

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich 09: Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung II

Professur für Organischen Landbau

Masterarbeit

Keimungsverhalten von *Lolium perenne* unter Einfluss von Isoflavonen und Rotklee-Extrakten mit Berücksichtigung verschiedener Extraktionsverfahren

Erstprüfer:

Prof. Dr. Günter Leithold

Zweitprüfer:

Prof. Dr. Harald Laser

Verfasserin:

Alexandra Sabine Wening

Gießen, September 2009

Inhaltsverzeichnis

TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	2
1 EINLEITUNG	3
2 LITERATURÜBERSICHT	4
2.1 <i>TRIFOLIUM PRATENSE</i> L.	4
2.2 <i>LOLIUM PERENNE</i> L.	6
2.3 ISOFLAVONE	7
2.4 ASCORBINSÄURE	10
2.5 METHANOL	11
2.6 KEIMUNG	13
2.7 ARBEITSHYPOTHESE	15
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 MATERIAL	17
3.1.1 <i>Verwendetes Material</i>	17
3.1.2 <i>Varianten</i>	17
3.1.3 <i>Versuchsaufbau</i>	18
3.2 METHODEN	19
3.2.1 <i>Extraktion der Isoflavone</i>	19
3.2.2 <i>Auszählen der gekeimten Samen</i>	20
3.2.3 <i>Statistische Auswertung</i>	21
4 ERGEBNISSE	22
4.1 KEIMUNGSRATE	22
4.2 KEIMUNGSGESCHWINDIGKEIT.....	24
4.3 WEITERE BEOBACHTUNGEN	27
5 DISKUSSION	29
5.1 EINFLUSS DER LICHTSTRATEGIE	29
5.2 EINFLUSS DER VERDÜNNUNGSSTUFEN	30
5.3 EINFLUSS DES EXTRAKTIONSVERFAHRENS (LÖSUNGSMITTELS)	32
5.4 GESAMTBETRACHTUNG	34
6 ZUSAMMENFASSUNG	36
7 QUELLENVERZEICHNIS	38
8 ANHANG	41
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	60

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht Nullvarianten.....	18
Tabelle 2:	Versuchsplan, Varianten angelegt als Blockanlage mit vier Wiederholungen.....	18
Tabelle 3:	Keimungsrate am Ende des Versuches (Mittelwerte in [%]).....	22
Tabelle 4:	Keimungsrate am Ende des Versuches (Tag 21) (Mittelwerte in [%]) – Mittelwerte über die Verdünnungsstufen.....	24
Abbildung 1:	Rotklee.....	4
Abbildung 2:	Ausgewählte Isoflavon-Aglycone, welche im Rotklee nachgewiesen wurden.....	5
Abbildung 3:	<i>Lolium perenne</i> L.....	6
Abbildung 4:	Flavonoidbiosynthese.....	9
Abbildung 5:	Strukturformel der L-Ascorbinsäure.....	10
Abbildung 6:	Strukturformel des Methanols.....	11
Abbildung 7:	Abgabe des Methanols aus dem Blatt.....	12
Abbildung 8:	Methanolbildung aus Pektin.....	12
Abbildung 9:	Zeitlicher Ablauf der Ereignisse während und nach der Keimung...	13
Abbildung 10:	Kiste der Lichtvariante.....	18
Abbildung 11:	Gekeimte Samen.....	20
Abbildung 12:	Einfluss des Vitamin C-Zusatzes und des Extraktionsverfahrens (Methanolbelastung) auf die Keimungsrate der Nullvarianten am Ende des Versuches; Mittelwerte in [%].....	23
Abbildung 13:	Keimgeschwindigkeit der Variante „Kapsel“ (= käufliches Isoflavonpräparat aus der Apotheke (enthält Vitamin C)) (in Tagen).....	25
Abbildung 14:	Keimgeschwindigkeit der Variante „Rotkleextrakt“ (in Tagen).....	26
Abbildung 15:	Keimgeschwindigkeit der Nullvarianten (in Tagen).....	27

1 Einleitung

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind vielseitige Verbindungen, die die unterschiedlichsten Auswirkungen auf Organismen erzielen können. Sie stehen im Blickpunkt der Forschung und werfen immer neue Perspektiven auf.

Isoflavone, die zur Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe gehören, sind als Phytohormone bekannt. Pflanzenhormone dienen vor allem dem Wachstum, der Regeneration und zur Regelung anderer physiologischer Abläufe. Daraus entstand die Idee, ob Isoflavone zur Verbesserung des Keimungsvorganges beitragen könnten, so wie zum Beispiel Cytokinine oder Gibberelline dem Saatgut zugesetzt werden, um diesen Vorteil zu erreichen. Der Ökologische Landbau könnte davon profitieren, indem man die hohen Isoflavongehalte des Rotklee für die Keimverbesserung von Saatgut nutzt.

Auf der anderen Seite stand im Raum, ob die Isoflavone eventuell ein weiterer Grund für das Phänomen der sog. „Kleemüdigkeit“ sind. Demnach könnten sie keimhemmende Wirkung und weitere negative, allelopathische Effekte aufweisen.

Hintergrund dieser Arbeit ist daher auch der Anbau von Futterleguminosen und im speziellen von Klee gras gemengen, die gerade im Ökologischen Landbau eine tragende Rolle in der Fruchtfolge spielen und ein bewährtes Futtermittel in der Rinderhaltung sind. Daher ist es also wichtig, diese Art von Anbausystem weiterhin zu verbessern, indem Wechselwirkungen zwischen diesen unterschiedlichen Familien Leguminose und Süßgras untersucht werden.

Nach vorangegangenen Vorversuchen wurde deshalb in dieser Arbeit die Beziehung zwischen Isoflavonen, die vor allem bei Leguminosen vorkommen, und der Keimung von Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne* L.) untersucht. Es sollte herausgefunden werden, ob Isoflavone des Rotklee (*Trifolium pratense* L.) Einfluss auf den Keimungsvorgang nehmen. Außerdem stellte sich die Frage, mit welchen Methoden dieser Versuch zu verwirklichen sei, da bisher keine derartigen Studien dazu veröffentlicht wurden.

Analysenmethode werden unterschiedliche Isoflavongehalte bzw. -konzentrationen in der Literatur aufgeführt.

Nach TSAO et al. (2006) enthält die Gesamtpflanze, die Blüte und die Wurzel ausgenommen, eine Konzentration von 17,21 mg Isoflavon/g TM (= 1,72 % (w/w)). Die durchschnittliche Konzentration der Blätter lag bei 23,43 mg/g TM. Danach folgten Sprossachse, Blattstiele und Blüte mit jeweils 14,71 mg/g TM, 13,50 mg/g TM und 2,38 mg/g TM. Bei Untersuchungen von WU et al. (2003) zeigten sich Konzentrationen zwischen 0,31 und 0,63 % (w/v) für die Blüte, zwischen 1,36 und 2,85 % für die Wurzel, zwischen 1,06 und 1,85 % in der Sprossachse und 1,75 und 2,27 % an Isoflavonen in den Blättern ermittelt wurden. SIVESIND und SEGUIN (2005) stellten folgende Isoflavonkonzentrationen in den einzelnen Pflanzenteilen fest: Blätter 12,0 mg/g TM, Sprossachse 4,9 mg/g TM und 3,3 mg/g TM für den Blütenstand. Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von VETTER (1995), der bei seinen Versuchen die höchste Konzentration an Isoflavonen in den Blüten fand (1,21 mg/g TM), gefolgt von den Blättern (1,07 mg/g TM) und am wenigsten in der Sprossachse (0,74 mg/g TM). Außerdem prüften SIVESIND und SEGUIN (2005) den Einfluss von Konservierungsmaßnahmen auf den Isoflavongehalt. Dabei kam heraus, dass durch Silierung oder Heubereitung die Konzentration abnahm (frische Pflanzen: 14,5 mg/g TM, Silage 12,2 mg/g, Heu 11,6 mg/g TM).

Die Isoflavonkonzentration hängt nicht nur vom Pflanzenteil und der Konservierung ab, sondern laut SIVESIND und SEGUIN (2005) auch stark von der jeweiligen Rotkleesorte und dem Nutzungszeitpunkt, also dem Reifegrad. Je nach Sorte stellten sie Schwankungen von 1,5 bis zu 16,8 mg/g TM an Gesamtisoflavonkonzentration fest. Allerdings sind diese Schwankungen innerhalb der Sorten konstant. Aber auch umweltbedingte Effekte, wie zum Beispiel die Temperatur, spielen eine

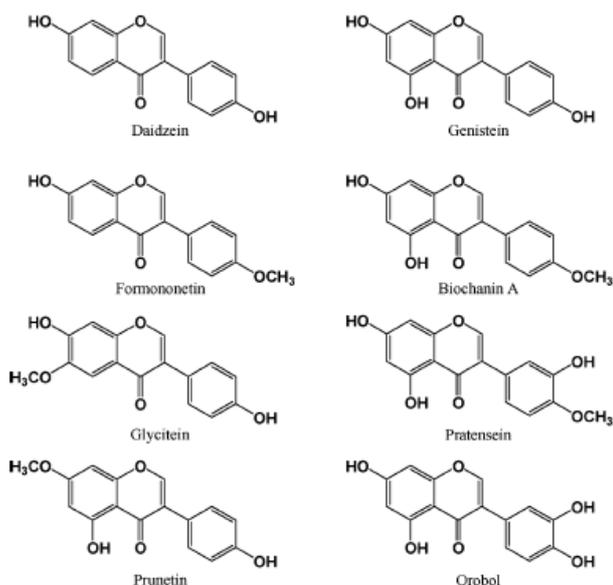


Abbildung 2: Ausgewählte Isoflavon-Aglycone, welche im Rotklee nachgewiesen wurden

Rolle. Außerdem kann die Methode ebenso Grund für die Schwankungen zwischen den einzelnen Untersuchungen sein. Je nach dem, welche Isoflavone untersucht worden sind, ergeben sich z. B. unterschiedliche Gesamtisoflavonkonzentrationen. Eine Auswahl an Isoflavonen, die im Rotklee gefunden wurden, zeigt die Abb. 2 aus TSAO et al. (2006). Formononetin und Biochanin A sind laut TSAO et al. (2006) die Isoflavone, die im Rotklee das Isoflavonspektrum dominieren.

Der Isoflavongehalt jeder Rotkleepflanze wird folglich durch viele verschiedene Einflüsse beeinträchtigt. Durch Züchtung wird man in Zukunft Sorten mit hohem oder niedrigem Isoflavongehalt erstellen, die entweder zur industriellen Gewinnung von Nahrungsergänzungsmitteln oder als Futtermittel genutzt werden können (SIVESIND und SEGUIN, 2005) (vgl. 2.3 Isoflavone).

2.2 *Lolium perenne* L.

Das Deutsche Weidelgras (*Lolium perenne* L.), auch Englisch Raigras genannt, ist das ökonomisch bedeutsamste Gras in Mitteleuropa. Über seine Gehalte an Isoflavonen ist nichts bekannt, jedoch dürften diese weit unter denen des Rotkleees liegen. Es ist ein locker bis dicht horstiges, ausdauerndes Untergras, das bis zu 90 cm hoch werden kann. Die Blätter sind intensiv grün und unbehaart, an der Spitze gekielt und unterseitig stark glänzend. Das jüngste Blatt ist immer gefaltet. Die unterbrochene, echte Ähre, die aufrecht oder leicht gekrümmt ist, bildet den Blütenstand. Die platten, unbegrannten Ährchen sitzen abwechselnd, mit der Schmalseite zur Achse gerichtet, auf den gegenüberliegenden Seiten der Achse (HUBBARD, 1985; HANUS et al., 2008) (vgl. Abb. 3)². Der Ursprung des Weidelgrases liegt wahrscheinlich im Mittelmeerraum und im westlichen Asien (HANUS et al., 2008). Es gehört zu den wichtigsten Ackergräsern und hat in frischen bis mäßig feuchten Lagen, auf



Abbildung 3: *Lolium perenne* L.

² Abbildung 3 aus: www.lfl.bayern.de/ipz/gruenland/33526/index.php

mittelschweren bis schweren, fruchtbaren Böden seinen bevorzugten Standort. Dem Weidelgras kann gerade auf hängigen Ackerschlägen der Vorrang vor dem Mais gegeben werden (HANUS et al., 2008; DIEPENBROCK et al., 2005). Je nach Standort besteht die Gefahr der Auswinterung (HANUS et al. 2008). *Lolium perenne*, ein Lichtkeimer, keimt schnell, besitzt eine hohe Konkurrenzkraft, bildet trittfeste Grasnarben und ist vielschnittverträglich (vier- bis achtmal pro Jahr). Je nach Nutzung werden verschiedene Sorten vertrieben, so gibt es Sorten für das Grünland, die vor allem ausdauernd sind, und andere für den Feldfutterbau, die ertragreich und früh sind, um sich gut im Gemengeanbau mit Leguminosen einzufügen (HANUS et al. 2008). Das Deutsche Weidelgras ist vernalisationsbedürftig und gehört den Langtagpflanzen an. Bei einer Wertzahl von 8 ist es, bei richtigem Schnittregime, den Futterpflanzen mit höchster Qualität zuzuordnen (HANUS et al. 2008). Es kann außerdem problemlos siliert werden.

2.3 Isoflavone

Zu der Gruppe der Flavonoide, die die größte Einheit an Sekundärmetaboliten darstellt (DE RIJKE et al. 2004), gehören auch die Isoflavone. Sie sind eine Untergruppe der Isoflavonoide, die zu der Klasse der 3-Benzopyrane gehören (MARAIS et al., 2006). Es sind also biphenole, relativ hoch hydrophobische Verbindungen, die hauptsächlich in der Familie der Fabaceae auftreten.

Bekannt sind die Isoflavone aber vor allem durch ihre gesundheitsfördernde Wirkung beim Menschen. Es wird ihnen nachgesagt, dass sie das Risiko an bestimmten Krebsarten, hierzu gehören Brustkrebs oder auch Prostatakrebs, zu erkranken, reduzieren. Isoflavone schützen vor koronaren Herzerkrankungen, indem sie LDL und HDL (low-/high-density lipoprotein) reduzieren und haben weitere positive Auswirkungen auf verschiedene andere physiologische Prozesse (YU und McGONIGLE, 2005). So vermindern sie postmenopausale Symptome. Isoflavone besitzen eine phytoöstrogene Wirkung auf den Organismus. Sie verhalten sich dem Östrogen gegenüber sowohl agonistisch als auch antagonistisch, abhängig vom Gewebe (YU und McGONIGLE, 2005). Es entstehen dadurch pro- aber auch antiöstrogene Effekte, da die Phytoöstrogene mit dem körpereigenen 17- β -Estradiol konkurrieren (MÜLLER et al., 2001).

Aber es wurden auch Nachteile festgestellt, die auf die Isoflavone zurückzuführen sind. So wurden Schimpansen steril, denen eine Nahrung gefüttert wurde, die auf Soja basierte. Hingegen Tiere, denen tierisches Eiweiß gefüttert wurde, blieben fertil (YU und

McGONIGLE, 2005). Bei anderen Tieren ist das Phänomen der Sterilität ebenfalls aufgetreten. So können durch die phytoöstrogene Wirkung Fruchtbarkeitsstörungen, vor allem bei Schafen, durch übermäßigen Verzehr isoflavonhaltiger Pflanzen hervorgerufen werden (JEROCH et al., 1999). Die Mikroorganismen im Pansen können die Isoflavone so verändern, dass auch ihre phytoöstrogene Wirkung verstärkt oder abgeschwächt wird. Charakteristisch für diese Fruchtbarkeitsstörungen ist eine zystische, glanduläre (an einer Drüse) Hyperplasie (übermäßige Zellbildung) im Gebärmutterhals und in der Gebärmutter (DICKINSON et al., 1988). Es treten aber auch u. a. Zyklusstörungen, Zystenbildung oder Aborte auf (ULBRICH et al. 2004).

Bei Schlachtlämmern konnte eine erhöhte Zunahme beobachtet werden, wenn sie mit Rotklee gefüttert wurden, der hohe Konzentrationen an Formononetin enthielt, im Gegensatz zu denen, denen Weidelgras gefüttert wurde. Das Problem der Sterilität kann bei Schlachttieren vernachlässigt werden (MOORBY et al., 2004).

In der Pflanze sind die Isoflavone für die Abwehr zuständig. Sie sind an der Ausschüttung von Phytoalexinen beteiligt und die Isoflavonoidproduktion korreliert mit der Krankheitsresistenz einer Pflanze positiv. Eine weitere Aufgabe der Isoflavone ist die Signalübertragung an die symbiontischen Bodenrhizobien, um der Pflanze zur Symbiose zu verhelfen (YU und McGONIGLE, 2005).

Isoflavone werden über den Phenylpropaniodweg synthetisiert (vgl. dazu Abb. 4)³. Gespeichert werden sie in der Vakuole (TOEBES et al. 2005).

Auf dem gleichen Syntheseweg werden auch andere Verbindungen, wie z.B. Aurone, Flavonole oder auch Anthocyane gebildet (LEPINIEC et al., 2006).

Bei Untersuchungen von DEBEAUJON et al. (2000) konnte bei Arabidopsis-Mutanten festgestellt werden, denen die Gene fehlten, die Enzyme in der Flavonoidsynthese codieren, in Zusammenhang mit einer reduzierten Samendormanz stehen.

BROWN et al. (2001) prüften die Hypothese, ob Flavonoide als endogene Regulatoren für den Auxintransport zuständig sind. Sie verglichen hierbei den Wildtyp von Arabidopsis mit einer Mutante, die sich als Nullmutante in der Flavonoidbiosynthese herausgestellt hat. Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Wildtypen, die auf Agarplatten mit Naringenin, einer Vorstufe der Flavonoide, angezogen wurden, eingeschränkt war. Das

³ Abbildung 4 aus: LEPINIEC et al. (2006)

erhöhte Aufkommen an Naringenin führte zu einer Hemmung des Auxineffluxes, wodurch die Wurzelelongation inhibiert wurde und Gravitropismus auftrat (BROWN et al. 2001). Auxin ist ein Phytohormon, das u. a. für die Embryogenese, die Organogenese, das Hypokotyl- und Wurzelstreckenwachstum und die apikale Dominanz zuständig ist (HELDT und PIECHULA, 2008). Der andere Teil des Versuches lag darin, die Mutante zu untersuchen. Sie zeigte auf Grund des Eingriffs in den Flavonoidbiosyntheseweg, einen erhöhten Auxintransport im Blütenstand und im Hypokotyl, der Veränderungen im Wuchs und in der Entwicklung der Pflanze zur Folge hatte (BROWN et al. 2001).

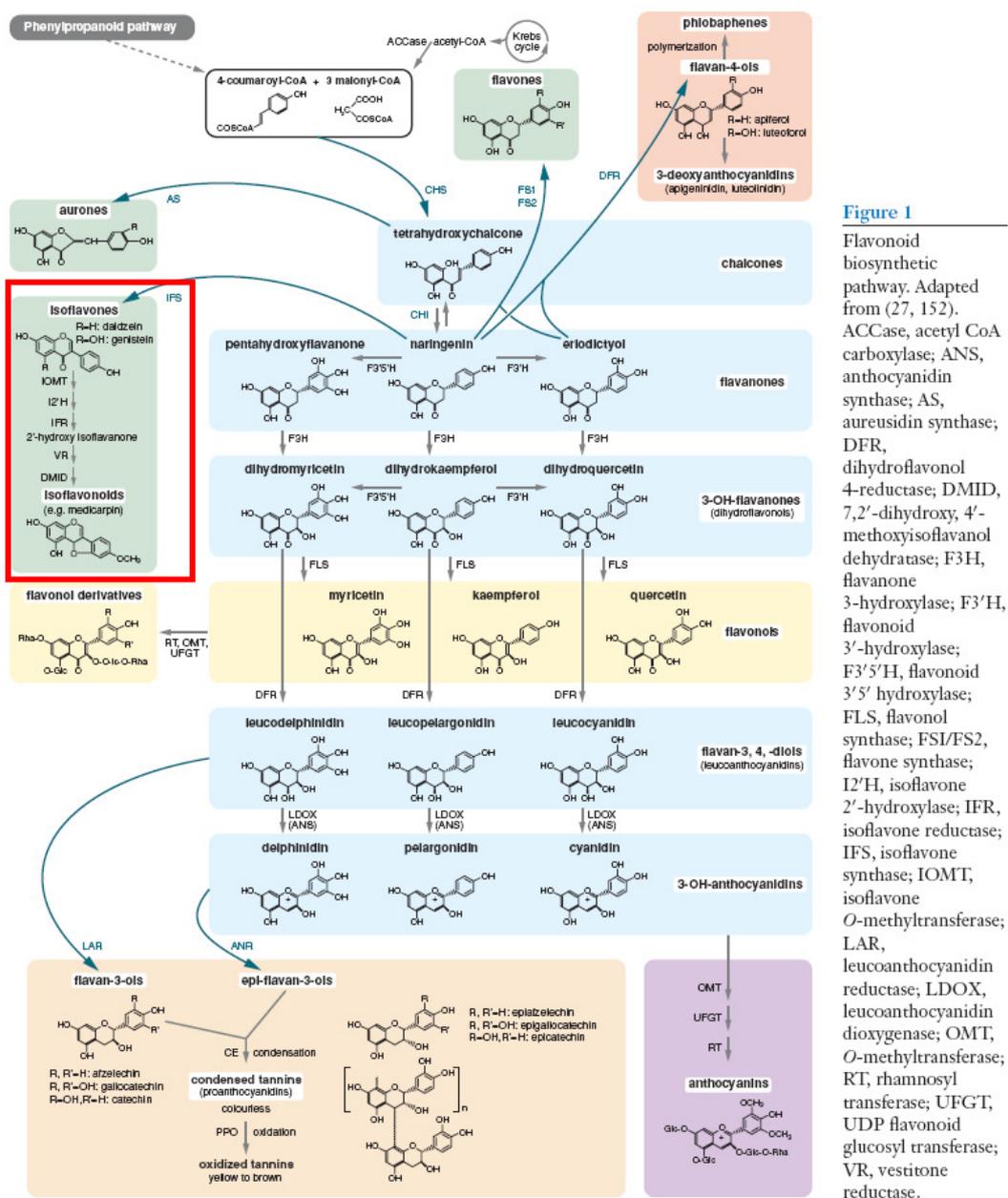


Abbildung 4: Flavonoidbiosyntheseweg

2.4 Ascorbinsäure

Als Isoflavonquellen wurden in diesem Versuch sowohl Rotklee, als auch ein Rotklee-Isoflavonprodukt aus der Apotheke genutzt. Dieses kostengünstig erhältliche Produkt enthält neben den Isoflavonen aber auch noch

Vitamin C, da es als Nahrungsergänzungsmittel für Frauen in der Menopause dient. Deshalb ist Vitamin C ein weiterer

Faktor in dieser Untersuchung, der näher betrachtet werden sollte. Ascorbinsäure (= Vitamin C) (vgl. Abb. 5) besitzt viele verschiedene Aufgaben in der Pflanze. So ist sie vor allem als Antioxidant bekannt, das die Pflanze vor UV-B-Strahlung und Schwefeldioxid schützt. Die Wirkung der Ascorbinsäure gegenüber dem Ozon ist noch umstritten (SMIRNOFF und WHEELER, 2000). Vitamin C fungiert weiterhin als Co-Faktor bei bestimmten Enzymen, so z. B. als Reduktionsmittel bei vielen 2-Oxoglutarat- und Fe(II)-abhängigen Oxygenasen. So spielen solche Enzyme eine Rolle bei der Flavonoid-, Alkaloid-, und Hydroxyprolinbiosynthese, sowie bei der Gibberellin- und Ethylenbiosynthese. Das Vitamin C dient aber auch als Vorstufe für die Oxalat- und Tartratsynthese (SMIRNOFF und WHEELER, 2000). Außerdem ist Ascorbinsäure an vielen anderen physiologischen Vorgängen in der Pflanze beteiligt. So kommt sie im Ablauf der Photosynthese vor, in photoprotektiven Systemen, wie dem Xanthophyllzyklus (als Co-Faktor der Violaxanthin-De-Epoxidase) und spielt eine Rolle im Zellwachstum. So wird vermutet, dass die Produkte der Ascorbatoxidation sich direkt auf die Zellexpansion auswirken (VELJOVIC-JOVANOVIC et al., 2001; SMIRNOFF und WHEELER, 2000).

