlich auf die Aufklärung des Wirkmechanismus fokussieren. Bei Letzterem Punkt werde ich mir zunächst die GSH-Depletion, Phytotoxizität und Proteinaggregationen anschauen. Es würde sich hierbei um die erste Beschreibung des molekularen Wirkmechanismus der Dihydroxybenzene in Pflanzen handeln.

Mit all diesen Erkenntnissen ist es dann möglich, ein umfassendes Bild von der Wirkungsweise der DHB aufzuzeigen und näher zu evaluieren, ob diese den Weg für eine neue Generation an Herbiziden bereiten können oder aber als Modulatoren neben anderen bereits existierenden Herbiziden eingesetzt werden können.

6 Danksagungen

Ich danke **Dr. Jose Carlos dos Santos** für die großartige Betreuung, die Unterstützung in der Versuchsplanung und der chemischen Analytik und das Korrekturlesen, **Nora Ueberrhein** für die Betreuung, organisatorische Unterstützung und das Korrekturlesen, **Dr. Markus Wirtz** für die hilfreiche Betreuung und dies Unterstützung bei der Versuchsplanung, **Prof. Dr. Rüdiger Hell** für die Möglichkeit im COS, Heidelberg das Gewächshaus und die Labore nutzen zu können, **Michael Schilbach** für die Unterstützung bei den Arbeiten im Gewächshaus, **Anja Klefenz** für die Möglichkeit im Life Science Lab, DKFZ, Heidelberg das Labor nutzen zu können, **Andrea Breuer** für die Unterstützung bei der Durchführung und Planung der HPLC/MS und Säulenchromatografie, **Prof. Dr. Robert Owen** für die Möglichkeit die Analytik in der ehemaligen präventiven Onkologie, DKFZ, Heidelberg nutzen zu können, **Stefan Hinkes** für die Möglichkeit die NMR am IPMB, Heidelberg nutzen zu können und die Unterstützung bei der NMR, **Prof. Dr. Uri Alon** für die Bereitstellung des verwendeten Programmcodes für das Dose-Model und **PD Dr. Roger Vogelmann** für das Korrekturlesen.

Finanzielle Unterstützung erhielt ich über das Programm mikro-makro der **Baden-Württemberg Stiftung**, die **Berdelle-Hilge Stiftung** und das Programm anschub2020 der **Sparkasse Vorderpfalz**.

Literatur

- [1] Zwerger, P. & Ammon, H. U. (eds.) *Unkraut - Ökologie und Bekämpfung* (Ulmer, Stuttgart (Hohenheim), 2002).
- [2] Bruinsma, J. The resource outlook to 2050: By how much do land, water and crop yields need to increase by 2050? *How to feed the World in 2050. Proceedings of a technical meeting of experts, Rome, Italy, 24-26 June 2009* 1–33 (2009).
- [3] Relyea, R. A. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. *Ecological Applications* **15**, 618–627 (2005).
- [4] Portier, C. J. *et al.* Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Food Safety Authority (EFSA). *J Epidemiol Community Health* **70**, 741–745 (2016).
- [5] Cullimore, D. R. Interaction between herbicides and soil microorganisms. In Gunther, F. A. (ed.) *Residue Reviews / Rückstands-Berichte*, 65–80 (Springer New York, New York, NY, 1971).
- [6] Adler, J. The growing menace from superweeds. *Scientific American* **304**, 74–79 (2011).
- [7] Harker, K. N. *et al.* Our View. *Weed Science* **60**, 143–144 (2012).
- [8] Rüegg, W. T., Quadranti, M. & Zoschke, A. Herbicide research and development: Challenges and opportunities. *Weed Research* **47**, 271–275 (2007).
- [9] Topal, S., Kocaçalıskana, I. & Arslan, O. Herbicidal Potential of Catechol as an Allelochemical. *Zeitschrift für Naturforschung C* **61**, 69–73 (2006).
- [10] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer & World Health Organization. *Re-Evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide*. (IARC ; [Distributed by IARC Press, Lyon, France; Geneva, 1999]).
- [11] International Agency for Research on Cancer Staff, World Health Organization Staff & International Agency for Research on Cancer (IARC). *Some Fumigants, the Herbicides 2, 4-D and 2, 4, 5-T, Chlorinated Dibenzodioxins and Miscellaneous Industrial Chemicals*. (World Health Organization Stylus Publishing, LLC [distributor, Geneva; Herndon, 1977]).
- [12] National Toxicology Program. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Resorcinol (CAS No. 108-46-3) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *National Toxicology Program Technical Report Series* **403**, 1–234 (1992).
- [13] National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Hydroquinone (CAS No. 123-31-9) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *National Toxicology Program Technical Report Series* **366**, 1–248 (1989).
- [14] Putnam, A. R. Allelochemicals from Plants as Herbicides. *Weed Technology* **2**, 510–518 (1988).
- [15] Głab, L., Sowiński, J., Bough, R. & Dayan, F. E. Chapter Two - Allelopathic Potential of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in Weed Control: A Comprehensive Review. In Sparks, D. L. (ed.) *Advances in Agronomy*, vol. 145, 43–95 (Academic Press, 2017).