Schon 1935 stellte HAVAS fest, dass geringe Mengen an Ascorbinsäure (0,01 – 0,05 %) sich positiv auf das Wachstum auswirken, jedoch höhere Konzentrationen (0,2 – 0,5 %) negative Effekte auf den Wuchs bzw. die Keimung zur Folge haben. FLAMME et al. (2003) fanden heraus, dass im ungekeimten Weizenkorn kein Vitamin C nachweisbar war, jedoch nach 48stündiger Keimung schon 30 mg synthetisiert worden waren. ISHIBASHI und IWAYA-INOUE (2006) bewiesen, dass durch exogen hinzugefügte Ascorbinsäure die Keimung von Weizensamen gehemmt wurde. Hierbei entstanden bei 50 mM (ca. 1 % (w/v)) Ascorbinsäure ähnliche inhibitorische Effekte wie bei 100 µM Abscisinsäure. Dabei war nicht der pH-Wert entscheidend für diese Wirkung, sondern es wird vermutet, dass H₂O₂, das die Keimungsrate in der Phase der Wasseraufnahme verstärkt, durch

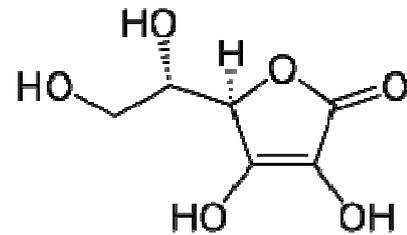


Abbildung 5: Strukturformel der L-Ascorbinsäure

das Antioxidant Ascorbinsäure abgefangen wird und somit die Keimung inhibiert wird (ISHIBASHI und IWAYA-INOUE, 2006).

2.5 Methanol

Methanol diente in diesem Experiment als Extraktionsmittel für die Isoflavone. Es wurden verschiedene Verfahren bei der Extraktion durchgeführt. In Abhängigkeit von der Methode wurde dadurch auch den Samen Methanol zugeführt. Daher ist Methanol eine weitere Komponente, die den Keimungsprozess beeinflussen könnte.

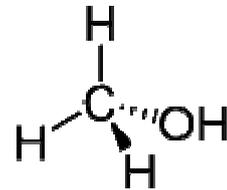


Abbildung 6:
Strukturformel des
Methanols

Methanol gehört zu den einwertigen Alkoholen (vgl. Abb. 6). Es ist eine farblose Flüssigkeit, die bei 65 °C siedet, bei -98 °C schmilzt

und bei 129 hPa verdampft (Temperatur: 20°C). Methanol kann in polaren Lösungsmitteln gelöst werden. Methanol selbst ist nicht sehr giftig, wohl aber die Produkte, die im menschlichen bzw. tierischen Körper entstehen: Formaldehyd und daraus Ameisensäure.

Bei bestimmten Pflanzen wurde bei einer Behandlung der Blätter mit Methanol eine wachstumsfördernde Wirkung festgestellt (ROWE et al., 1994; NONOMURA und BENSON, 1992), wobei die Konzentrationen zwischen 5 und 20 % v/v (ROWE et al. 1994), sowie 10-50 % (NONOMURA und BENSON, 1992) ausgetestet wurden.

In anderen Studien konnte Methanol als volatile Verbindung, die aus Blättern, Samen und Früchten abgegeben wird, entdeckt werden (GALBALLY et al., 2002; FISHER et al., 1979) (vgl. Abb. 7)⁴.

⁴ Abbildung 7 aus: GALBALLY et al., 2002

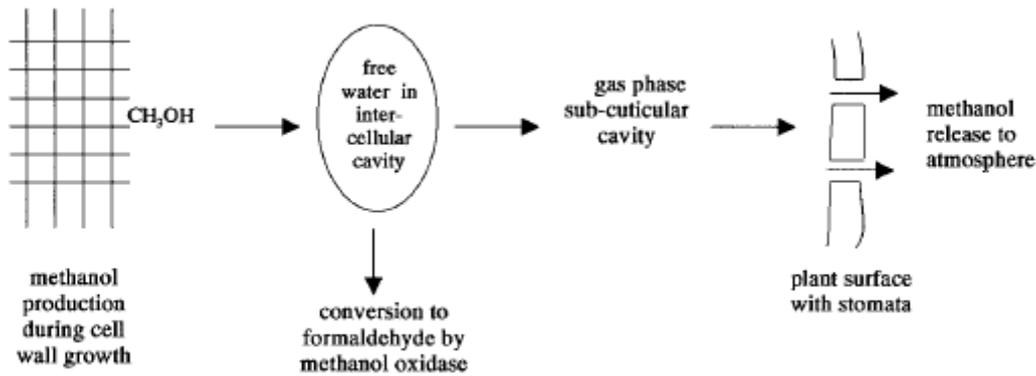


Figure 3. The release of methanol from within the leaf.

Abbildung 7: Abgabe von Methanol aus dem Blatt

FALL und BENSON (1996) legten in ihrer Forschungsarbeit dar, dass die meisten Pflanzen Methanol emittieren, da es ein Nebenprodukt des Pektinmetabolismus während der Zellwandsynthese ist (vgl. Abb. 8)⁵.

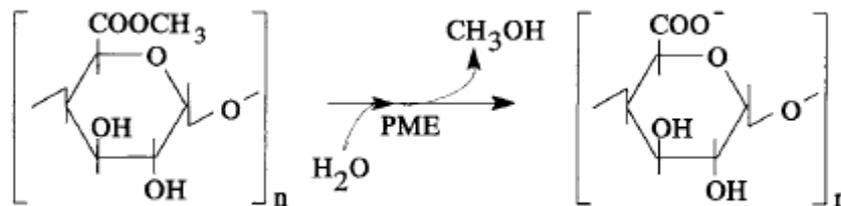


Figure 2. Formation of methanol from pectin.

Abbildung 8: Methanolbildung aus Pektin

Ein anderer Aspekt des Methanols im pflanzlichen Organismus zeigt sich bei Keimungsversuchen.

TAYLORSON und HENDRICKS (1979) machten Versuche zur Keimung der Gabelblütigen Hirse. Dabei prüften sie unter anderem die Wirkung von Methanol auf die Keimhäufigkeit des Ungrases. Sie konnten beweisen, dass mit zunehmender Konzentration und einer 5-minütigen Rotlichtbestrahlung die Keimungshäufigkeit von 11 % (v/v) (bei 10 µl MeOH/Kolben) auf 87 % (bei 100 µl MeOH/Kolben (entspricht ca. 0,04 % (v/v), wenn der Kolben 250 ml Fassungsvermögen aufweist) anstieg. Ähnliche Ergebnisse erzielten sie mit Ethanol. Dagegen konnten sie feststellen, dass bei Zugabe von Ethanol nach der

⁵ Abbildung 8 aus: GALBALLY et al., 2002

Wasseraufnahme und damit dem Keimungsvorgang von sieben Tagen dieser Alkohol Keimhemmung verursachte.

REYNOLDS (1977) untersuchte Effekte verschiedener Alkohole bei der Keimung von Eissalat der Sorte Great Lakes. Dabei zeigte sich bei zunehmender C-Kettenlänge eine zunehmende Keimhemmung. Methanol ist der „kürzeste“ Alkohol – daher liegt die Konzentration zur Keimhemmung von 50 % der Salatsamen bei 1275 mM (entspricht ca. 4 % (w/v)) (Ethanol 117 mM).

THIESS und LICHTENTHALER (1973) konnten bei *Raphanus*-Samen (Rettich) eine 100-prozentige Keimhemmung durch 10-prozentiges Methanol erkennen. Auch bei anderen Pflanzenarten konnten ähnliche Abläufe dokumentiert werden. Die Forscher gehen davon aus, dass die Alkohole mit Lipiden in der Biomembran miteinander interagieren, im Anschluss daran die Proteinsynthese inhibiert wird, und dass es auf Grund dessen das Wachstum gehemmt wird.

2.6 Keimung

Der Begriff der Keimung hat verschiedene Definitionen. So wird er bei BEWLEY (1997) als Ereignis definiert, dass mit der Wasseraufnahme des trockenen Samens beginnt und damit endet, dass ein Teil des Embryos, meist die Radicula, die umliegenden Strukturen durchbrochen hat. KUTSCHERA (2002) dagegen fasst die Definition weiter, in dem er

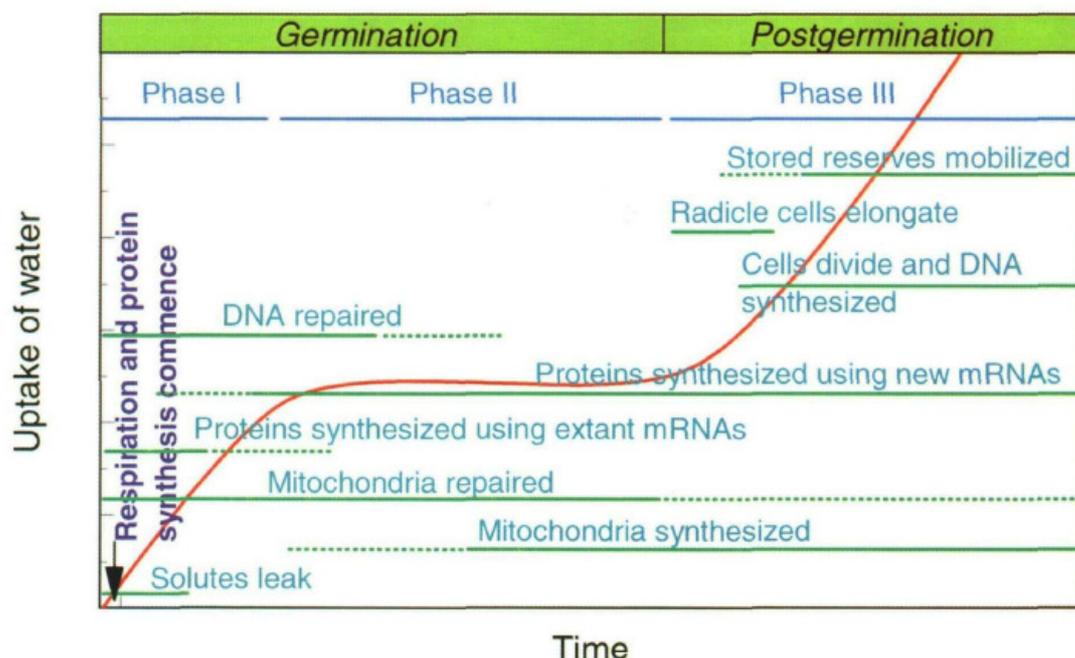


Abbildung 9: Zeitlicher Ablauf der Ereignisse während und nach der Keimung

sagt, dass alle Schritte mit eingeschlossen sind, die zur Entwicklung eines Keimlings, also einer jungen Pflanze, deren photoautotrophe Wachstumsphase bevorsteht, notwendig sind. Bevor die Keimung allerdings erfolgen kann, muss die innere (Dormanz) und die äußere (Quieszenz) Keimruhe bezwungen werden. Während die Dormanz durch Licht oder Kälte überwunden wird – sie wird in der Pflanze durch Abscisinsäure aufrecht erhalten – wird die Quieszenz mit Wasser aufgehoben (KUTSCHERA, 2002). Die Keimung kann laut KUTSCHERA (2002) in drei Phasen aufgeteilt werden.

Hierzu gehören die Quellung, das Wachstum des Embryos und der Abbau der Speicherstoffe (vgl. Abb. 9)⁶. Im Folgenden wird nun näher auf die Keimung einer Graskaryopse eingegangen, da der Keimungsversuch dieser Arbeit an Deutschem Weidelgras ausgeführt wurde.

Anatomisch gesehen ist der Samen eines Grases eigentlich eine Frucht, da die Testa mit dem Perikarp verwachsen ist. Der Einfachheit halber wird er hier weiterhin als Samen bezeichnet (KUTSCHERA, 2002).

Sobald die Quellung des Samens abgeschlossen ist, setzt der Embryo ein „Keimsignal“ ab, das wahrscheinlich durch das Phytohormon Gibberellinsäure vollzogen wird. Bevor die Synthese von hydrolytischen Enzymen beginnt, also etwa 48 Stunden später, hat mittlerweile die Atmung eingesetzt. Die Aktivität des glycolytischen und des oxidativen Pentose-Phosphat-Weg wird wieder aufgenommen und auch der Zitronensäurezyklus beginnt seine Tätigkeit neu. Außerdem werden die Mitochondrien repariert und neu aktiviert (bei ölhaltigen Samen werden sie neu produziert). Es folgt die Translation von vorgeformter sowie neu gebildeter m-RNA im Scutellum und den Aleuronzellen zu vor allem α -Amylase (vgl. Abb. 9). Diese Enzyme werden in das Endosperm abgegeben und beginnen mit der Hydrolyse der Stärke. Über das Scutellum wird der Embryo dann mit den Nährstoffen versorgt, die er zum Wachsen benötigt (KUTSCHERA, 2002; BEWLEY und BLACK, 1994). Mit Austritt der Primärwurzel, ist laut BEWLEY und BLACK (1994) die Keimung beendet und es folgen Entwicklungsabläufe, die der Keimung nachgestellt sind. Dieser Turgor-angetriebene Prozess der Elongation der Radicula hat drei mögliche

⁶ Abbildung 9 aus: BEWLEY J. D., 1997: Seed Germination and Dormancy. The Plant Cell 9, 1055-1066.

Ursachen. Die erste beruht darauf, dass das osmotische Potenzial auf Grund der Akkumulation von gelösten Stoffen negativer wird. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass die Dehnbarkeit der Keimwurzelzellwand die Ausdehnung erlaubt. Oder drittens, könnte es daran liegen, dass das Gewebe des Samens rund um die Wurzelspitze schwächer wird und so die Radicula wachsen kann.

KUTSCHERA (2002) bindet den Austritt des Primärblattes und dessen Wachstum zur Erdoberfläche, das bis dahin bei Gräsern von der Koleoptile geschützt wird, in den Keimungsprozess mit ein.

Es wird bei der Keimung grundsätzlich zwischen epigäischer und hypogäischer Keimung unterschieden. Bei der epigäischen Keimung sind die Keimblätter über der Erdoberfläche sichtbar, da das Hypokotyl wächst. Im Gegensatz dazu bleiben bei der hypogäischen Keimung die Keimblätter unter der Erde, da das Epikotyl, also der Abschnitt oberhalb der Cotyledonen, mit dem Wachstum beginnt (KUTSCHERA, 2002). Da das Keimblatt bei den Gräsern als Scutellum und der Koleoptile ausgebildet ist, werden die Gräser der hypogäischen Keimung zugeordnet.

Wenn der zeitliche Ablauf der Keimungshäufigkeit einer Population betrachtet wird, so tritt am vierten Tag eine Sättigung von 90 % gekeimter Samen ein. Die Keimkinetik jeder Population verläuft verschieden, jedoch statistisch gesehen immer in einer S-förmigen Sättigungskurve (KUTSCHERA, 2002).

2.7 Arbeitshypothese

Aus der Literatur lässt sich zusammenfassend feststellen:

- Rotkleepflanzen enthalten Flavonoide, die sowohl in der Physiologie von Säugetieren als auch in der Pflanze selbst wesentliche Effekte bewirken.
- Einige Gene, die Enzyme der Flavonoidsynthese codieren, stehen im Zusammenhang mit der Beeinflussung der Samendormanz.
- Phytohormone aus der Auxin-Gruppe, die u.a. die Embryogenese und Wachstumsprozesse steuern, werden durch Flavonoide beeinflusst.
- Methanol, ein wichtiges Mittel für die Extraktion von Isoflavonen aus Rotklee, kann die Ergebnisse von Keimversuchen beeinflussen.
- Kommerzielle Isoflavonpräparate könnten kostengünstig für Untersuchungen zur

Effekten von Isoflavonen auf Keimprozesse verwendet werden, beinhalten aber häufig Vitamin C, das in geringen Konzentrationen möglicherweise keimungsfördernd, in hohen Konzentrationen jedoch keimungshemmend wirkt.

Hieraus leiten sich nun folgende Hypothesen ab:

- Wie wirken sich die Isoflavongaben auf die Keimung aus?
- Wirkt sich das Verfahren der Extraktion von Isoflavonen aus Rotkleepflanzen auf eventuell vorhandene Effekte aus?
- Sind preisgünstige Isoflavonpräparate aus dem Reformhaus, meist mit Vitamin C ergänzt, für die Untersuchung des Einflusses auf die Keimung einsetzbar?
- Ist ein Unterschied zwischen den beiden Isoflavonquellen zu erkennen?
- Zeigen Ascorbinsäure (in den käuflichen Isoflavonpräparaten enthalten) und Methanol (Extraktionsmittel für die Gewinnung von Isoflavonen aus Rotkleepflanzen) keimfördernde, keimhemmende oder gar keine Effekte?
- Können Differenzen zwischen Licht- und Dunkelkeimung festgestellt werden?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendetes Material

Der Rotklee, der für die Extraktion genutzt wurde, stammte von einer Fläche des Gladbacher Hofes. Die Wuchshöhe der Pflanzen betrug zwischen 15 und 30 cm, einige blühten bereits. Die benötigte Menge wurde hierzu am 11.08.08 geschnitten bzw. gerupft.

Das Präparat „Minka Rotklee Isoflavone plus Vitamin C“ der Firma Karl Minck aus Rendsburg diente als konzentrierte Isoflavonquelle. Pro Kapsel waren 500 mg Rotklee enthalten. Darin waren eine Menge von 40 mg Isoflavonen und 30 mg Vitamin C enthalten.

Als Saatgut wurde Deutsches Weidelgras der Sorte Aberavon (2008) genutzt. Das Methanol mit dem extrahiert wurde, besaß HPLC-Qualität.

3.1.2 Varianten

Im Hauptversuch wurden 16 verschiedene Lösungen eingesetzt. Diese unterschieden sich in ihrer Isoflavonquelle, ihrem Lösungsmittel und in ihrer Konzentration. Als Isoflavonquelle wurden zum einen der oben genannte Rotklee genutzt, zum anderen das ebenfalls erwähnte Isoflavonpräparat in Kapselform. Die zwei Lösungsmittel waren 20%iges und 100%iges Methanol und die unterschiedlichen Konzentrationen wurden wie folgt gewählt: 100 ml Flüssigkeit/g Rotkleemehl bzw. Kapselinhalt (als konzentrierteste Version), 200 ml/g und 1000 ml/g, sowie ein Nullvariante. Dazu ist zu sagen, dass die Konzentrationen zwischen Kapsel und Rotkleeextrakt nicht verglichen werden können, da im Rotklee die Konzentration an Isoflavonen unbekannt blieb. Außerdem wurde zwischen einer Licht- und einer Dunkelvariante unterschieden (vgl. Tab. 2).

Die Nullvarianten, in denen keine Isoflavone enthalten sind, wurden wie folgt angesetzt:

Tabelle 1: Übersicht Nullvarianten

Nullvarianten zu entsprechenden Isoflavonquellen	„Kapsel“	„Rotkleeextrakt“
Extraktionsverfahren 1	20%iges Methanol + Ascorbinsäure	20%iges Methanol
Extraktionsverfahren 2	Wasser + Ascorbinsäure	Wasser

Tabelle 2: Versuchsplan, Varianten angelegt als Blockanlage mit vier Wiederholungen

Faktoren	Stufen
1 Isoflavonquelle	Rotklee Kapsel
2 Lösungsmittel	20%iges Methanol 100%iges Methanol
3 Konzentrationen	100 ml/g = Verdünnung 1:4 200 ml/g = Verdünnung 1:9 1000 ml/g = Verdünnung 1:49 Nullvariante
4 Licht	Licht Dunkel

3.1.3 Versuchsaufbau

Für den Keimungsversuch wurden alle Petrischalen gekennzeichnet und mit einem Rundfilterpapier versehen. Je 20 Samen wurden pro Petrischale eingezählt und anschließend, je nach Variante bei Licht oder bei schwachem Grünlicht für die Dunkelvariante, mit je 2 ml der entsprechenden Lösung befeuchtet. Alle Varianten hatten vier



Abbildung 10: Kiste der Lichtvariante

Wiederholungen, die in Blöcken angeordnet waren und innerhalb der Blöcke randomisiert vorlagen. Der Versuch umfasste insgesamt 128 Petrischalen, die auf zwei Kisten, eine mit

Plexiglasdeckel für die Lichtvariante, eine mit Holzdeckel für die Dunkelvariante, verteilt waren. Die Schalen wurden zufällig in den Kisten angeordnet und bei jeder Kontrolle neu verteilt, um ausgeglichene Bedingungen zu schaffen (vgl. hierzu Abb. 10).

Diese Kisten wurden in einem Klimaschrank der Versuchsstation Gladbacher Hof aufbewahrt, in dem ein Tag-Nacht-Programm von 16 h Licht bei 20 °C und 8 h Dunkelheit bei 10 °C gefahren wurde. Die Lichtquelle bestand aus zwei kreisrunden Neonröhren, die Temperatur wurde über ein im Schrank liegendes Thermometer überprüft. Zusätzlich wurden Schalen mit Wasser zur Luftbefeuchtung hineingestellt. Zu jedem Zähltermin wurden die gekeimten Samen entnommen und ihre Anzahl pro Petrischale notiert. Die Zähltermine erfolgten am Tag 1 nach Versuchsbeginn (Tag 0), sowie an Tag 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17 und 21.

3.2 Methoden

3.2.1 Extraktion der Isoflavone

Nach bisherigem Kenntnisstand wurden bisher keine Keimversuche mit extrahierten Isoflavonen durchgeführt. Die Extraktionsmethoden wurden daher von Arbeitsweisen abgeleitet, die zur Feststellung von Isoflavonkonzentrationen in Pflanzen konzipiert waren. Zu allererst wurde Rotklee von einem Feld des Versuchsbetriebes Gladbacher Hof geerntet. Dieser wurde in einem Trockenschrank bei 60 °C ungefähr 65 h getrocknet, anschließend gemahlen und in ein lichtdichtes Gefäß gefüllt. Die Trockenmasse des Rotkleees betrug nach der Trocknung 94,8 %. Die Isoflavonkapseln wurden geöffnet und deren Inhalt in einem separaten, ebenfalls lichtdichten Glas aufbewahrt. Der Kapselinhalt besaß eine Trockenmasse von 95,3 %. Es wurden je zehn Mal je 1g Rotkleemehl bzw. Isoflavonpräparat abgewogen und in kleine Reagenzgläser gefüllt. Zusätzlich wurde zehn Mal 0,06 g Ascorbinsäure abgewogen und ebenfalls in kleine Reagenzgläser gefüllt. Mit einem Dispenser wurden je 5 ml Lösungsmittel pro Probe dazugegeben. D. h. die eine Hälfte wurde mit 20%igem Methanol, die andere Hälfte der Reagenzgläser mit 100%igem Methanol befüllt. Alle Proben wurden im Vortexer geschüttelt und anschließend für je 30 s in einem Ultraschall-Bad behandelt. Danach kamen sie für 5 Minuten in die Zentrifuge bei Raumtemperatur und 7000 U/min. Der flüssige Überstand wurde abpipettiert und als

nächstes erneut wieder je 5 ml des gleichen Lösungsmittels hinzugefügt. Diese Arbeitsschritte wurden insgesamt viermal wiederholt, sodass am Ende 100 ml abpipettierte Lösung je Version vorhanden waren.

Ein Problem entstand bei der Version Rotkleemehl/20%iges Methanol, da das Gemisch zu sehr aufgeschwemmt war, um es vernünftig abpipettieren zu können. Selbst eine Erhöhung der Umdrehungszahl in der Zentrifuge reichte nicht aus, um eine entsprechende Komprimierung zu erhalten. Durch die Aufschwemmung der Teilchen konnte nicht genügend Lösung abgenommen werden, um erneut Lösungsmittel hinzuzufügen. Daher wurde diese Kombination erneut angesetzt. Diesmal wurde 10 x 0,5 g Rotkleemehl pro Reagenzglas abgewogen und je 2,5 ml des 20%igen Methanols dazugegeben. Weiter wurde wie oben verfahren, außer, dass die Umdrehungen in der Zentrifuge im Verlauf jeder „Runde“ angehoben wurden, um ein besseres Ergebnis zu bekommen (1. Runde 7000 U/min; 2. und 3. 8000 U/min und weitere zweimal bei 10000 U/min).

Die Lösungen, die mit 20%igem Methanol versetzt waren, wurden durch einen Faltenfilter filtriert.

Die Lösungen mit dem 100%igem Methanol wurden bis fast zur „Trockenheit“ abdestilliert und anschließend mit je 100ml Wasser aufgefüllt. Im Ultraschallbad wurden die Feststoffe vom Glas gelöst und danach, teilweise mehrmals mit verschiedenen Filtern, filtriert.

Abschließend erfolgte die Erstellung der Verdünnungsreihe. Von 100 ml Extrakt wurden 50 ml abgenommen mit 200 ml aufgefüllt, davon 125 ml wiederum abgenommen und mit 125 ml Wasser aufgefüllt und zum Schluss wurden nochmals 125 ml entnommen und mit 500 ml Wasser aufgefüllt. Im Vorversuch wurde mit allen Lösungen gearbeitet, im folgenden Hauptversuch wurde die konzentrierte Variante verworfen, da zu wenig Lösung übrig war.

3.2.2 Auszählen der gekeimten Samen

Zu jedem Zähltermin wurden die Schalen den Kisten entnommen und die Anzahl der gekeimten Samen festgehalten. Als gekeimt galten die Samen, bei denen der



Abbildung 11: Gekeimte Samen

Ansatz der Keimwurzel oder des Keimsprosses zu erkennen war (vgl. hierzu Abb. 11). Die Dunkelvarianten wurden bei schwachem Grünlicht ausgezählt. Die gekeimten Samen wurden mit einer Pinzette aus der Petrischale entfernt, um eine doppelte Zählung zu vermeiden und die Keimgeschwindigkeit errechnen zu können. Anschließend konnten die Versuchsgefäße wieder zufällig verteilt in ihre Kisten geräumt werden und im Klimaschrank bis zur nächsten Zählung verwahrt werden.

3.2.3 Statistische Auswertung

Um die Varianzursachen und deren Signifikanzen zu bestimmen, wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse mit SPSS for Windows Version 16.0 durchgeführt. Um eine Varianzanalyse durchführen zu können, mussten die Ergebnisse aber erst transformiert werden, um sie der Normalverteilung anzunähern. Dazu wurde eine Arcussinus-Wurzel-Formel ($y=(\arcsin(\sqrt{(x*0,01)})) * 180/\pi$) angewandt, die mit Microsoft Office Excel durchgerechnet wurde (siehe Anhangtabelle 6). Mit diesen Resultaten konnte anschließend die Varianzanalyse gemacht werden. Für die Abbildungen wurden die Werte ohne Transformation genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Keimungsrate

Die Keimungsrate der Weidelgrassamen wurde im Verlauf des Versuchs unterschiedlich stark von den Faktoren Isoflavonquelle, Verdünnung und Extraktionsverfahren beeinflusst. An Tag 1 war noch kein einziger der Samen gekeimt. Ab Tag 2 konnten sichtbar gekeimte Samen nachgewiesen werden. An allen Tagen und bei allen Faktorkombinationen, mit Ausnahme des Tags 2 bei Varianten mit Rotkleextrakt, konnte das Lösungsmittel als stärkste Varianzursache festgestellt werden, dies belegen die durchweg hohen MQ/F-Werte (vgl. hierzu Anhangtab. 1-4). Dies spiegelt sich in der Differenz von ca. 10 Prozentpunkten am Ende des Versuches wider, die jeweils bei beiden Isoflavonquellen im Vergleich der beiden Extraktionsverfahren auftraten (vgl. hierzu Tab. 3).

Tabelle 3: Keimungsrate am Ende des Versuches (Mittelwerte in [%])

	Verdünnung	Licht		Dunkel		Mittelwerte über die Extraktionsverfahren der „Kapsel“	Mittelwerte über die Extraktionsverfahren des „Rotklee“
		Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee		
Extraktionsverfahren 1	1:4	88,8	85,0	88,8	91,3		
	1:9	85,0	92,5	92,5	88,8		
	1:49	93,8	87,5	82,5	85,0		
	Nullvariante	30,0	62,5	8,8	81,1	71,3	81,7
Extraktionsverfahren 2	1:4	96,3	95,0	82,5	91,3		
	1:9	95,0	80,0	93,8	88,8		
	1:49	88,8	98,8	93,8	88,8		
	Nullvariante	66,3	83,8	32,5	93,8	81,1	90,0
Mittelwerte der Isoflavonquellen und Lichtstrategien		80,5	85,6	71,9	86,1		

Klare Signifikanzunterschiede sind auch bei den Nullvarianten bis zum Ende des Versuches hin deutlich zu erkennen (vgl. hierzu Abb. 12).

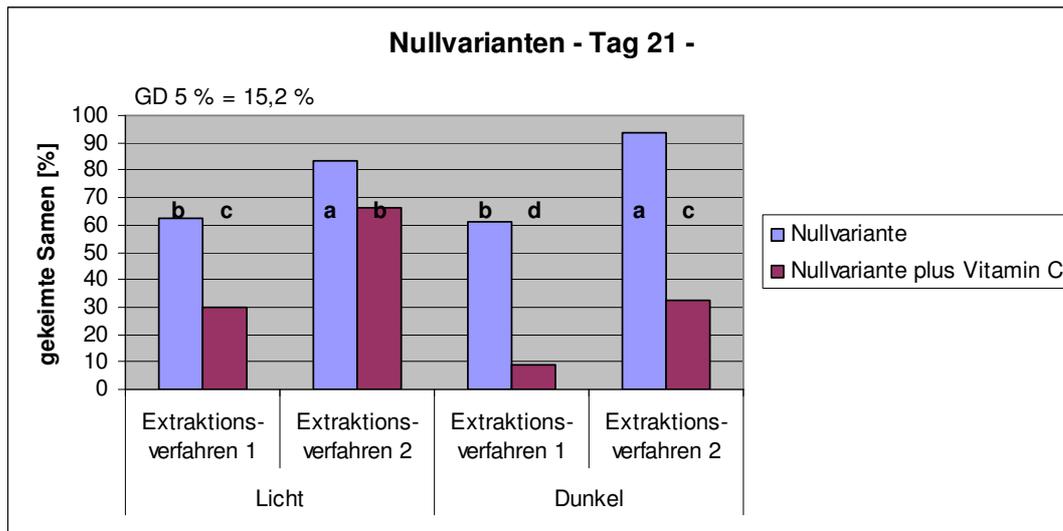


Abbildung 12: Einfluss des Vitamin C-Zusatzes und des Extraktionsverfahrens (Methanolbelastung) auf die Keimungsrate der Nullvarianten am Ende des Versuches; Mittelwerte in [%]

Bei den Versionen, die mit den Isoflavonen aus der Kapsel behandelt wurden, zeigte sich, dass auch hierbei die stärkste Varianzursache bei den Lösungsmitteln lag. Die zweitgrößte Varianzursache bildeten die Verdünnungsstufen, die drittgrößte die Interaktion zwischen Lösungsmitteln und Verdünnungsstufen. Eine Ausnahme bildet der Tag 2, an dem die Belichtung der zweitwichtigste und die Verdünnungsstufen der drittwichtigste Faktor war. Starke Unterschiede zeigen sich bei den Versuchen mit der Kapsel vor allem an den ersten Tagen, also Tag 2, 3 und 5. An diesen Abbildungen sind auch die Varianzursachen wiederum nachvollziehbar (vgl. Anhangabb. 1 Tage 2-5). Mit zunehmender Verdünnung nimmt hier die Keimungsrate beim Extraktionsverfahren 1 zu. Das Extraktionsverfahren 2 zeigt dies nicht (vgl. Anhangabb. 1 Tage 2-5). Ähnliche Ergebnisse lassen sich für die Varianten bestätigen, die mit dem Rotkleeextrakt behandelt wurden. So sind hier die stärksten Varianzursachen, laut MQ/F-Werten, ebenfalls die Lösungsmittel und auf dem zweiten Platz die Verdünnungsstufen. Dies gilt allerdings erst ab Tag 5, da an Tag 2 die Belichtung die erste „Rolle“ spielt, gefolgt von dem Lösungsmittel und der Interaktion zwischen Belichtung und Lösungsmittel. An Tag 3 stellt sich heraus, dass die Lösungsmittel die stärkste Varianzursache sind, die Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Verdünnungsstufen die zweitstärkste Ursache darstellen und an dritter Stelle erst die Verdünnungsstufen stehen (vgl. Anhangtab. 2).

Wenn man die Keimungsrate hinsichtlich der Verdünnungsstufe am Ende des Versuches miteinander vergleicht, muss man die Isoflavonquellen jeweils getrennt

voneinander betrachten, da unterschiedliche Isoflavonkonzentrationen zu Grunde liegen. Beim Extraktionsverfahren 1 in der Variante, in der mit dem Isoflavonpräparat aus der Apotheke gearbeitet wurde, sind keine Unterschiede zu erkennen (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4: Keimungsrate am Ende des Versuches (Tag 21) (Mittelwerte in %) – Mittelwerte über die Verdünnungsstufen

Verdünnung	Mittelwerte der Verdünnungsstufen Kapsel	Mittelwerte der Verdünnungsstufen Rotklee
Extraktionsverfahren 1	1:4	88,8
	1:9	88,8
	1:49	88,1
	Nullvariante	19,4
Extraktionsverfahren 2	1:4	89,4
	1:9	94,4
	1:49	91,3
	Nullvariante	49,4

Bei der gleichen Behandlung mit Extraktionsverfahren 2 zeigt sich die höchste Keimungsrate bei der Verdünnung 1:9. Die Behandlung mit Rotkleeextrakt im Extraktionsverfahren 2 erwirkt, dass die Verdünnungsstufen 1:4 und 1:49 die besseren Ergebnisse in der Keimungsrate hervorbringen, als 1:9. Im Extraktionsverfahren 1 keimen die wenigsten bei der Verdünnungsstufe 1:49, die meisten bei 1:9 (vgl. Tab. 4). Die Nullvarianten sind hier mit Vorsicht zu betrachten, da sie zwar keine Isoflavone enthalten, jedoch andere Konzentrationen der Lösungsmittel und Zusatzstoffe.

Vergleicht man den Einfluss der Isoflavonquellen im Zusammenhang mit den Lichtstrategien, dann sieht man, dass der Mittelwert der Version „Rotkleeextrakt Dunkel“ 86,1 % beträgt, der Mittelwert der Version „Rotklee Licht“ 85,6 %. Der Vergleich der Kapselvarianten legt folgendes dar: „Kapsel Dunkel“ keimte durchschnittlich zu 71,9 %, die Lichtvariante zu 80,5% (vgl. Tab. 3). Aber wie oben bereits beschrieben, ist die Belichtung in fast allen Fällen kein signifikanter Faktor der Varianzursache.

4.2 Keimungsgeschwindigkeit

Die Keimungsgeschwindigkeit ist durch folgende Formel definiert:

$$\frac{\Sigma(\text{neu} \cdot \text{gekeimte} \cdot \text{Samen} \cdot \text{pro} \cdot \text{Tag} \times \text{Keimungstag}(= \text{Liegezeit}))}{\text{Anzahl} \cdot \text{der} \cdot \text{insgesamt} \cdot \text{gekeimten} \cdot \text{Samen}}$$

In den Versuchen konnte eine durchschnittliche Keimgeschwindigkeit von 4,85 Tagen erreicht werden. Sie schwankte zwischen 3,3 (Rotkleeextrakt, Extraktionsverfahren 2, Dunkelvariante, Verdünnungsstufe 1:49) und 11,4 Tagen (Kapsel, Extraktionsverfahren 2, Dunkelvariante, Nullvariante) (vgl. Anhangtab. 5).

Bei der Variante, die mit dem Kapselinhalt behandelt wurde, stellte sich heraus, dass die Nullvarianten am langsamsten keimten (durchschnittlich 9,90 Tage). Diese unterscheiden sich auch jeweils signifikant von den anderen Werten in ihrer zugehörigen Gruppe (vgl. Abb. 13). Eine Ausnahme hierzu bildet die Nullvariante des Extraktionsverfahrens 1 im Dunkeln, da sie nicht signifikant verschieden von der Verdünnungsstufe 1:4 ist. Zudem wurde beobachtet, dass die Nullvarianten bei Licht und die Nullvariante des Extraktionsverfahrens 2 im Dunkeln sich signifikant von der Nullvariante des Extraktionsverfahrens 1 im Dunkeln unterscheiden. Vor allem ist aber bemerkenswert, dass die Verdünnungsstufen keine signifikanten Unterschiede aufweisen, weder untereinander noch im Vergleich zu den anderen Gruppen.

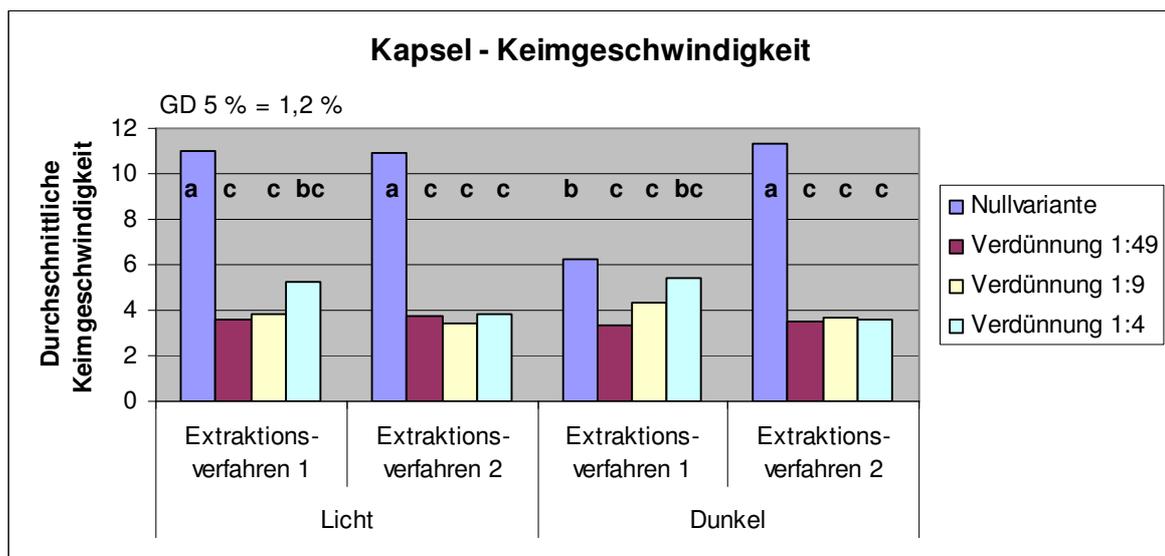


Abbildung 13: Keimgeschwindigkeit der Variante „Kapsel“ (= käufliches Isoflavon-Präparat aus der Apotheke (enthält Vitamin C)) (in Tagen)

Die Keimgeschwindigkeit variiert bei den Samen sowohl bei der Variante mit der Kapsel, als auch bei der Variante, die unter dem Einfluss vom Rotkleeextrakt stand, vor allem auf Grund der Lösungsmittel. Die zweite Ursache bei der „Kapsel“ und dem „Rotkleeextrakt“ ist die Interaktion der Lösungsmittel mit der Verdünnung. An dritter Stelle steht die Verdünnung (vgl. Anhangtab.4).

Bei der Version, die durch den Rotkleeextrakt die Isoflavone bekam, zeigen sich weitere Varianzursachen. So ist die Belichtung die Varianzursache Nummer vier (bei einem Signifikanzniveau von 0,01) und die Wechselwirkung zwischen Belichtung und Lösungsmittel (bei einem Signifikanzniveau von 0,05) steht an Platz fünf (vgl. dazu Anhangtab. 2 bzw. 4).

Allerdings sind nur wenige Werte in dieser Gruppe signifikant verschieden. Vergleicht man zum Beispiel die Keimgeschwindigkeiten des Extraktionsverfahrens 2 miteinander, so ist ersichtlich, dass sich diese Werte nicht signifikant voneinander unterscheiden. Sie liegen durchschnittlich bei 3,6 Tagen (vgl. Abb. 14). Beim Extraktionsverfahren 1 sind nur die jeweiligen Nullvarianten signifikant different von den anderen Verdünnungsstufen. Bei der Lichtvariante dauerte die Keimung der Nullvariante 6,5 Tage, bei den Verdünnungsstufen (1:4, 1:9 und 1:49) 3,9, 3,7 und 3,4 Tage. Im Dunkeln zeigte sich ein ähnliches Bild: die Nullvariante lag bei 8,6 Tagen, die Verdünnungsstufen bei 4,1, 4,3 und 4,8 Tagen. Außerdem ist die Nullvariante des Extraktionsverfahrens 1 bei Licht signifikant verschieden von derselben Nullvariante in Dunkelheit. Die Verdünnungsstufe 1:49 des Extraktionsverfahrens 1 im Dunkeln unterscheidet sich zudem signifikant von den anderen Varianten der gleichen Verdünnungsstufe (vgl. Abb. 14).

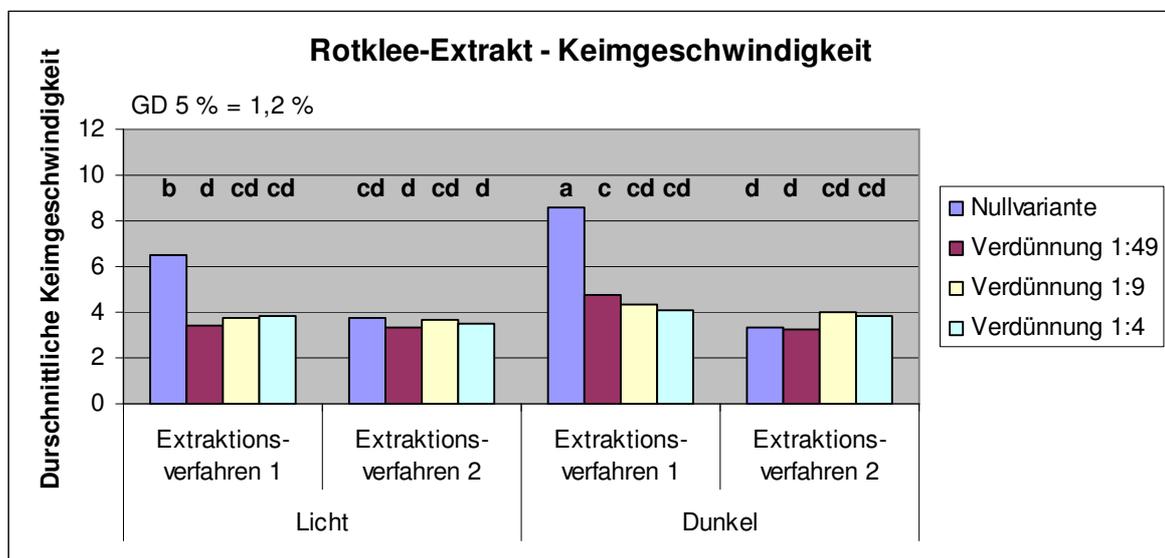


Abbildung 14: Keimgeschwindigkeit der Variante „Rotkleeextrakt“ (in Tagen)

Vergleicht man die Nullvarianten ohne Ascorbinsäurezusatz miteinander so lässt sich erkennen, dass sie nicht signifikant verschieden sind (vgl. Abb. 15). Die Werte schwanken

zwischen 3,4 und 8,6 Tagen. Dagegen lässt sich bei der Variante mit Ascorbinsäure darstellen, dass sich die Version des Extraktionsverfahrens 1 der Dunkelvariante (6,3 Tage) von der des Extraktionsverfahrens 2 der Dunkelvariante (11,4 Tage) signifikant unterscheiden. Die Belichtung stellt allerdings bei den Nullvarianten keine Varianzursache dar. Die Werte der Lichtvariante Extraktionsverfahren 1 und Extraktionsverfahren 2 unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, beide liegen bei 11,0 Tagen.