- [16] Chotsaeng, N., Laosinwattana, C. & Charoenying, P. Herbicidal Activities of Some Allelochemicals and Their Synergistic Behaviors toward Amaranthus tricolor L. *Molecules* **22**, 1841 (2017).
- [17] Alsaadawi, I. S. & Sarbout, A. K. Reducing herbicide rate in combination with allelopathic sunflower residues for weed control in cowpea. *J. Allelochemical Interact* **2**, 9–16 (2015).
- [18] Sütfeld, R., Petereit, F. & Nahrstedt, A. Resorcinol in exudates of *Nuphar lutea*. *Journal of Chemical Ecology* **22**, 2221–2231 (1996).
- [19] Hebeda, C. B. *et al.* Intracellular mechanisms of hydroquinone toxicity on endotoxin-activated neutrophils. *Archives of Toxicology* **86**, 1773–1781 (2012).
- [20] Oikawa, S. Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol. *Carcinogenesis* **22**, 1239–1245 (2001).
- [21] Lima, R. M. F. *et al.* Cytotoxic effects of catechol to neuroblastoma N2a cells. *General Physiology and Biophysics* **27**, 306–314 (2008).
- [22] György, L., Ross, D. & Bodell, W. J. Peroxidase activation of hydroquinone results in the formation of DNA adducts in HL-60 cells, mouse bone marrow macrophages and human bone marrow. *Carcinogenesis* **14**, 2329–2334 (1993).
- [23] Oliveira, N. & Kalf, G. Induced differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells to monocyte/macrophages is inhibited by hydroquinone, a hematotoxic metabolite of benzene. *Blood* **79**, 627–633 (1992).
- [24] Moran, J. L., Siegel, D., Sun, X. M. & Ross, D. Induction of apoptosis by benzene metabolites in HL60 and CD34+ human bone marrow progenitor cells. *Molecular Pharmacology* **50**, 610–615 (1996).
- [25] Stoyanovsky, D., Goldman, R., Claycamp, H. & Kagan, V. Phenoxy Radical-Induced Thiol-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species: Implications for Benzene Toxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **317**, 315–323 (1995).
- [26] Gottlieb, A. J. & Wurzel, H. A. Protein - Quinone Interaction: In Vitro Induction of Indirect Antiglobulin Reactions With Methyldopa. *Blood* **43**, 85–97 (1974).
- [27] Bolt, H. & Kappus, H. Irreversible binding of ethynodiol metabolites to protein and nucleic acids as catalyzed by rat liver microsomes and mushroom tyrosinase. *Journal of Steroid Biochemistry* **5**, 179–184 (1974).
- [28] Einhellig, F. A. Interactions Involving Allelopathy in Cropping Systems. *Agronomy Journal* **88**, 886–893 (1996).
- [29] Williamson, G. B., Obee, E. M. & Weidenhamer, J. D. Inhibition of *Schizachyrium scoparium* (poaceae) by the allelochemical hydrocinnamic acid. *Journal of Chemical Ecology* **18**, 2095–2105 (1992).
- [30] Duke, S. O., Williams, R. D. & Markhart, A. H. Interaction of Moisture Stress and Three Phenolic Compounds on Lettuce Seed Germination. *Annals of Botany* **52**, 923–926 (1983).
- [31] Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carver, B. F. & Mornhinweg, D. W. Water Relations in Winter Wheat as Drought Resistance Indicators. *Crop Science* **28**, 526–531 (1988).
- [32] Linster, E. *et al.* Downregulation of N-terminal acetylation triggers ABA-mediated drought responses in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **6**, 7640 (2015).
- [33] Robertson, M. L., Eastmond, D. A. & Smith, M. T. Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **249**, 201–209 (1991).
- [34] Kolachana, P., Subrahmanyam, V. V., Meyer, K. B., Zhang, L. & Smith, M. T. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo. *Cancer Research* **53**, 1023–1026 (1993).
- [35] Zhang, J., Hamill, A. S. & Weaver, S. E. Antagonism and Synergism Between Herbicides: Trends from Previous Studies. *Weed Technology* **9**, 86–90 (1995).
- [36] Colby, S. R. Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations. *Weeds* **15**, 20 (1967).
- [37] Blouin, D. C., Webster, E. P. & Zhang, W. Analysis of Synergistic and Antagonistic Effects of Herbicides Using Nonlinear Mixed-Model Methodology. *Weed Technology* **18**, 464–472 (2004).
- [38] Zimmer, A., Katzir, I., Dekel, E., Mayo, A. E. & Alon, U. Prediction of multidimensional drug dose responses based on measurements of drug pairs. *PNAS* **113**, 10442–10447 (2016).
- [39] Chou, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews* **58**, 621–681 (2006).