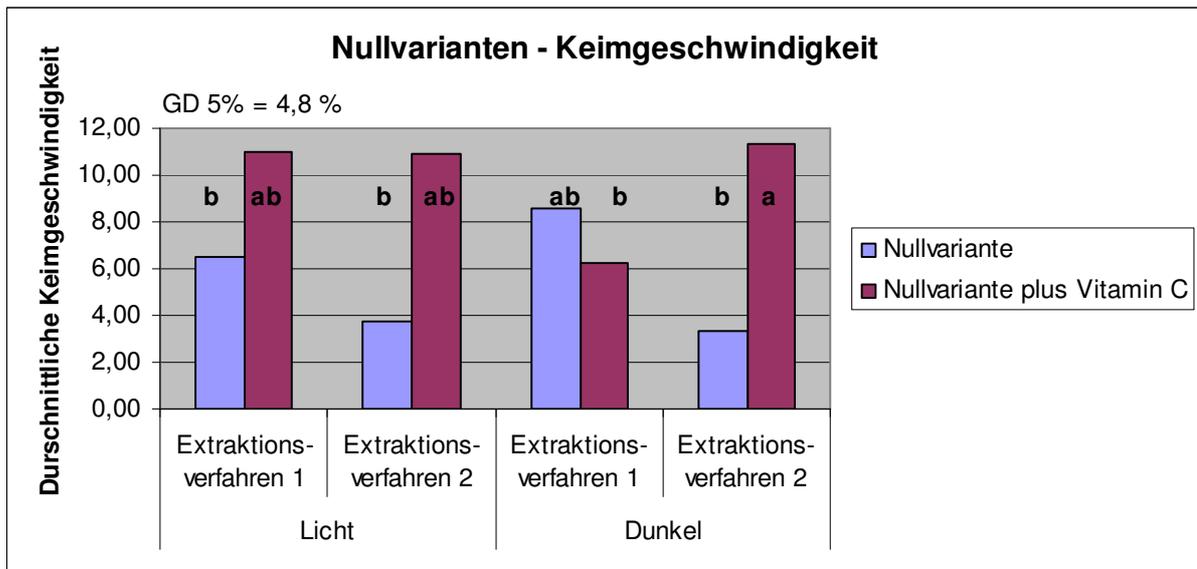


Abbildung 15: Keimgeschwindigkeit der Nullvarianten (in Tagen)

4.3 Weitere Beobachtungen

Zusätzlich zu den vorangegangenen Untersuchungskriterien wurden weitere Beobachtungen gemacht. So konnte, fast ausschließlich bei der Dunkelvariante, Wasserdampfbildung an den Deckeln der Petrischalen an nahezu jedem Zähltermin festgestellt werden. Dies Problem begann bei vielen dieser Gruppe schon ab Tag 2. So wurde als erste Maßnahme der Wasserdampf aus der oberen Schalenhälfte wieder auf den Filter mit den Samen zurückgeführt. Um aber das Austrocknen der Samen zu verhindern, musste bei einigen Proben 1 ml Wasser hinzugefügt werden – manchmal sogar mehrmals. Ferner konnte bei den Untersuchungen Schimmelbildung protokolliert werden. Selbst in der Lösung der Variante Kapsel/Extraktionsverfahren 2/Verdünnungsstufe 1:9 ließen sich bereits „Schimmelbälle“ entdecken, denen aber bei der Lösungsentnahme ausgewichen

wurde. So konnte bei dieser Version kein sichtbarer Schimmelbefall in den Petrischalen nachgewiesen werden, jedoch vor allem vermehrt bei den Varianten Kapsel/Extraktionsverfahren 1+2/ Verdünnungsstufe 1:4 und Nullvariante/Extraktionsverfahren 1+2/ Ascorbinsäure. Zum Ende des Versuches wurden auch verschimmelte Samen registriert. Im Gegensatz zur Wasserdampfbildung trat die Schimmelbildung beinahe ausnahmslos bei den Lichtvarianten auf.

5 Diskussion

5.1 Einfluss der Lichtstrategie

Das Licht wird in der Literatur als eine der Einflussgrößen genannt, die die Dormanz eines Samens überwinden können. Das heißt, dass Licht ein entscheidender Faktor gerade für die Keimung sein kann. Allerdings konnte in diesem Versuch die Belichtung nur selten und eher als schwache Varianzursache festgestellt werden. Bei beiden Varianten („Kapsel“ und „Rotkleextrakt“) wurden die Varianzen, die auftraten, nur an Tag 2 bzw. 2 und 3 durch die Belichtung mit beeinflusst. Ein Grund dafür könnte sein, dass in diesen ersten Tagen viele der Samen keimten, und dass für die Keimung der Lichtreiz doch von Nöten ist. Dass es jedoch nur in einem so geringen Maße zu erkennen ist, kann natürlich durch den ausgeprägten Züchtungszustand der Weidelgrassamen begründet sein, die durch Weiterentwicklung der Sorten vor allem ihre Keimfähigkeit verbessert haben. Trotz der Tatsache, dass *Lolium perenne* zu den Lichtkeimern zählt, könnte es sein, dass die Empfindlichkeit auf Lichtreize zu reagieren, herabgesetzt ist. Ein anderer Aspekt könnte sein, dass die Effekte, die auf die Belichtung zurückzuführen sind, durch andere Faktoren so stark überlagert sind, dass sie nur schwer herauszufiltern und damit schwer erkennbar sind. Interessant zu bemerken ist, dass im Vergleich der Nullvarianten die Belichtung erst ab Tag 10 eine Varianzursache darstellt. Vergleicht man am Ende des Versuches die Lichtvarianten mit den Dunkelvarianten innerhalb der jeweiligen Isoflavonquellen, so kann festgestellt werden, dass der „Rotklee“ von der Lichtstrategie kaum betroffen ist. Bei der „Kapsel“ zeigen sich knapp acht Prozentpunkte Unterschied zwischen Licht und Dunkelheit. Vergleicht man aber die einzelnen Verdünnungsstufen hinsichtlich der Belichtung miteinander, so gestaltet sich jede Stufe individuell, ohne dass sich dabei ein bestimmtes Muster herauskristallisiert (vgl. Tab. 3).

Die Keimungsgeschwindigkeit wurde so gut wie gar nicht von der Belichtung beeinflusst. Eine Ausnahme bildet die Variante der Rotkleextraktion, bei der in geringen Maßen die Belichtung als Varianzursache auftritt (vgl. Anhangtab. 2 bzw. 4). Auch im Vergleich der Mittelwerte aller Faktorkombinationen zeigt sich kein Unterschied bei der Keimungsgeschwindigkeit. Die Lichtversionen keimten durchschnittlich innerhalb von 4,8 Tagen, die Dunkelversionen in 4,9 Tagen. Grund hierfür kann wiederum die Sorte mit ihrer

guten Keimfähigkeit sein, so dass sobald die Keimung einmal eingesetzt hat, die Geschwindigkeit unabhängig von der Belichtung ist.

5.2 Einfluss der Verdünnungsstufen

Mit Hilfe der Verdünnungsstufen wurde der Einfluss der Isoflavone dargestellt. Die Verdünnungsstufen lassen sich jedoch, wie schon mehrfach erwähnt, nicht untereinander, also zwischen den Isoflavonquellen, vergleichen, da verschiedene Ausgangsisoflavonkonzentrationen wahrscheinlich sind. Außerdem muss zum Extraktionsverfahren 1 gesagt werden, dass das 20%ige Methanol durch die Verdünnungsstufen mit verdünnt wurde. Das heißt, dass in der Nullvariante 20 % (v/v) Methanol enthalten sind, 4 % MeOH bei der Verdünnung 1:4, 2 % MeOH bei der Stufe 1:9 und bei der Verdünnung 1:49 nur noch 0,4 % Methanol in der Flüssigkeit, mit der die Samen behandelt wurden. Ähnlich verhält es sich mit den Versionen, die mit dem Isoflavonpräparat aus der Apotheke behandelt wurden, denn hier wird nicht nur die Isoflavonkonzentration mit verdünnt, sondern auch das Vitamin C. So beinhaltet die Nullvariante 0,3 % (w/v) Vitamin C, 0,06 % die Verdünnungsstufe 1:4, 0,03 % bei 1:9 und 0,006 % bei der höchsten Verdünnungsstufe (1:49).

Laut statistischer Auswertung spielt bei der Varianzursache die Verdünnung bei den Faktorkombinationen mit der „Kapsel“ meistens die 2. Rolle nach dem Lösungsmittel. Die Wechselwirkung aus Lösungsmittel und Verdünnungsstufe bildet daher meistens auch die Ursache Nr. 3. Gleichsam verhält es sich bei den Versionen, die den Rotkleextrakt erhielten. Die Unterschiede in der Keimgeschwindigkeit wurden sowohl bei der „Kapsel“, als auch beim „Rotkleextrakt“ an dritter Stelle von den Verdünnungsstufen, an zweiter Stelle von den Interaktionen der Verdünnungsstufen mit den Lösungsmitteln verursacht.

Der Grund für diese Ergebnisse liegt aber nicht zwangsläufig bei den Isoflavonen. Denn wie oben bereits beschrieben, fließen mehrere andere Faktoren mit in die Interpretation der Verdünnungsstufen ein. Die einzige Kombination, die nicht durch Methanol und Ascorbinsäure beeinflusst wird, und somit wahrscheinlich ausschließlich von den Isoflavonen, ist die Version Rotkleextrakt – Extraktionsverfahren 2. Allerdings könnten bei der Extraktion weitere unbekannte Stoffe aus dem Rotklee herausgelöst worden sein, die sich ebenfalls auf die Keimung von *Lolium perenne* auswirken.

Wenn man sich nun die Keimungsrate der Kombination Rotkleextrakt – Extraktionsverfahren 2 ansieht, so zeigt sich, dass die meisten Unterschiede, die am Ende des Versuches auftreten, nicht signifikant sind. Der einzig signifikante Unterschied in diesem Verfahren ist die Variante 1:49 bei Licht, die sich von ihrer zugehörigen Nullvariante und der Verdünnungsstufe 1:9 abhebt. Ursache dafür könnte sein, dass in dieser Konzentration Stoffe in dem Extrakt enthalten sind, die nur in geringen Dosen keimfördernd wirken. Dagegen spricht jedoch die Verdünnungsstufe 1:4, die nicht signifikant verschieden von der Stufe 1:49 ist. Im Dunkeln unterscheidet sich statistisch gesehen bei diesem Extraktionsverfahren ab Tag 3 keine Verdünnungsstufe mehr von der anderen. Nur an Tag 2 hat die Nullvariante (Wasser) einen statistisch gesicherten Keimungsvorsprung gegenüber den Verdünnungsstufen 1:9 und 1:4 (vgl. Anhangabb. 2).

Die Kombination Extraktionsverfahren 1 – Rotkleextrakt zeigt hinsichtlich der Verdünnungsstufen keine eindeutige Tendenz. Über die Nullvariante (20%iges Methanol) lässt sich sagen, dass sie zweifelsohne keimhemmend wirkt. Ob nun die Verdünnungsstufen in Abhängigkeit zu der abnehmenden Methanolkonzentration oder durch das Zusammenspiel der Methanolkonzentration und der Isoflavonkonzentration sich auf die Keimung auswirken, lässt sich nicht sagen. Eventuell könnte auch die Belichtung mögliche Reaktionen ausgelöst haben, die im Moment nicht nachvollziehbar sind. Es könnten sowohl durch das Methanol, als auch durch die Isoflavone, je nach Konzentration keimfördernde oder keimhemmende Effekte auftreten. Diese könnten sich in der Kombination jedoch genauso wiederum gegenseitig aufheben. Bei Methanol scheint es jedoch der Literatur nach auf die Konzentration, den Zeitpunkt der Methanolgabe, wie auch möglicherweise auf die Pflanzenart anzukommen, welchen Effekt es auf die Keimung und/oder das Wachstum einer Pflanze ausübt. Denn bei TAYLORSON und HENDRICKS (1979) zeigten sich keimfördernde Wirkungen bei einer Methanolkonzentration von 0,04 % (v/v) (wenn man einen 250 ml Kolben als Gefäß annimmt). REYNOLDS (1977) bewies eine 50%ige Keimhemmung bei ca. 4%iger (w/v) MeOH-Konzentration und eine 100%ige Keimhemmung konnten THIESS und LICHTENTHALER (1973) bei einer 10%igen Methanollösung feststellen.

Bei den Isoflavonen könnte man aus der Literatur vermuten, dass erhöhte Konzentrationen zu keimhemmenden Effekten führen. Sowohl bei DEBEAUJON et al. (2000) als auch bei BROWN et al. (2001), zeigten sich durch Eingriffe in den Flavonoidstoffwechsel, dass Nullmutanten, die also keine Flavonoide herstellen, keim- und wuchsfreudiger

waren. Rückschlüsse daraus zu ziehen, wie sich Isoflavone, die extern hinzugefügt wurden, auf die Keimung auswirken, ist daher eher spekulativ. Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit zeigen hinsichtlich dieses Aspektes kein klares Ergebnis.

Die Kombinationen, die mit dem Kapselinhalt behandelt wurden, weisen ebenfalls bezüglich der Verdünnungsstufen wenige Besonderheiten auf, die eine Aussage über die Wirkung der Isoflavone treffen ließen. Deutlich sieht man bei den Nullvarianten dieser Variante des Extraktionsverfahrens 1, dass bei Licht und besonders im Dunkeln eine Keimhemmung eintritt. Dies scheint durch die Wirkung des Methanols in Kombination mit der Ascorbinsäure zu kommen. Die Verdünnungsstufen an sich, an Tag 3, zeigen mit zunehmender Verdünnung eine abnehmende Keimhemmung, was eher auf die abnehmende Wirkung der Zusatzstoffe je nach Verdünnungsstufe, als auf die Wirkung der Isoflavone hindeutet. Mit zunehmender Versuchsdauer verschwimmt dieses Phänomen jedoch, so dass sich nur noch die Nullvariante statistisch gesichert von den anderen Verdünnungsstufen unterscheidet. Beim Extraktionsverfahren 2 der „Kapsel“ ist ebenfalls kein Trend zu erkennen, ob die Isoflavone einen Einfluss auf das Keimverhalten ausgeübt haben. Es zeigen sich zudem nur wenige signifikante Unterschiede (vgl. Anhangabb. 1).

Bei Ansicht des Keimungsverlaufs (vgl. Anhangabb. 4-6) ist ebenso keine gesicherte Einflussrichtung der Isoflavone erkennbar.

Und bei der Keimgeschwindigkeit heben sich nur die Nullvarianten signifikant von den anderen Verdünnungsstufen ab. Die Verdünnungsstufen untereinander unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (vgl. Abb. 13). Zu viele Faktoren beeinflussen die Keimung der Samen, so dass verschiedene Kombinationen noch einmal gezielt und evtl. in einer anderen Form untersucht werden müssten.

5.3 Einfluss des Extraktionsverfahrens (Lösungsmittels)

Wie in dem Absatz „Einfluss der Verdünnungsstufen“ schon angedeutet, erweisen sich die Extraktionsverfahren, also die Lösungsmittel, als stärkster Varianzverursacher. Bei den Faktorkombinationen der „Kapsel“ ist das Lösungsmittel an allen Tagen bei der Keimungsrate und bei der Keimgeschwindigkeit die Varianzursache Nummer eins. Ebenso verhält sich dies bei den Versionen des „Rotkleextraktes“, mit Ausnahme des Tages 2 (vgl. Anhangtab. 1-4). Betrachtet man die Mittelwerte der Extraktionsverfahren

der jeweiligen Isoflavonquellen, so zeichnet sich bei beiden ein klarer Unterschied ab. 71,3 % aller Samen, die mit den Lösungen des Extraktionsverfahrens 1 – „Kapsel“ behandelt wurden, keimten, dagegen 81,1 % der Samen, die mit den Lösungen des Extraktionsverfahrens 2 – „Kapsel“ behandelt wurden. In gleicher Weise zeigt sich der Unterschied bei dem „Rotkleextrakt“. Hier keimten 81,7 % der Samen, die Lösungen des Extraktionsverfahrens 1 erhielten und 90,0 % der Samen, die Extraktionsverfahren 2 bekamen (vgl. Tab. 3). In beiden Fällen haben also ca. 2 Samen weniger pro Petrischale durch das Extraktionsverfahren 1 gekeimt, als durch das Extraktionsverfahren 2.

Ebenso zeigt sich beim Vergleich der Nullvarianten, dass das Extraktionsverfahren entscheidend für die Keimung ist. Gerade an den Tagen 2, 3 und 5 lässt sich erkennen, dass die Versionen, die nur Wasser erhielten, einen eindeutigen Keimvorsprung aufweisen (vgl. Anhangabb. 3). Die logische Folgerung daraus ergibt, dass alle anderen Versionen, die außer Wasser noch Methanol und/oder Ascorbinsäure beinhalten, einen keimungsverzögernden Effekt durchliefen. Sogar am Ende des Versuches, an Tag 21, sind statistisch gesicherte Unterschiede zwischen den Nullvarianten zu sehen. Hier konnte beobachtet werden, dass das Extraktionsverfahren 1, welches 20 % (v/v) Methanol enthielt, zusammen mit 0,3 % (w/v) Vitamin C im Dunkeln die geringste Keimungsrate verursachte. Diese Werte werden in der Literatur jeweils auch als keimhemmend definiert (vgl. HAVAS (1935), ISHIBASHI und IWAYA-INOUE (2006), REYNOLDS (1977), THIESS und LICHTENTHALER (1973)). Wie es aussieht, summieren sich die Effekte der keimhemmenden Wirkung hier.

Kein Unterschied wurde bei den Versionen Extraktionsverfahren 1 – ohne Ascorbinsäure, Extraktionsverfahren 2 – mit Ascorbinsäure, jeweils bei Licht, und der Version Extraktionsverfahren 1 – ohne Ascorbinsäure im Dunkeln festgestellt (vgl. Abb. 12). Der Grund hierfür ist zum einen wieder das Methanol, welches im Extraktionsverfahren 1 hemmend wirkt, sowie das Vitamin C, welches in dieser Dosierung anscheinend ebenfalls in gleicher Stärke hemmend wirkt. Allerdings scheint es so, als ob bei Vitamin C gehemmten Samen, der Lichtreiz eher eine Rolle spielt, als bei den Versionen ohne Ascorbinsäure (vgl. Abb. 12). Die Keimgeschwindigkeit wirft wiederum andere Fragen auf. Warum keimt die Vitamin C-Version aus Extraktionsverfahren 1 im Dunkeln, statistisch abgesichert, schneller, als die gleiche Nullvariante aus Extraktionsverfahren 2? Es bleibt spekulativ, wenn man behauptet, es könnte mit dem Extraktionsverfahren, also z. B. dem Erhitzen und Verdampfen des 100%igen Methanols im

Extraktionsverfahren 2, zusammenhängen. Denn bei Licht unterscheiden sich diese Versionen praktisch gar nicht.

Dass durch das Extraktionsverfahren 2 möglicherweise mehr Isoflavone herausgelöst wurden und dadurch andere Effekte entstanden, als durch eine geringere Isoflavonkonzentration aus dem Extraktionsverfahren 1, oder sogar umgekehrt, kann nicht bewiesen werden. Denn dadurch, dass im Extraktionsverfahren 1 noch das Methanol enthalten ist, kann es sein, dass mögliche Effekte überlagert wurden. Man müsste daher den Versuch wiederholen und dabei auch das 20%ige Methanol verdampfen, um genauere Ergebnisse hinsichtlich der Isoflavone zu erhalten.

5.4 Gesamtbetrachtung

Um nun eine Aussage über die Wirkung von Isoflavonen im Feld zu treffen, müssten zum einen die Versuche im Labor in abgewandelter Weise ein weiteres Mal durchgeführt werden. Zum anderen müssten Untersuchungen des Bodens und der Kleepflanze gemacht werden, um das Verhalten der Isoflavone in der Kleepflanze näher zu erforschen, aber auch die Abgabe der Isoflavone in die Rhizosphäre zu verfolgen und den Abbau im Boden nachzuvollziehen. Danach könnte die Hypothese verworfen oder manifestiert werden, ob Isoflavone des Rotklee sich auf die Keimung von Gräsern auswirken und ob sich daraus ein Vor- oder ein Nachteil für die Gräser ergibt. Man könnte zusätzlich Rotklee samen testen, wie sie auf die Gabe von Isoflavonen reagieren. Dadurch könnte abgeschätzt werden, ob sich hieraus für den Rotklee, der natürlicherweise höhere Konzentrationen von Isoflavonen enthält, Konkurrenzvorteile, zumindest in der Anfangsphase, ergeben.

Da nach meiner Erkenntnis bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keine vergleichbare Studie zu diesem Thema verfasst wurde, war es unumgänglich Grundlagen zu erforschen und auszutesten. Bisherige Projekte stellten nur da, wie Isoflavone aus Rotklee extrahiert werden, um den Isoflavongehalt in der Pflanze zu untersuchen.

Die vorliegende Methode sollte dahingehend verbessert werden, dass weniger Zusatzstoffe bei der Keimung beteiligt sind. Das heißt, dass Präparate von Vorteil wären, die kein Vitamin C enthielten, da sich dieses auf die Keimung auswirkt.

Des Weiteren sollte das Extraktionsmittel, wie in diesem Fall das Methanol, auf alle Fälle

bei der Anwendung an den Samen, nicht mehr in der Lösung vorhanden sein, um Überlagerungseffekte der Untersuchung zu vermeiden.

Außerdem könnte man mit Hilfe einer Analyse den Isoflavongehalt feststellen und hätte dadurch sicherere Anhaltspunkte für die Interpretation der Ergebnisse.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Isoflavonen des Rotklees, Lösungsmitteln und Licht auf die Keimung von *Lolium perenne*, einem häufigen Gemengepartner des Rotklees, untersucht. Bei diesem Versuch wurden bei konstanten Umweltbedingungen in einem Klimaschrank Keimversuche durchgeführt und die Keimungsrate sowie die Keimgeschwindigkeit erfasst und verglichen. Die Hauptfragestellung war, ob sich Isoflavone des Rotklees auf das Keimverhalten des Deutschen Weidelgrases auswirken. Außerdem sollte getestet werden, ob preisgünstige Isoflavonpräparate aus der Apotheke für derartige Versuche einsetzbar sind. Ein weiterer Aspekt war die Klärung der Frage, welche Extraktionsmethode sich am besten für die Gewinnung von Isoflavonen und die Anwendung dieser zu Keimversuchen anbietet.

Um das Datenmaterial auszuwerten, erfolgte eine mehrfaktorielle Varianzanalyse.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Effekte, die auf die Isoflavone zurückzuführen sind, ließen sich nicht feststellen. Weder bei dem natürlich gewonnenen Rotkleeextrakt, noch bei dem Isoflavonpräparat konnten eindeutige Hinweise beobachtet werden.
2. Die Varianzen der Keimungsrate wurden in erster Linie durch das Lösungsmittel, also das Extraktionsverfahren, verursacht. An zweiter Stelle lagen vor allem die Verdünnungsstufen, wobei eher anzunehmen ist, dass die Verdünnung der Zusatzstoffe Methanol und Vitamin C, als die der Isoflavone Grund für die Varianzen sind. Die drittwichtigste Varianzursache stellt die Interaktion der beiden erstgenannten dar. Bei der Keimgeschwindigkeit sind Platz 2 und Platz 3 vertauscht. In wenigen Fällen war zudem auch noch die Belichtung bei der Keimungsrate eine Varianzursache.
3. Das Extraktionsverfahren zeigte großen Einfluss auf das Keimverhalten der Samen. Das Extraktionsverfahren 1, welches 20%iges Methanol enthielt, wirkte sich keimhemmend aus. Wohingegen das Extraktionsverfahren 2, welches mit 100%igem Methanol durchgeführt wurde, jedoch anschließend verdampft wurde, keinen offensichtlichen Effekt auf die Keimung ausübte.
4. Isoflavonpräparate aus der Apotheke enthalten häufig Vitamin C, da sie als Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Zur Nutzung von

Keimversuchen, die den Einfluss von Isoflavonen untersuchen, sind sie daher ungeeignet, da Vitamin C das Keimverhalten von *Lolium perenne* in den verwendeten Konzentrationen beeinflusst. Bei geringer Verdünnung inhibierte es die Keimung.

5. Es konnten nur geringe Abweichungen der Lichtvariante von der Dunkelvariante festgestellt werden.

7 Quellenverzeichnis

Literatur:

1. BEWLEY J. D. & BLACK M., 1994: Seeds – Physiology of Development and Germination. Second Edition. Plenum Press, New York.
2. BEWLEY J. D., 1997: Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* **9**, 1055-1066.
3. BROWN D. E., RASHOTTE A. M., MURPHY A. S., NORMANLY J., TAGUE B. W., PEER W. A., TAIZ L. & MUDAY G. K., 2001: Flavonoids Act as Negative Regulators of Auxin Transport in Vivo in Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**, 524-535.
4. DE RIJKE E., ZAPPEY H., ARIESE F., GOOIJER C. & BRINKMAN U. A. T. 2004: Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *T. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem* **378**, 995-1006
5. DEBEAUJON I., LÈON-KLOOSTERZIEL K. & KOORNNEEF M., 2000: Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in Arabidopsis. *Plant Physiosology* **122**, 403-413.
6. DICKINSON J. M., SMITH G. R., RANDEL R. D. & PEMBERTON I. J., 1988: In Vitro Metabolism of Formononetin and Biochanin a in Bovine Rumen Fluid. *J Anim Sci* **66**, 1969-1973.
7. DIEPENBROCK W., ELLMER F. & LÉON J., 2005: Ackerbau, Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung – Grundwissen Bachelor. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
8. FISHER G. S., LEGENDRE M. G., LOVGREN N. V., SCHULLER W. H. & WELLS J. A., 1979: Volatile Constituents of Southernpea Seed [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *J. Agric. Food Chem.* **27** (1), 7-11.
9. FLAMME W., KURPJUN C., SEDDIG S., JANSEN G. & JÜRGENS H.-U., 2003: Gekeimte Samen als Futtermittel - Analytik [Germinated seeds as feed - analysis]. Bericht, Institut für Stressphysiologie und Rohstoffqualität, Julius Kühn-Institut (JKI) - Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, D-Sanitz.
10. GALBALLY I. E. & KRISTINE W., 2002: The Production of Methanol by Flowering Plants and the Global Cycle of Methanol. *Journal of Atmospheric Chemistry* **43**, 195-229.
11. GEISLER G., 1991: Farbatlas Landwirtschaftliche Kulturpflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
12. HANUS H., HEYLAND K.-L. & KELLER E. R., 1999: Handbuch des Pflanzenbaus, Bd. 3. Knollen- und Wurzelfrüchte, Körner- und Futterleguminosen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
13. HANUS H., HEYLAND K.-L. & KELLER E. R., 2008: Handbuch des Pflanzenbaus, Bd. 2. Getreide und Futtergräser. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
14. HAVAS L., 1935: Ascorbic Acid (Vitamin C) and the Germination and Growth of Seedlings. *Nature*, **September 14**, 435.
15. HELDT H.-W. & PIECHULLA B., 2008: Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag.
16. HUBBARD C. E., 1985: Gräser. UTB Ulmer Verlag, Stuttgart.

17. ISHIBASHI Y. & IWAYA-INOUE M., 2006: Ascorbic Acid Suppresses Germination and Dynamic States of Water in Wheat Seeds. *Plant Prod. Sci.* **9**(2), 172-175.
18. JEROCH H., DROCHNER W. & SIMON O., 1999: Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
19. KUTSCHERA U., 2002: Prinzipien der Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Spektrum, Akadem. Verlag, Heidelberg; Berlin.
20. LEPINIEC L., DEBEAUJON I., ROUTABOUL J.-M., BAUDRY A., POURCEL L., NESI N. & CABOCHE M., 2006: Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids. *Ann. Rev. Plant Biol.* **57**, 405-430.
21. MARAIS J. P. J., DE VOURS B., DIXON R. A. & FERREIRA D., 2006: The stereochemistry of flavonoids. In: GROTEWOLD E. (Hrsg.): *The Science of Flavonoids*, Springer Verlag, New York.
22. MOORBY J. M., FRASER M. D., THEOBALD V. J., WOOD J. D. & HARESIGN W., 2004: The effect of red clover formononetin content on live-weight gain, carcass characteristics and muscle equol content of finishing lambs. *Animal Science*, **79**, 303-313.
23. MÜLLER C., STÖCKMANN H. & SCHWARZ K., 2001: HPLC-Untersuchung von Isoflavonen in Alkohol-Wasser-Extrakten aus Rotklee. In: Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, XXXVI. Vortragstagung, Jena, 77-82.
24. NONOMURA A. M. & BENSON A. A., 1992: The path of carbon in photosynthesis: Improved crop yields with methanol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 9794-9798.
25. REYNOLDS T., 1977: Comparative Effects of Aliphatic Compounds on Inhibition of Lettuce Fruit Germination. *Ann. Bot.* **41**, 637-48.
26. ROWE R. N., FARR D. J. & RICHARD B. A. J., 1994: Effects of foliar and root applications methanol and or ethanol on the growth of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **22**, 335-337.
27. SIVESIND E. & SEGUIN P. 2005: Effects of the Environment, Cultivar, Maturity, and Preservation Method on Red Clover Isoflavone Concentration. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6397-6402.
28. SMIRNOFF N. & WHEELER G. L., 2000: Ascorbic Acid: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **35**(4), 291-314.
29. TAYLORSON R. B. & HENDRICKS S. B., 1979: Overcoming Dormancy in Seeds with Ethanol and Other Anesthetics. *Planta* **145**, 507-510.
30. THIESS D. E. & LICHTENTHALER H. K., 1973: Hemmung der Samenkeimung durch niedere einwertige Alkohole. *Naturwissenschaften* **60**, 302.
31. TOEBES A. H. W., DE BOER V., VERKLEIJ J. A. C., LINGEMAN H. & ERNST W.H.O., 2005: Extraction of Isoflavone Malonylglucosides from *Trifolium pratense* L. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4660-4666.
32. TSAO R., PAPADOPOULOS Y., YANG R., YOUNG J. C. & McRAE K., 2006: Isoflavone Profiles of Red Clovers and their Distribution in Different Harvested at Different Growing Stages. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5797-5805.
33. ULBRICH M., HOFFMANN M. & DROCHNER W., 2004: Fütterung und Tiergesundheit. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
34. VELJOVIC-JOVANOVIC S. D., PIGNOCCHI C., NOCTOR G. & FOYER C. H., 2001: Low Ascorbic Acid in the *vtc-1* Mutant of Arabidopsis Is Associated with

- Decreased Growth and Intracellular Redistribution of the Antioxidant System. *Plant Physiology* **127**, 426-435.
35. VETTER J. 1995: Isoflavones in Different Parts of Common *Trifolium* Species. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 106-108.
 36. WU Q., WANG M. & SIMON J. E., 2003: Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **1016**, 195-209.
 37. YU O. & McGONIGLE B., 2005: Metabolic Engineering of Isoflavone Biosynthesis. In: SPARKS D. L. (Hrsg.): *Advances in Agronomy* **86**, Elsevier Academic Press, San Diego.

Abbildungen:

1. BEWLEY J. D., 1997: Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* **9**, 1055-1066.
2. GALBALLY I. E. & KRISTINE W., 2002: The Production of Methanol by Flowering Plants and the Global Cycle of Methanol. *Journal of Atmospheric Chemistry* **43**, 195-229.
3. THOMÈ O.W., 1905: *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*
4. <http://www.lfl.bayern.de/ipz/gruenland/33526/index.php> [14.08.09]
5. LEPINIEC L., DEBEAUJON I., ROUTABOUL J.-M., BAUDRY A., POURCEL L., NESI N. & CABOCHE M., 2006: Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids. *Ann. Rev. Plant Biol.* **57**, 405-430.

8 Anhang

Anhangtabellen

Anhangtabelle 1:	Varianzursachen der „Kapsel“	42
Anhangtabelle 2:	Varianzursachen des „Rotkleextraktes“	43
Anhangtabelle 3:	Varianzursachen der „Nullvarianten“	44
Anhangtabelle 4:	Varianzursachen der Keimgeschwindigkeit	45
Anhangtabelle 5:	Übersicht über Keimgeschwindigkeit	45
Anhangtabelle 6:	Transformierte Keimungsraten	46

Anhangabbildungen

Anhangabbildungen 1:	Keimungsrate „Kapsel“	48
Anhangabbildungen 2:	Keimungsrate „Rotkleextrakt“	51
Anhangabbildungen 3:	Keimungsrate „Nullvarianten“	54
Anhangabbildungen 4:	Keimungsverlauf „Kapsel“	57
Anhangabbildungen 5:	Keimungsverlauf „Rotkleextrakt“	58
Anhangabbildung 6:	Keimungsverlauf „Nullvarianten“	59

Anhangtabelle 1: Varianzursachen der „Kapsel“

Kapsel						
Varianzursache	df	Tag 1 MQ/F- Test	Tag 2 MQ/F- Test	Tag 3 MQ/F- Test	Tag 5 MQ/F- Test	Tag 7 MQ/F- Test
Belichtung	1	,00	437,65 *	,00	8,17	42,56
Lösungsmittel	1	,00	552,08 **	9368,19 **	3842,44 **	1483,65 **
Verdünnung	3	,00	208,31 *	3247,29 **	1963,27 **	687,23 **
Belichtung * Lösungsmittel	1	,00	203,89	,34	30,80	43,49
Belichtung * Verdünnung	3	,00	26,19	7,89	27,72	45,68
Lösungsmittel * Verdünnung	3	,00	70,59	2717,59 **	1303,01 **	453,64 **
Belichtung * Lösungsmittel * Verdünnung	3	,00	50,57	81,35	108,53	262,39 **
Fehler	48	,00	72,43	61,68	78,20	45,85
Gesamt	64					

Varianzursache	df	Tag 10 MQ/F-Test	Tag 12 MQ/F-Test	Tag 14 MQ/F-Test	Tag 17 MQ/F-Test	Tag 21 MQ/F-Test	Keimgeschwindigkeit MQ/F-Test
Belichtung	1	104,11	97,95	78,08	34,39	13,36	,77
Lösungsmittel	1	1233,50 **	1255,17 **	1064,09 **	1081,01 **	1027,07 **	36,08 **
Verdünnung	3	655,61 **	580,77 **	522,96 **	538,11 **	542,38 **	12,82 **
Belichtung * Lösungsmittel	1	55,67	27,71	,95	2,77	,30	2,32
Belichtung * Verdünnung	3	42,63	38,72	88,34	98,45 *	121,70 *	,99
Lösungsmittel * Verdünnung	3	378,99 **	382,02 **	284,15 **	294,15 **	246,34 **	13,56 **
Belichtung * Lösungsmittel * Verdünnung	3	234,29 **	238,63 **	225,65 **	212,22 **	214,93 **	1,25
Fehler	48	37,23	33,65	31,72	35,04	38,93	,72
Gesamt	64						

Signifikanzniveau:

* ≤ 0,05 (5 %)

** ≤ 0,01 (1%)

Anhangtabelle 2: Varianzursachen des „Rotkleeextraktes“

Rotklee-Extrakt							
Varianzursache	df	Tag 1 MQ/F- Test	Tag 2 MQ/F- Test	Tag 3 MQ/F- Test	Tag 5 MQ/F- Test	Tag 7 MQ/F- Test	
Belichtung	1	,00 **	704,94 **	795,88 **	134,27	92,62	
Lösungsmittel	1	,00 **	434,89 **	5774,60 **	3802,50 **	1953,12 **	
Verdünnung	3	,00 **	137,16	2309,33	2101,87 **	832,41 **	
Belichtung * Lösungsmittel	1	,00 **	361,09 *	105,18	15,84	50,74	
Belichtung * Verdünnung	3	,00 **	11,55	157,28 **	129,99	106,66	
Lösungsmittel * Verdünnung	3	,00 **	102,47	3137,09	1303,81 **	475,44 **	
Belichtung * Lösungsmittel * Verdünnung	3	,00 **	110,15	97,03	129,51	144,53	
Fehler	48	,00	55,49	131,59	123,86	99,35	
Gesamt	64						

Varianzursache	df	Tag 10 MQ/F- Test	Tag 12 MQ/F- Test	Tag 14 MQ/F- Test	Tag 17 MQ/F- Test	Tag 21 MQ/F- Test	Keimgeschwindigkeit MQ/F-Test
Belichtung	1	193,27	106,44	24,64	20,06	10,74	5,01 **
Lösungsmittel	1	1824,41 **	1565,13 **	1506,81 **	1397,80 **	1211,59 **	28,05 **
Verdünnung	3	756,65 **	698,66 **	633,68 **	596,59 **	587,50 **	12,13 **
Belichtung * Lösungsmittel	1	45,31	20,13	8,32	2,11	,06	4,03 *
Belichtung * Verdünnung	3	100,68	132,84	126,05	116,48	101,46	,26
Lösungsmittel * Verdünnung	3	467,70 **	528,17 **	412,06 **	399,34 *	393,86 *	13,23 **
Belichtung * Lösungsmittel * Verdünnung	3	194,65	183,96	126,23	111,47	124,13	1,32
Fehler	48	97,26	97,26	94,02	95,49	97,30	,68
Gesamt	64						

Signifikanzniveau:

* ≤ 0,05 (5 %)

** ≤ 0,01 (1%)

Anhangtabelle 3: Varianzursachen der „Nullvarianten“

Nullvarianten						
Varianzursache	df	Tag 1 MQ/F- Test	Tag 2 MQ/F- Test	Tag 3 MQ/F- Test	Tag 5 MQ/F- Test	Tag 7 MQ/F- Test
Belichtung	1	,00 **	135,29	1,29	,04	143,31
Lösungsmittel	1	,00 **	262,43 *	7688,22 **	13436,16 **	17066,10 **
Verdünnung	1	,00 **	262,43 *	6907,97 **	4382,58 **	2954,39 **
Belichtung * Lösungsmittel	1	,00 **	135,29	1,29	25,13	217,35
Belichtung * Verdünnung	1	,00 **	135,29	32,54	107,36	109,83
Lösungsmittel * Verdünnung	1	,00 **	262,43 *	6907,97 **	2729,08 **	309,31
Belichtung * Lösungsmittel * Verdünnung	1	,00 **	135,29	32,54	36,59	225,66
Fehler	24	,00	41,16	18,34	127,64	87,06
Gesamt	32	,00				

Varianzursache	df	Tag 10 MQ/F-Test	Tag 12 MQ/F-Test	Tag 14 MQ/F-Test	Tag 17 MQ/F-Test	Tag 21 MQ/F-Test	Keimgeschwindigkeit MQ/F-Test
Belichtung	1	450,48 *	468,49 *	402,81	596,57 *	562,55 *	3,56
Lösungsmittel	1	11183,76 **	8560,53 **	7272,10 **	6580,88 **	6317,01 **	151,66 **
Verdünnung	1	3961,27 **	4181,99 **	3477,34 **	3628,73 **	3829,37 **	4,56
Belichtung * Lösungsmittel	1	434,38 *	532,03 *	821,18 *	1140,52 **	1254,19 **	18,36
Belichtung * Verdünnung	1	133,27	136,52	73,81	40,45	22,25	3,86
Lösungsmittel * Verdünnung	1	3,71	,02	1,79	11,34	54,18	85,45 *
Belichtung * Lösungsmittel * Verdünnung	1	215,60	206,44	106,00	82,71	70,36	29,09
Fehler	24	88,08	88,73	104,83	107,04	109,18	10,94
Gesamt	32						

Signifikanzniveau:

* ≤ 0,05 (5 %)

** ≤ 0,01 (1%)

Anhangtabelle 4: Varianzursachen der Keimgeschwindigkeit

Keimgeschwindigkeit					
Varianzursache	df	Keimgeschwindigkeit Kapsel	Keimgeschwindigkeit Rotklee-Extrakt	Keimgeschwindigkeit Nullvarianten	
		MQ/F-Test	MQ/F-Test	MQ/F-Test	
Belichtung	1	,77	5,01 **	3,56	
Lösungsmittel	1	36,08 **	28,05 **	151,66 **	
Verdünnung	3	12,82 **	12,13 **	4,56	
Belichtung *					
Lösungsmittel	1	2,32	4,03 *	18,36	
Belichtung *					
Verdünnung	3	,99	,26	3,86	
Lösungsmittel *					
Verdünnung	3	13,56 **	13,23 **	85,45 *	
Belichtung *					
Lösungsmittel *	3	1,25	1,32	29,09	
Verdünnung					
Fehler	48	,72	,68	10,94	
Gesamt	64				

Anhangtabelle 5 Übersicht über Keimgeschwindigkeit

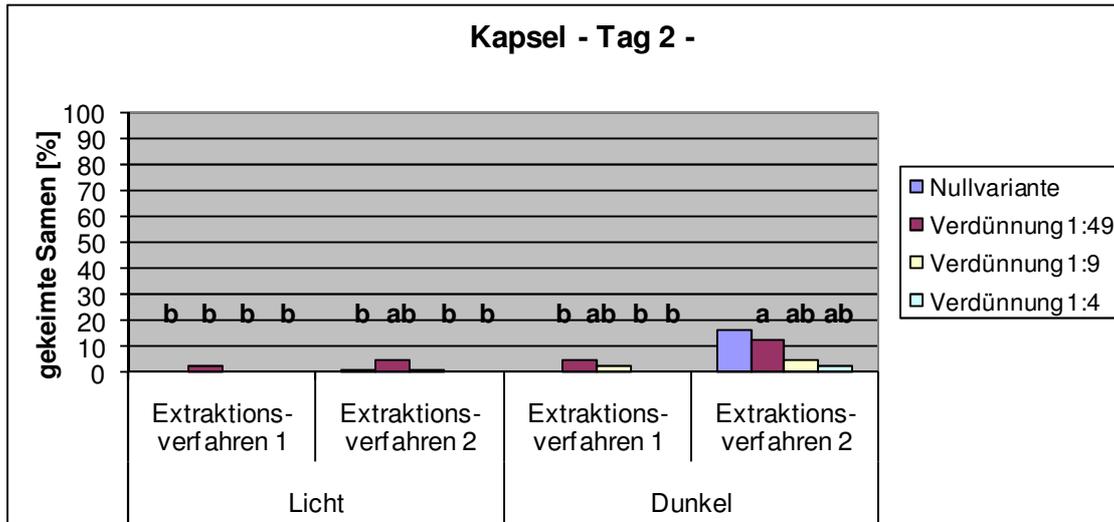
Keimgeschwindigkeit (Mittelwerte in Tagen)		Licht		Dunkel		Mittelwerte der Verdünnungsstufen
Verdünnung		Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee	
Extraktionsverfahren 1	01:04	5,3	3,9	5,4	4,1	4,7
	01:09	3,8	3,7	4,3	4,3	4,0
	01:49	3,6	3,4	3,3	4,8	3,8
	0	11,0	6,5	6,3	8,6	8,1
Extraktionsverfahren 2	01:04	3,8	3,5	3,6	3,8	3,7
	01:09	3,4	3,7	3,7	4,0	3,7
	01:49	3,8	3,3	3,5	3,3	3,5
	0	11,0	3,7	11,4	3,4	7,3
Mittelwerte der Lichtstrategien			4,8		4,9	

Anhangtabelle 6
Transformierte Keimungsraten

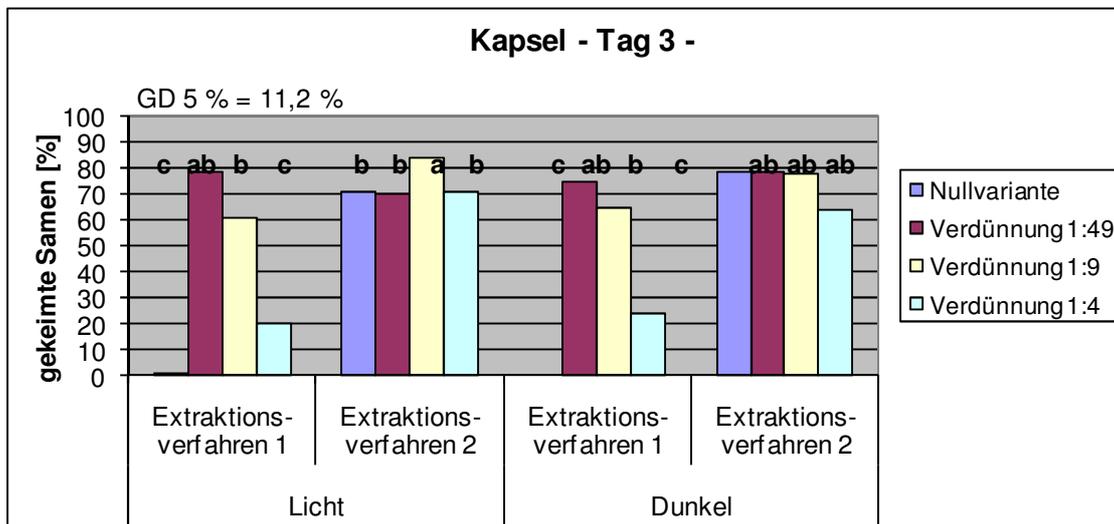
Tag 2		Licht		Dunkel	
	Verdünnung	Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee
Extraktionsverfahren 1	01:04	0,00	0,00	0,00	6,46
	01:09	0,00	0,00	6,46	3,23
	01:49	6,46	7,84	6,64	5,70
	0	0,00	0,00	0,00	0,00
Extraktionsverfahren 2	01:04	0,00	0,00	4,61	4,61
	01:09	3,23	3,23	9,22	9,69
	01:49	9,22	3,23	17,37	21,26
	0	0,00	3,23	0,00	19,68
Tag 3		Licht		Dunkel	
	Verdünnung	Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee
Extraktionsverfahren 1	01:04	26,39	52,25	29,09	50,11
	01:09	51,63	61,86	54,08	50,70
	01:49	63,09	59,43	60,57	37,50
	0	0,00	3,23	0,00	0,00
Extraktionsverfahren 2	01:04	58,34	61,86	53,50	51,27
	01:09	66,78	53,80	61,72	48,52
	01:49	57,47	68,88	63,09	61,95
	0	0,00	57,97	0,00	62,80
Tag 5		Licht		Dunkel	
	Verdünnung	Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee
Extraktionsverfahren 1	01:04	57,25	62,18	53,95	63,52
	01:09	63,66	68,44	68,44	62,66
	01:49	69,53	68,60	63,61	61,43
	0	3,23	26,11	0,00	22,15
Extraktionsverfahren 2	01:04	69,82	75,09	64,33	68,30
	01:09	75,52	63,59	70,77	69,89
	01:49	65,47	82,16	70,77	67,40
	0	6,64	62,18	6,46	69,82
Tag 7		Licht		Dunkel	
	Verdünnung	Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee
Extraktionsverfahren 1	01:04	66,66	66,93	66,85	66,64
	01:09	65,32	70,77	69,39	67,56
	01:49	72,94	69,40	63,61	64,19
	0	7,84	47,91	0,00	39,87
Extraktionsverfahren 2	01:04	77,55	76,46	64,33	74,00
	01:09	75,52	65,89	71,86	70,63
	01:49	67,36	85,39	74,32	70,63
	0	22,44	64,33	11,39	74,32
Tag 10		Licht		Dunkel	
	Verdünnung	Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee
Extraktionsverfahren 1	01:04	70,63	66,93	68,88	66,64
	01:09	66,27	75,09	69,39	69,36
	01:49	74,32	69,40	64,69	64,19
	0	16,99	51,52	3,23	42,12
Extraktionsverfahren 2	01:04	78,93	81,07	66,07	75,09
	01:09	77,55	65,89	72,94	71,71
	01:49	68,74	86,77	74,32	70,63
	0	39,67	65,18	23,69	74,32