- [40] Prinz, H. Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. *Journal of Chemical Biology* **3**, 37–44 (2010).
- [41] Hill, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *The Journal of Physiology* **40**, i–vii (1910). <http://jp.physoc.org/content/40/supplement/i.full.pdf+html>.
- [42] Bliss, C. I. The calculation of microbial assays. *Bacteriological Reviews* **20**, 243–258 (1956).
- [43] Belden, J. B., Gilliom, R. J. & Lydy, M. J. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated Environmental Assessment and Management* **3**, 364–372 (2007).
- [44] Bouchabke, O. *et al.* Natural Variation in *Arabidopsis thaliana* as a Tool for Highlighting Differential Drought Responses. *PLoS ONE* **3**, e1705 (2008).
- [45] Davis, J., Vaughan, D. H. & Cardosi, M. F. Detection and quantitative determination of catechol derivatives using an iron(III)–ethylene-diamine visible absorbance assay. *Anal. Proc.* **32**, 423–426 (1995).
- [46] Xiao, P. *et al.* Highly selective colorimetric determination of catechol based on the aggregation-induced oxidase-mimic activity decrease of $\delta\text{-MnO}_2$. *RSC Advances* **10**, 6801–6806 (2020).
- [47] Das Gupta, V. Quantitative Determination of Resorcinol in Presence of Phenol. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **65**, 144–145 (1976).
- [48] Lynch, B. S., Delzell, E. S. & Bechtel, D. H. Toxicology Review and Risk Assessment of Resorcinol: Thyroid Effects. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **36**, 198–210 (2002).
- [49] Welsch, F., Nemec, M. D. & Lawrence, W. B. Two-Generation Reproductive Toxicity Study of Resorcinol Administered Via Drinking Water to Crl:CD(SD) Rats. *International Journal of Toxicology* **27**, 43–57 (2008).