Tag 12		Licht		Dunkel	
	Verdünnung	Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee
Extraktionsverfahren 1	01:04	70,63	66,93	69,82	67,50
	01:09	66,27	75,09	69,39	73,49
	01:49	74,32	70,34	65,55	65,28
	0	22,70	52,29	7,84	43,58
Extraktionsverfahren 2	01:04	78,93	81,07	66,07	75,09
	01:09	78,93	65,89	72,94	72,48
	01:49	69,82	86,77	74,32	70,63
	0	46,46	65,99	29,71	75,70
Tag 14		Licht		Dunkel	
	Verdünnung	Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee
Extraktionsverfahren 1	01:04	71,43	66,93	70,77	69,39
	01:09	67,21	75,09	70,48	73,49
	01:49	74,32	70,34	65,55	65,28
	0	28,16	52,29	11,53	48,65
Extraktionsverfahren 2	01:04	82,16	81,07	66,07	75,09
	01:09	78,93	66,75	72,94	73,86
	01:49	69,82	86,77	74,32	73,86
	0	50,08	65,99	32,25	75,70
Tag 17		Licht		Dunkel	
	Verdünnung	Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee
Extraktionsverfahren 1	01:04	71,43	67,88	71,86	69,39
	01:09	67,21	75,09	71,57	73,49
	01:49	75,70	70,34	65,55	66,66
	0	31,14	52,29	11,53	50,13
Extraktionsverfahren 2	01:04	82,16	81,07	66,07	75,09
	01:09	78,93	66,75	77,55	73,86
	01:49	69,82	86,77	74,32	73,86
	0	54,60	66,93	33,05	75,70
Tag 21		Licht		Dunkel	
	Verdünnung	Kapsel	Rotklee	Kapsel	Rotklee
Extraktionsverfahren 1	01:04	71,43	67,88	71,86	69,39
	01:09	67,21	76,46	74,32	73,49
	01:49	75,70	70,34	65,55	68,78
	0	31,14	52,29	11,53	51,79
Extraktionsverfahren 2	01:04	82,16	81,07	66,07	75,09
	01:09	78,93	66,75	77,55	73,86
	01:49	71,20	86,77	75,70	73,86
	0	56,92	66,93	34,72	75,70

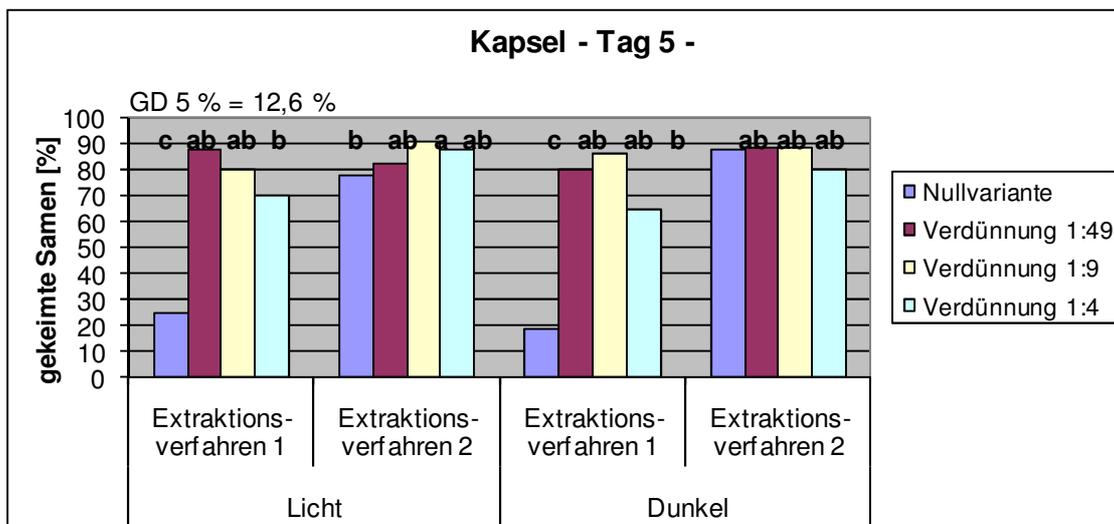
Anhangabbildungen 1: Keimungsrate „Kapsel“



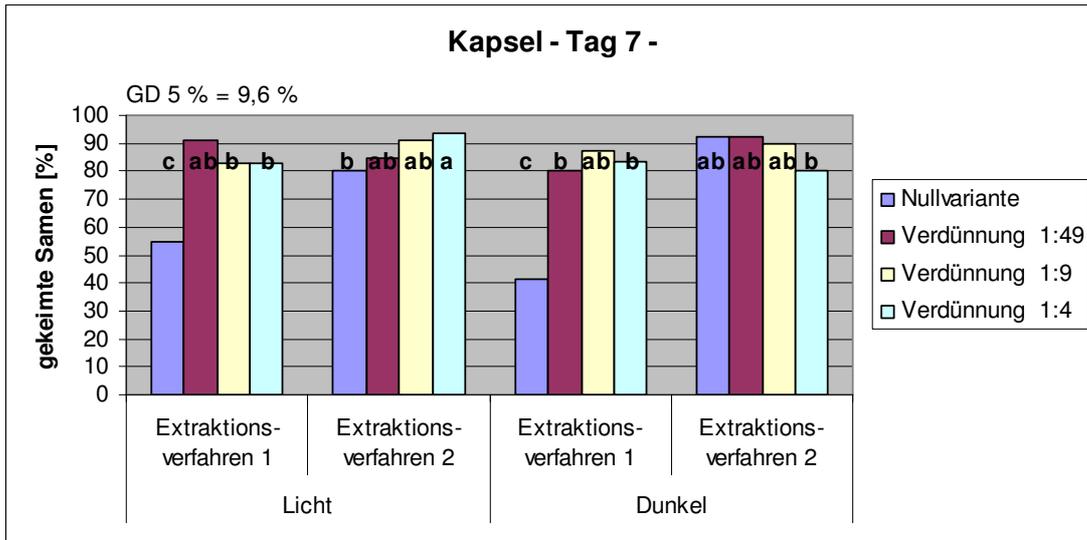
Anhangabbildung 1a: Keimungsrate „Kapsel“ Tag 2



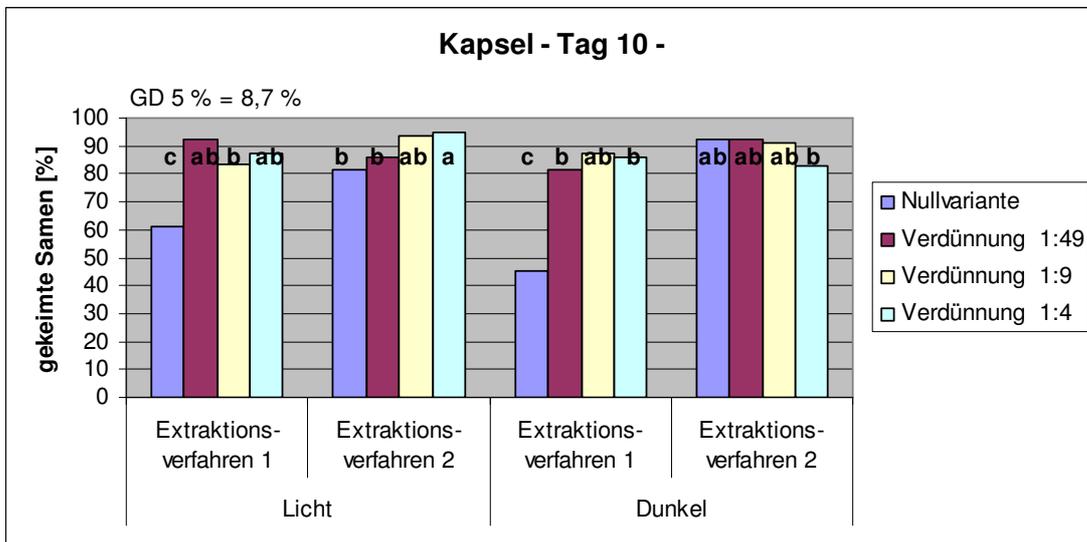
Anhangabbildung 1b: Keimungsrate „Kapsel“ Tag 3



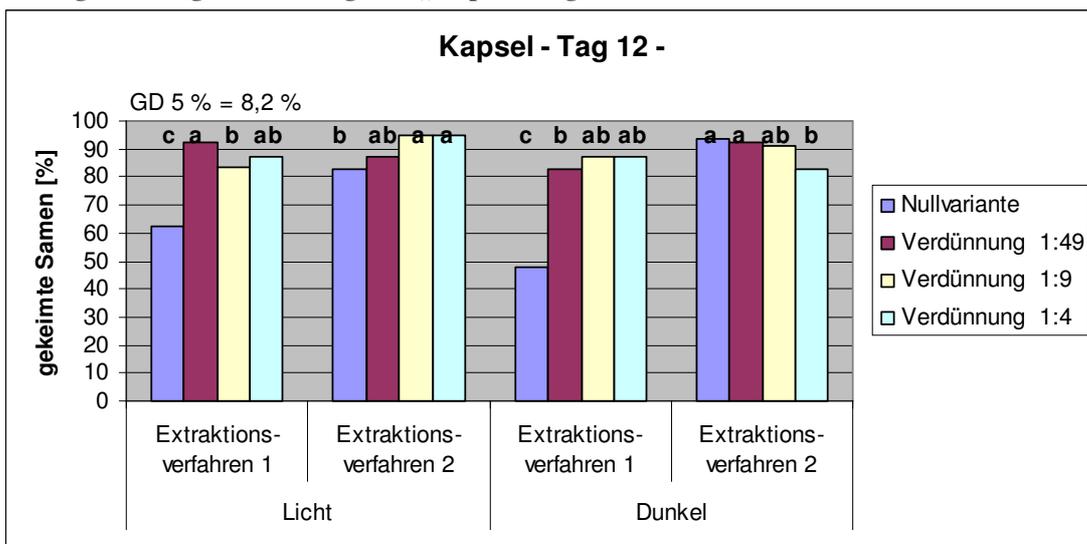
Anhangabbildung 1c: Keimungsrate „Kapsel“ Tag 5



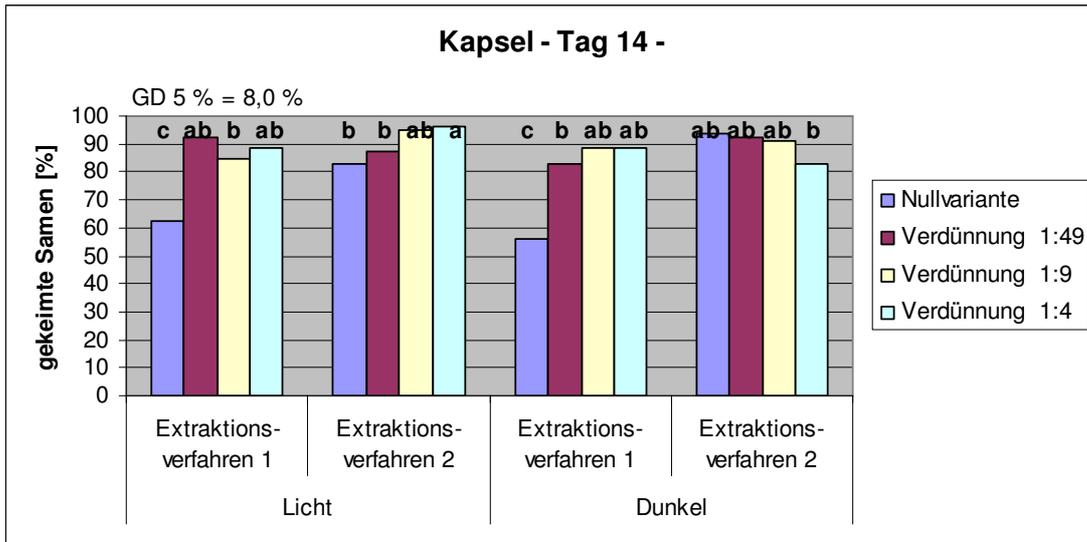
Anhangabbildung 1d: Keimungsrate „Kapsel“ Tag 7



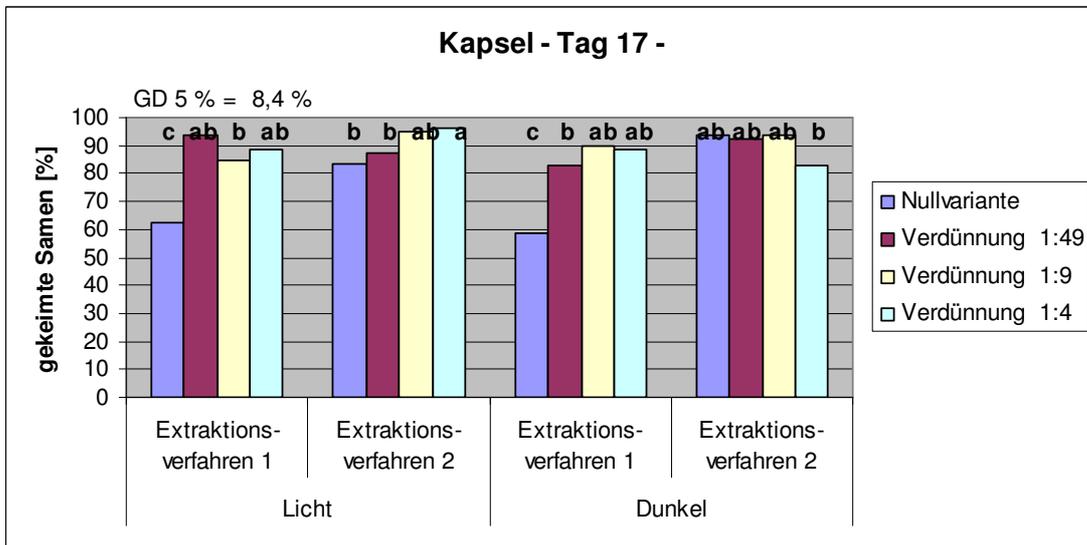
Anhangabbildung 1e: Keimungsrate „Kapsel“ Tag 10



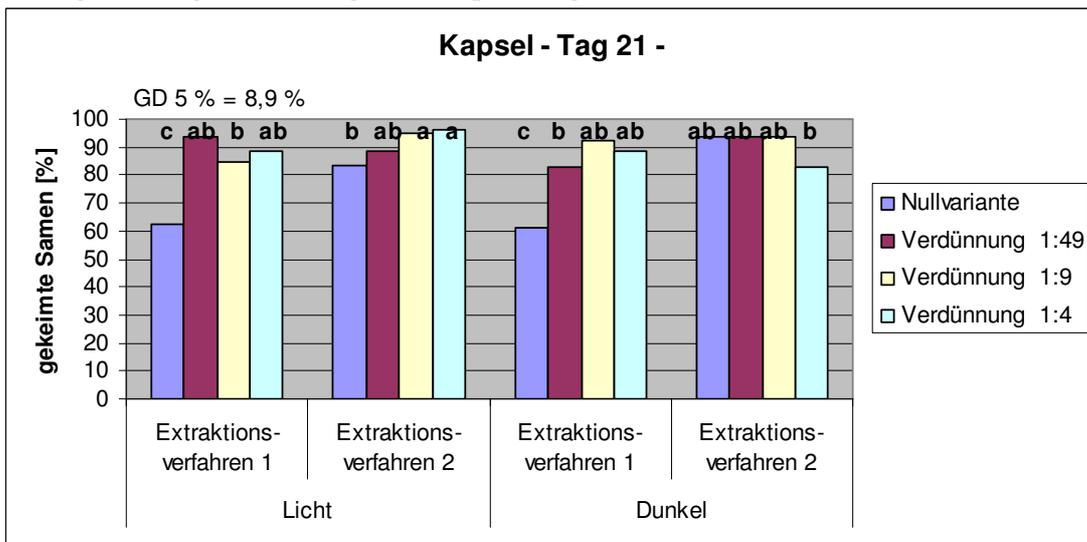
Anhangabbildung 1f: Keimungsrate „Kapsel“ Tag 12



Anhangabbildung 1g: Keimungsrate „Kapsel“ Tag 14

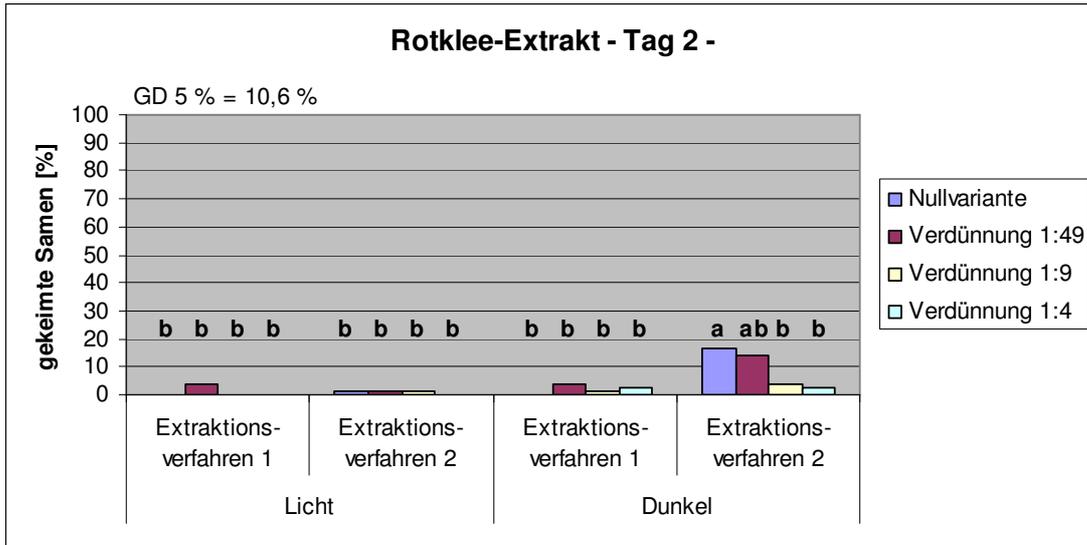


Anhangabbildung 1h: Keimungsrate „Kapsel“ Tag 17

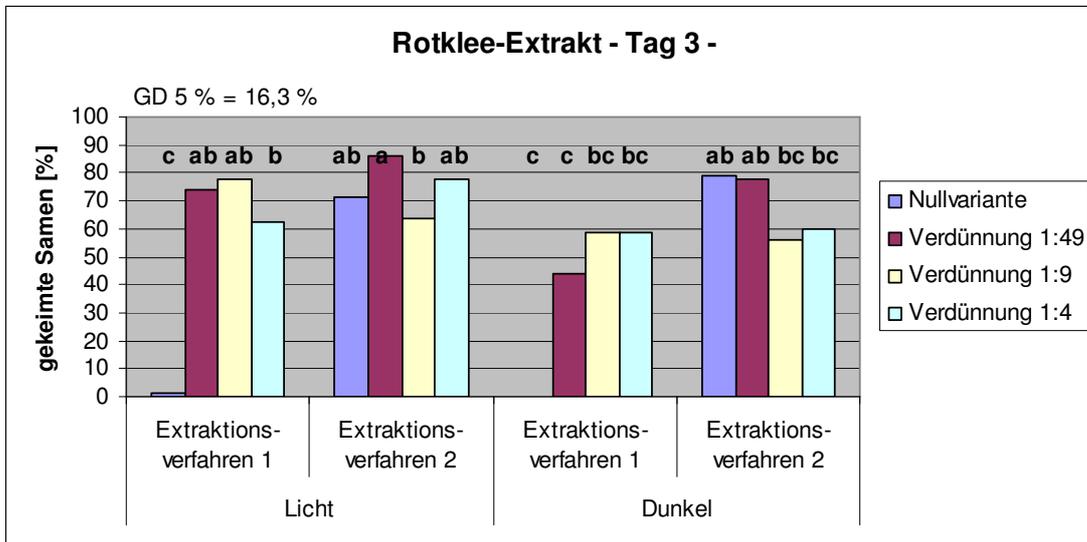


Anhangabbildung 1i: Keimungsrate „Kapsel“ Tag 21

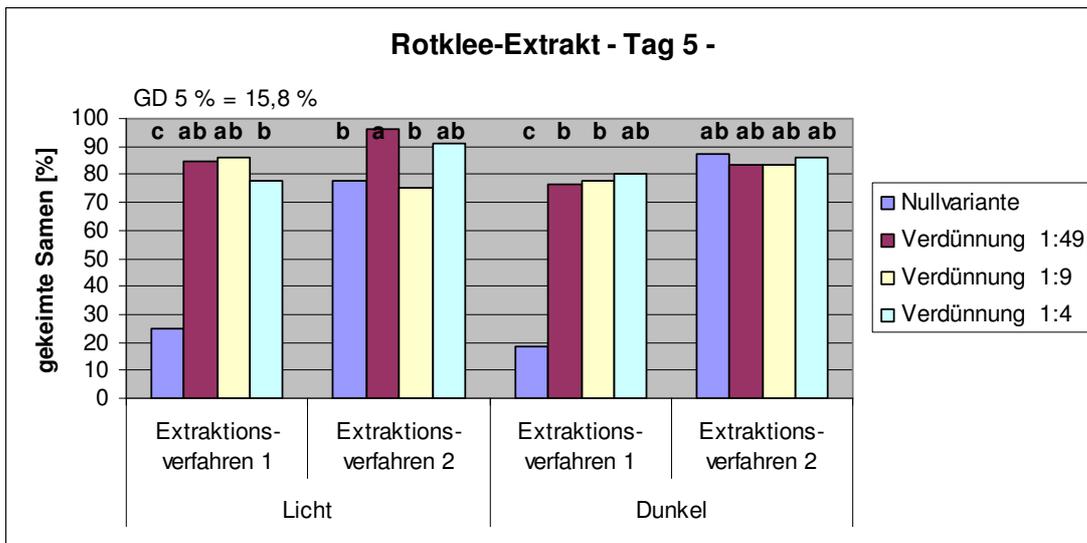
Anhangabbildungen 2: Keimungsrate „Rotkleextrakt“



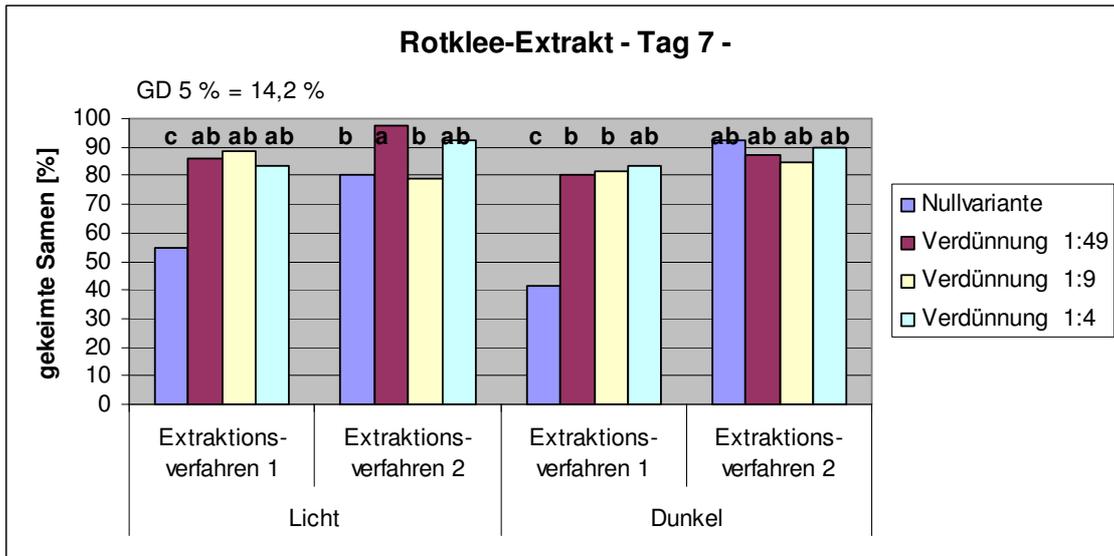
Anhangabbildung 2a: Keimungsrate „Rotkleextrakt“ Tag 2



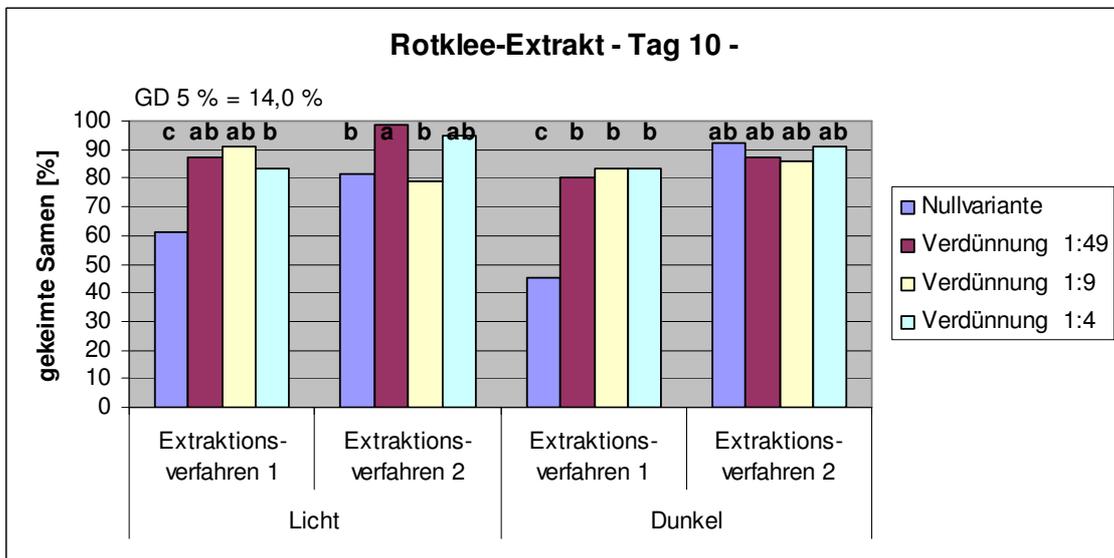
Anhangabbildung 2b: Keimungsrate „Rotkleextrakt“ Tag 3



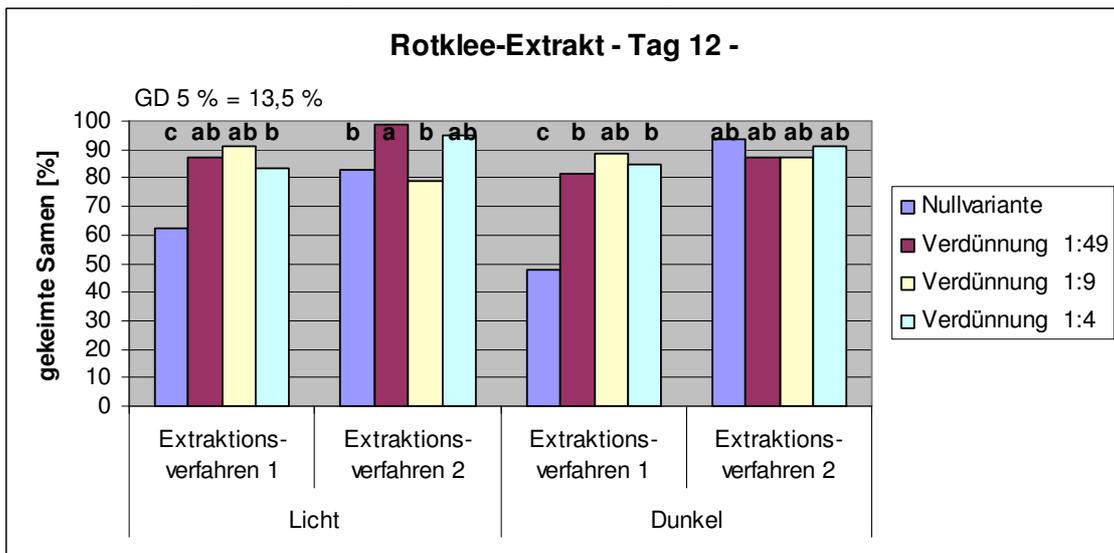
Anhangabbildung 2c: Keimungsrate „Rotkleextrakt“ Tag 5



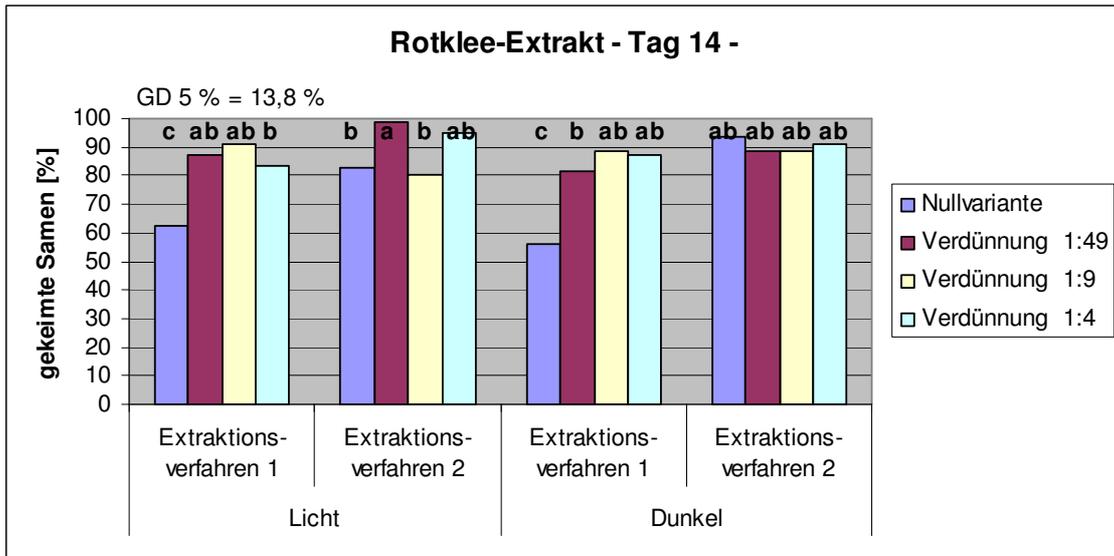
Anhangabbildung 2d: Keimungsrate „Rotkleeextrakt“ Tag 7



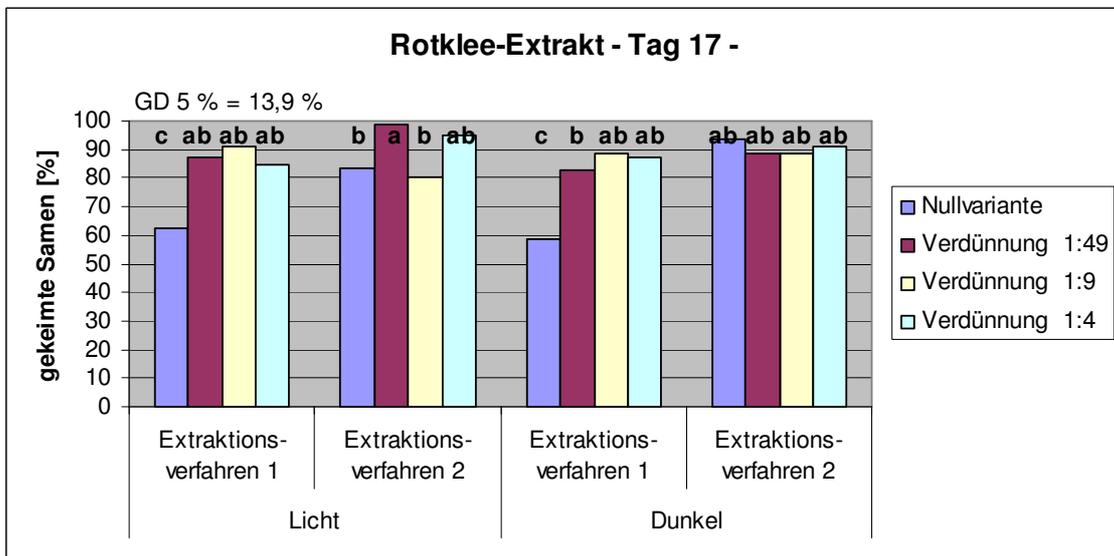
Anhangabbildung 2e: Keimungsrate „Rotkleeextrakt“ Tag 10



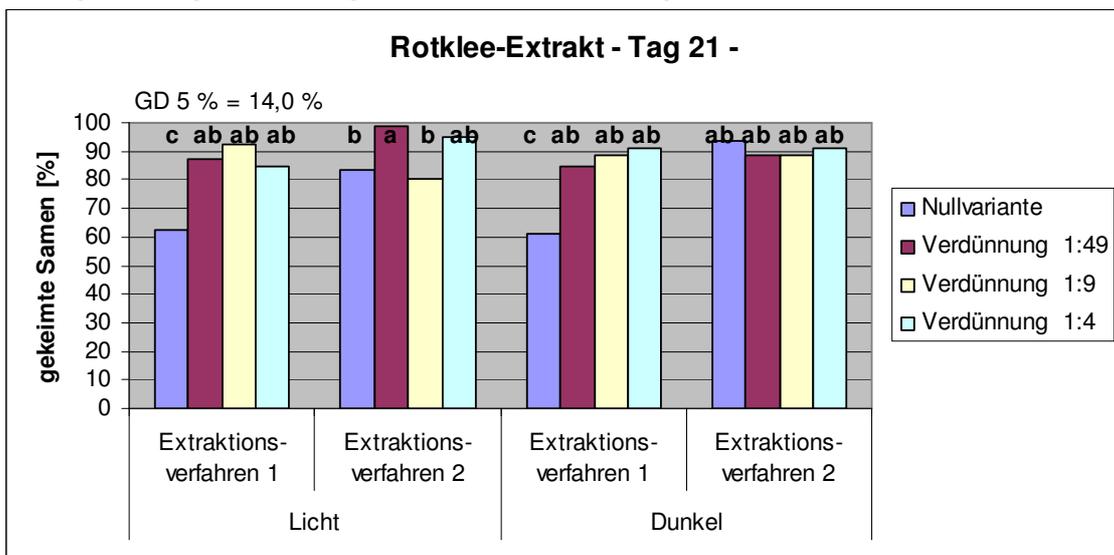
Anhangabbildung 2f: Keimungsrate „Rotkleeextrakt“ Tag 12



Anhangabbildung 2g: Keimungsrate „Rotkleeextrakt“ Tag 14

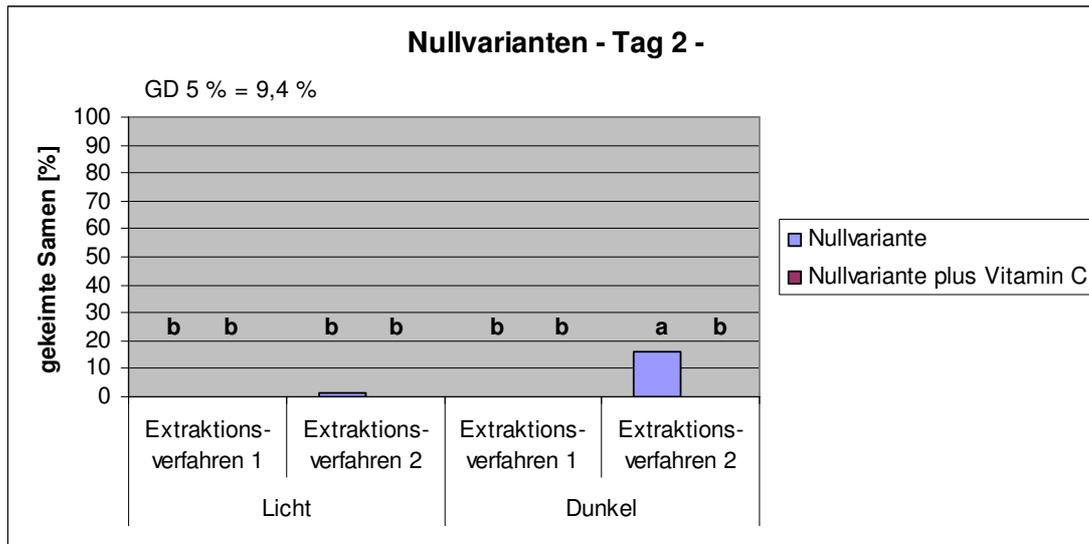


Anhangabbildung 2h: Keimungsrate „Rotkleeextrakt“ Tag 17

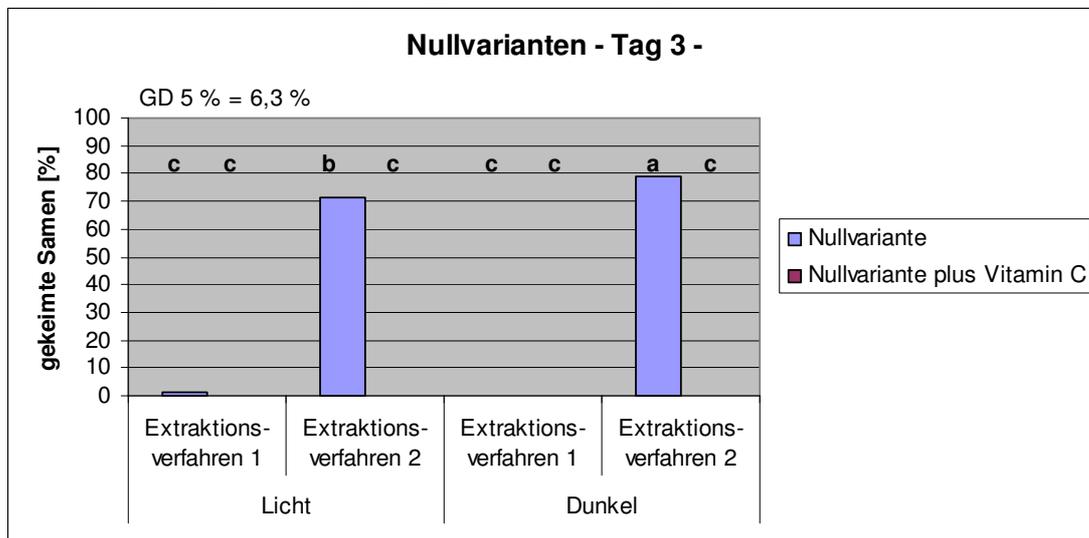


Anhangabbildung 2i: Keimungsrate „Rotkleeextrakt“ Tag 21

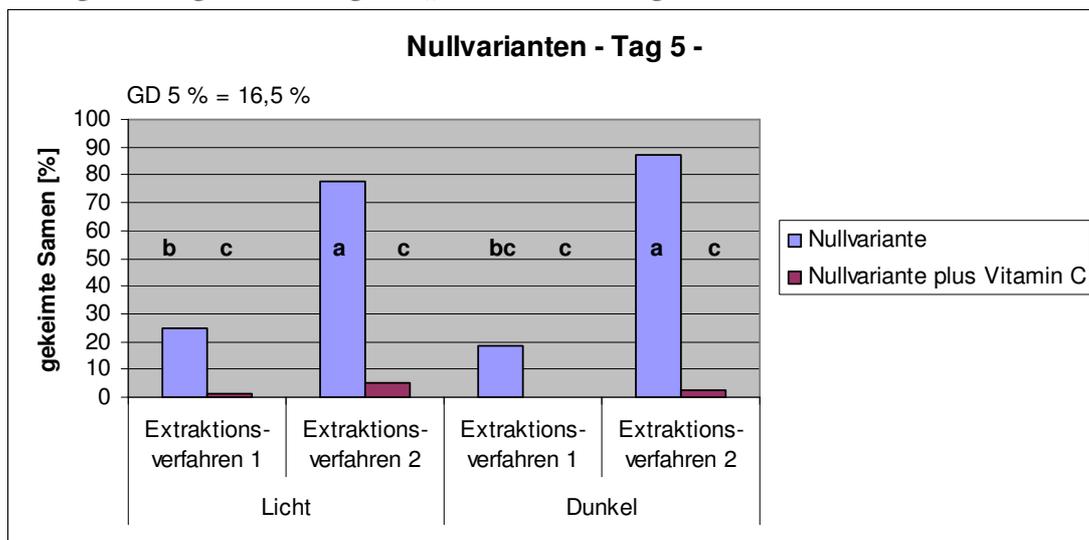
Anhangabbildungen 3: Keimungsrate „Nullvarianten“



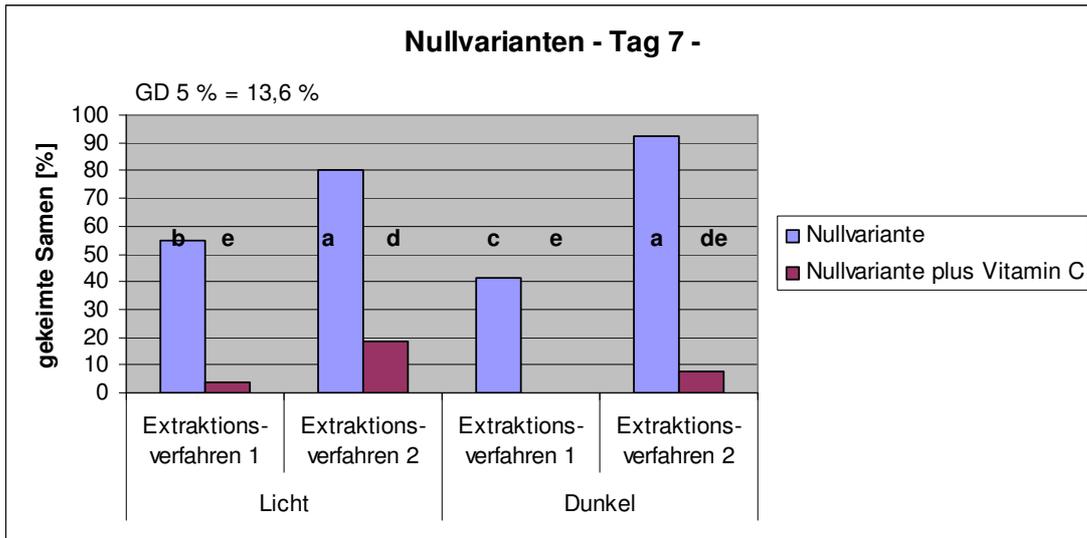
Anhangabbildung 3a: Keimungsrate „Nullvarianten“ Tag 2



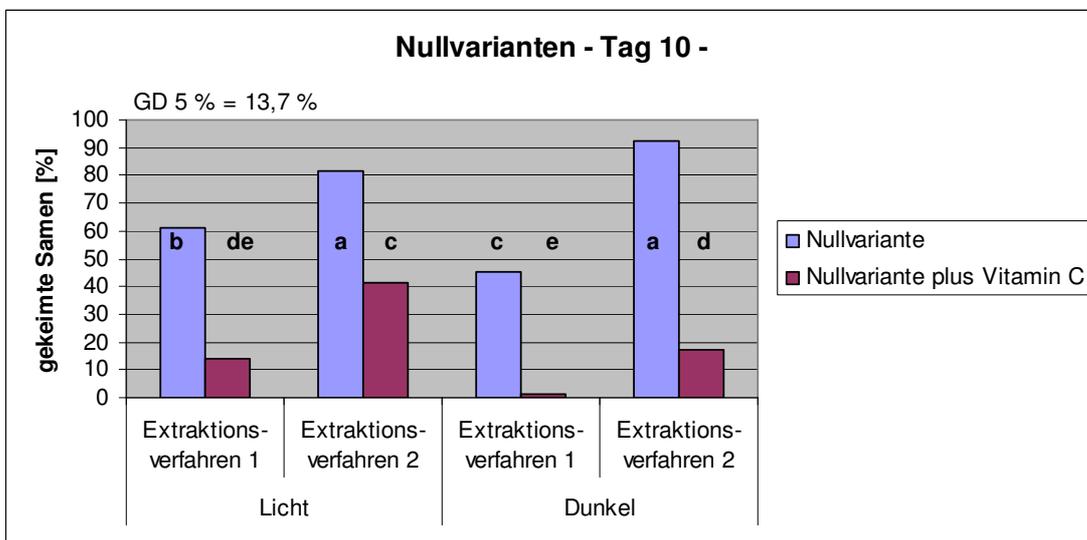
Anhangabbildung 3b: Keimungsrate „Nullvarianten“ Tag 3



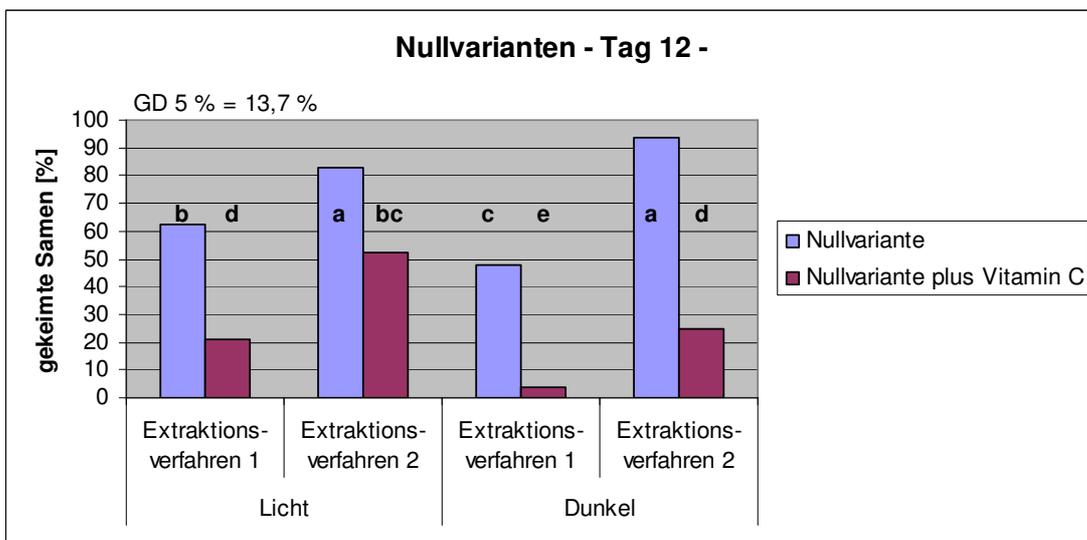
Anhangabbildung 3c: Keimungsrate „Nullvarianten“ Tag 5



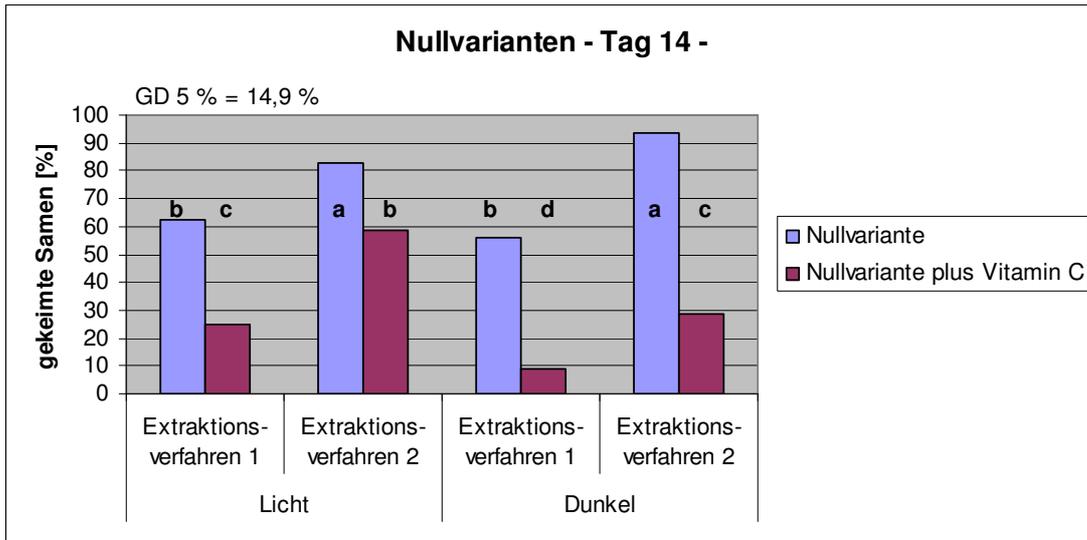
Anhangabbildung 3d: Keimungsrate „Nullvarianten“ Tag 7



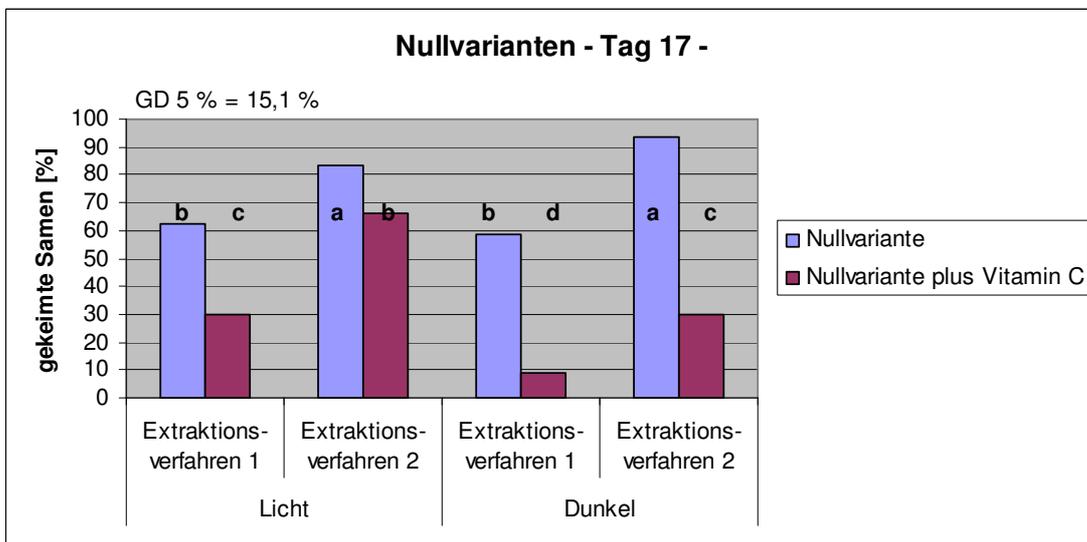
Anhangabbildung 3e: Keimungsrate „Nullvarianten“ Tag 10



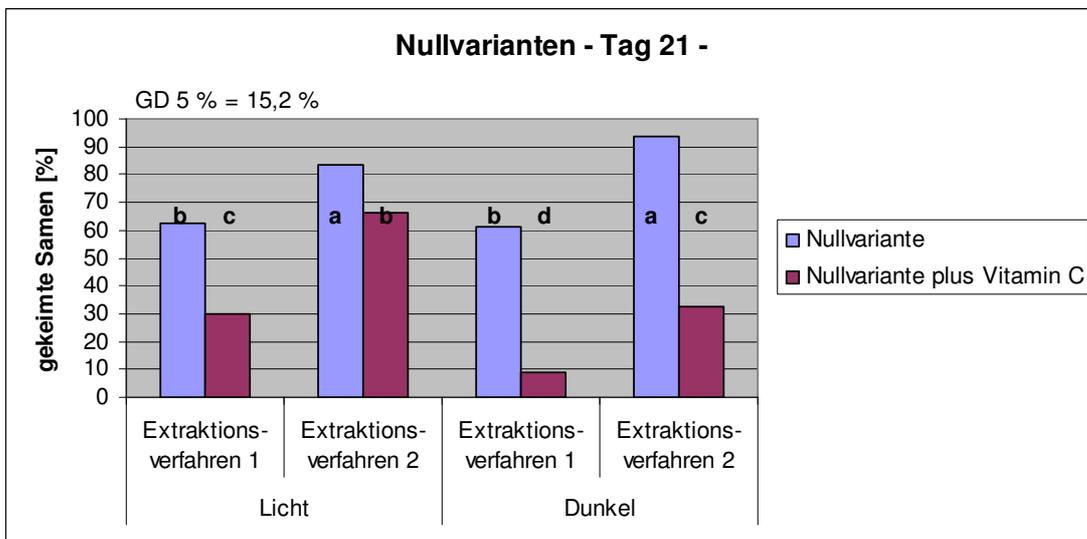
Anhangabbildung 3f: Keimungsrate „Nullvarianten“ Tag 12



Anhangabbildung 3g: Keimungsrate „Nullvarianten“ Tag 14

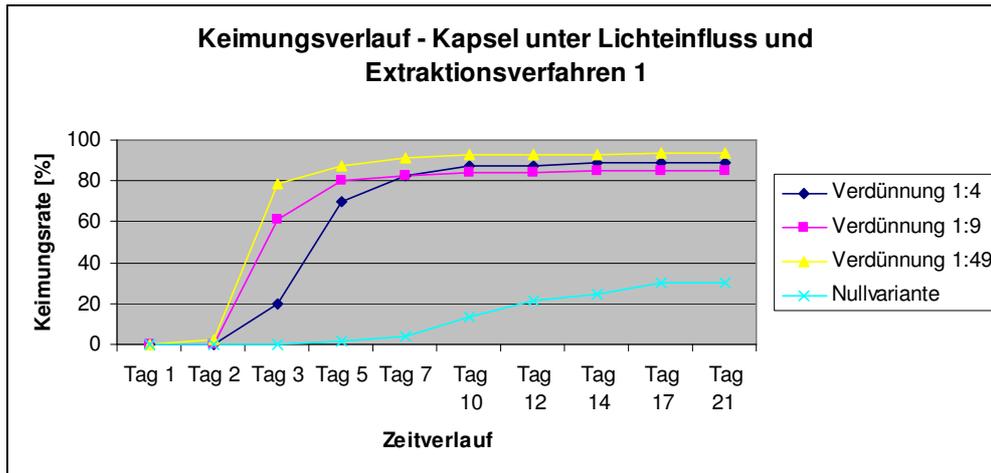


Anhangabbildung 3h: Keimungsrate „Nullvarianten“ Tag 17

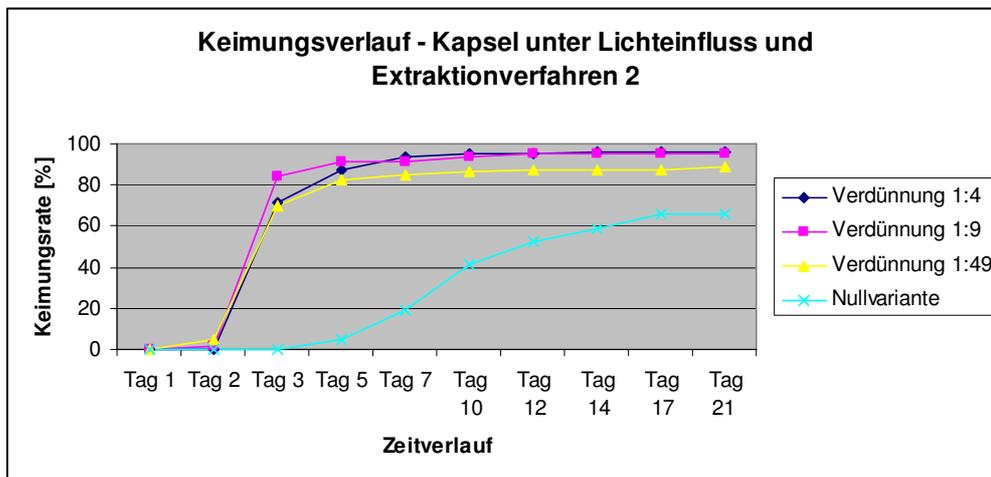


Anhangabbildung 3i: Keimungsrate „Nullvarianten“ Tag 21

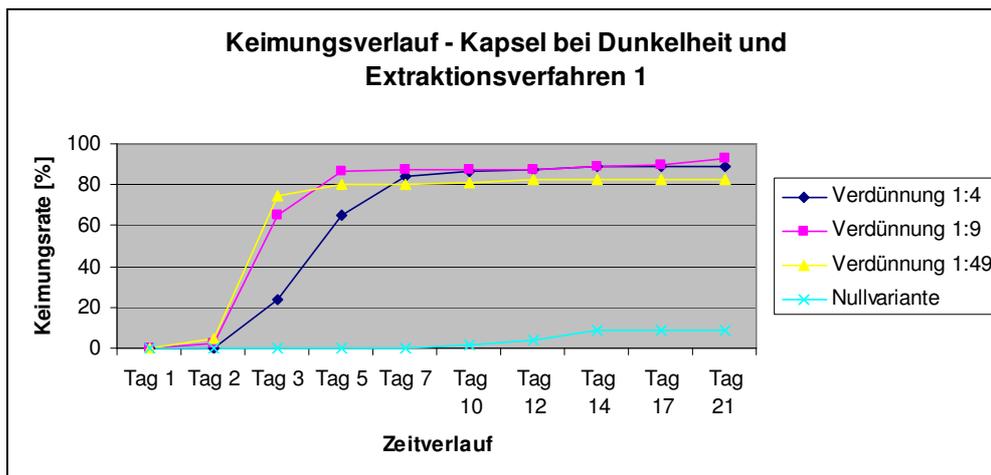
Anhangabbildungen 4



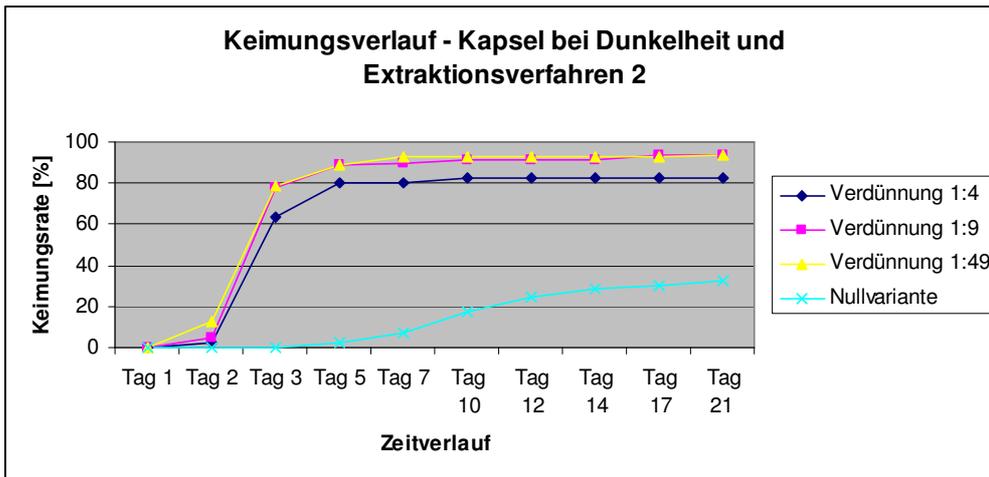
Anhangabbildung 4a: Keimungsverlauf – Kapsel unter Lichteinfluss und Extraktionsverfahren 1



Anhangabbildung 4b: Keimungsverlauf – Kapsel unter Lichteinfluss und Extraktionsverfahren 2

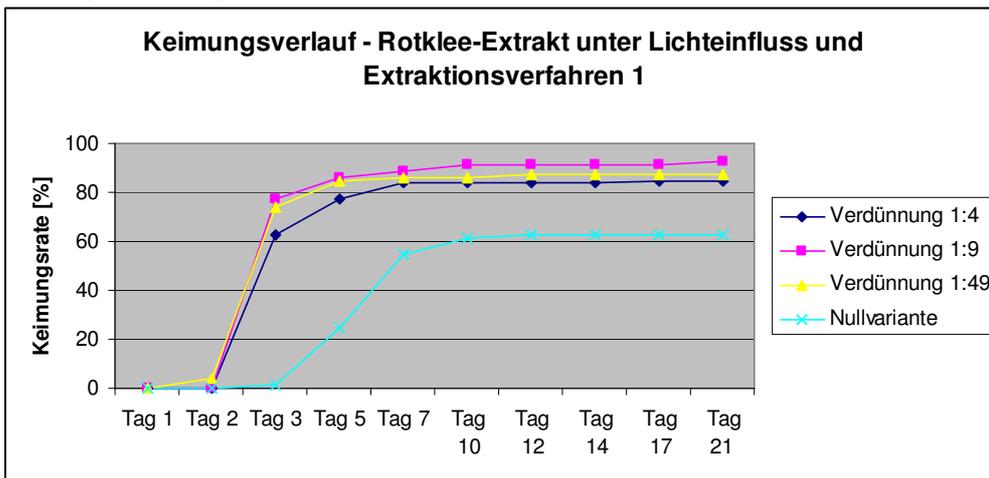


Anhangabbildung 4c: Keimungsverlauf – Kapsel bei Dunkelheit und Extraktionsverfahren 1

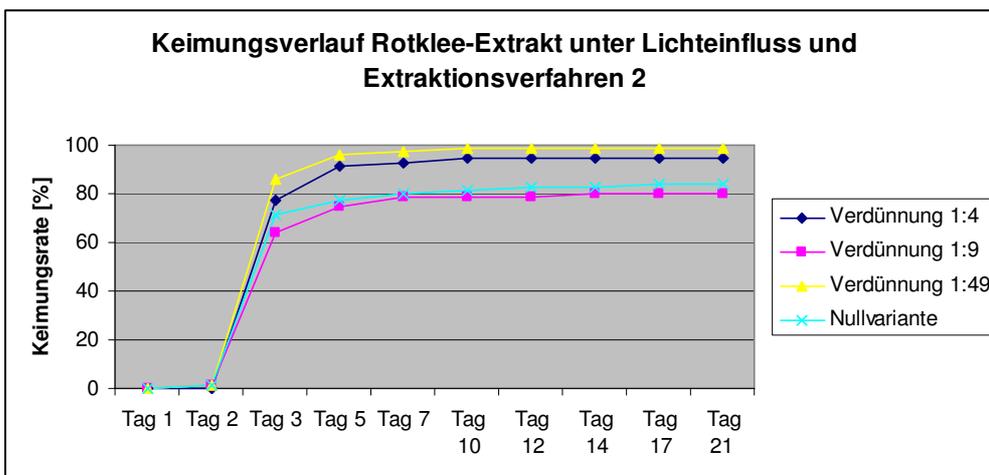


Anhangabbildung 4d: Keimungsverlauf – Kapsel bei Dunkelheit und Extraktionsverfahren 2

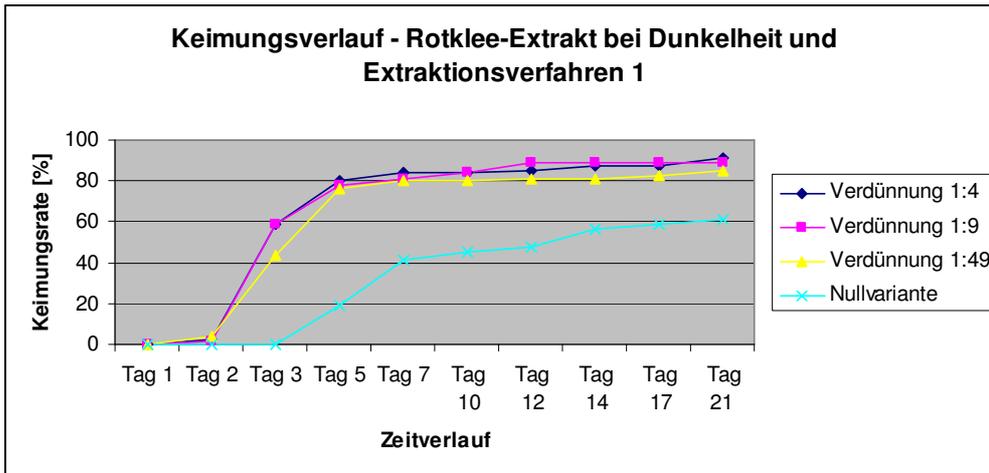
Anhangabbildungen 5



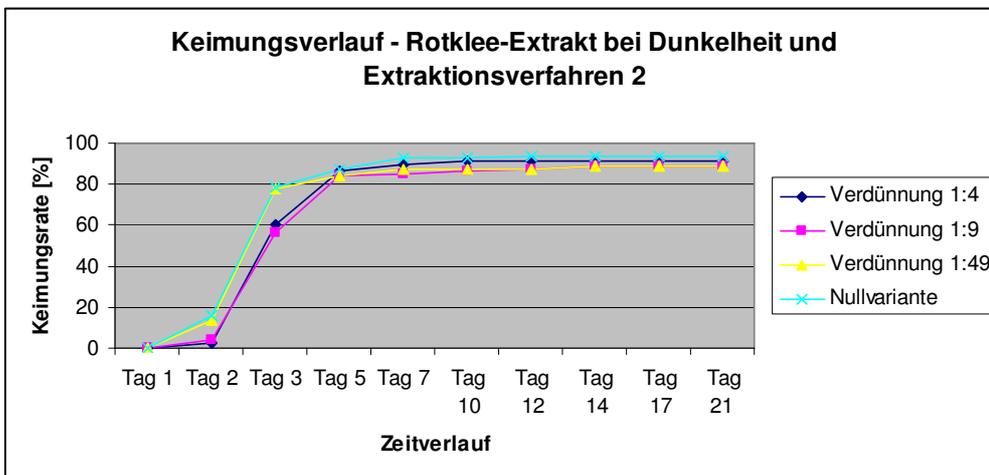
Anhangabbildung 5a: Keimungsverlauf – Rotklee-Extrakt unter Lichteinfluss und Extraktionsverfahren 1



Anhangabbildung 5b: Keimungsverlauf – Rotklee-Extrakt unter Lichteinfluss und Extraktionsverfahren 2

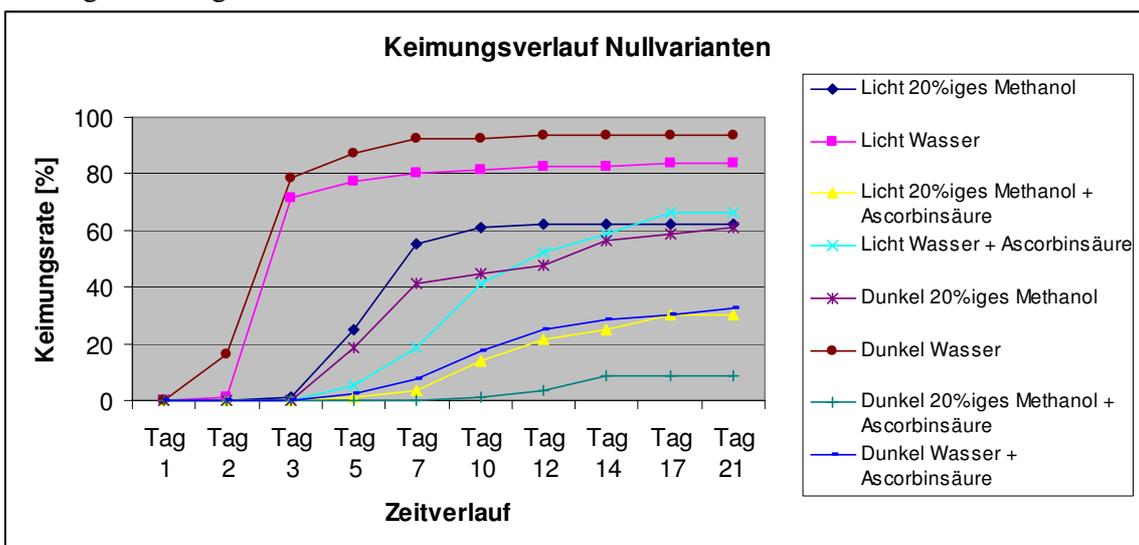


Anhangabbildung 5c: Keimungsverlauf – Rotklee-Extrakt bei Dunkelheit und Extraktionsverfahren 1



Anhangabbildung 5c: Keimungsverlauf – Rotklee-Extrakt bei Dunkelheit und Extraktionsverfahren 2

Anhangabbildung 6



Anhangabbildung 6: Keimungsverlauf – Nullvarianten

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Alexandra Sabine Wening

Gießen, September 2009