

101. Welkstoffe und Antibiotika

18. Mitteilung¹⁾

Diaporthin, ein Welketoxin aus Kulturen von *Endothia parasitica* (Murr.) And.

von A. Boller, E. Gäumann, E. Hardegger, F. Kugler,
St. Naef-Roth und M. Rosner.

(2. IV. 57)

Endothia parasitica (Murr.) And., der Erreger des Kastanienkrebses, hat durch äusserst heftige Epidemien die Edelkastanie (*Castanea*) Nordamerikas in den letzten 50 Jahren praktisch zum Verschwinden gebracht. Ein gleiches Schicksal ist auch für die Kastanienwälder Europas zu erwarten, falls es nicht rechtzeitig gelingt, resistente Kastanienarten zu züchten oder die Krankheit anderweitig einzudämmen. — Die vom Kastanienkrebs befallenen Bäume gehen in der Regel ein.

G. Bazzigher²⁾ konnte 1953 zeigen, dass *in vitro*-Kulturen von *Endothia* ein Welketoxin enthalten, das er Diaporthin nannte. Diaporthin ist in neutraler Lösung bis 100° stabil; von verdünntem Alkali wird es bei 20° zerstört. Diaporthin kann an Kohle adsorbiert und daraus mit Methanol eluiert, bzw. dem *Endothia*-Kulturfiltrat mit verschiedenen Lösungsmitteln (Benzol, Äther, Chloroform, Essigester, Butanol) entzogen werden. Am besten geeignet zur Gewinnung des Diaporthins erwies sich die Extraktion der Kulturfiltrate mit Benzol, das relativ wenig Nebenprodukte mitextrahierte. Die Benzol-extrakte enthielten etwa 10% Diaporthin und erzeugten in Kastanienpflanzen Krankheitssymptome, wie sie beim natürlichen Verlauf des Kastanienkrebses beobachtet werden. Analoge Schädigungen traten in Tomatenpflanzen auf.

Aus den Benzol-Extrakten konnte das Diaporthin, trotz seiner Empfindlichkeit gegenüber Alkali, bei raschem Arbeiten von zum Teil ebenfalls physiologisch aktiven Begleitprodukten durch Ausschütteln mit eiskalter 2-n. Natronlauge abgetrennt und durch Gegenstromextraktion bei pH 11 auf etwa 50% angereichert werden. Schonender ist die ebenfalls hier beschriebene Verteilungs-Chromatographie der Benzol-extrakte ohne vorherige Behandlung mit Alkali; sie führte zu einheitlicheren Präparaten. Kristallisation aus Äther-Hexan und Su-

¹⁾ 17. Mitt. Helv. **39**, 505 (1956).

²⁾ Phytopath. Z. **21**, 105 (1953).

blimation im Hochvakuum bei 80° gab schliesslich reines Diaporthin vom Smp. 91,5–92,5° und $[\alpha]_D = +58^\circ$.

Die Ausbeute an Diaporthin war äusserst gering; sie betrug nur ca. 1 mg pro 1 Kulturfiltrat.

Diaporthin zeigt im Papierchromatogramm nach dem Besprühen mit verdünnter Natronlauge bei $R_f = 0,3$ (System *Bush*³⁾ B₃) unter der Hg-Lampe hellviolette Fluoreszenz. Der Nachweis ist äusserst empfindlich und gestattet noch 0,1–0,01 γ Toxin zu erfassen.

Im Welketest⁴⁾ an Tomatensprossen liess sich Diaporthin erst nach Anreicherung quantitativ bestimmen. *Endothia*-Kulturfiltrate waren unwirksam. Das in 4-proz. Alkohol im Welketest geprüfte Toxin schädigt in erster Linie die Stengelpartien, während die Blattspreiten erst bei starker Vergiftung in Mitleidenschaft gezogen werden. Die *Dosis minima*, die als Masstab für die Giftigkeit der Welketoxine dient, lässt sich für Diaporthin anhand seiner Wirkung auf die Stengel der Tomatensprosse auf 220 mg/kg Frischgewicht berechnen (Lycopersamin 150 mg/kg; Fusarinsäure 158 mg/kg). Ferner bewirkt Diaporthin eine 50-proz. Hemmung des Wachstums von *Bacillus subtilis* bei 0,5 mg/cm³, der Konidien von *Alternaria tenuis* bei 0,3 mg/cm³, des Myzels von *Rhizoctonia solani* bei 0,1 mg/cm³, und eine 50-proz. Hemmung der Keimung der Brandsporen von *Ustilago zaeae* bei 0,2 mg/cm³. Bei Konzentrationen bis 5 mg/cm³ war keine Einwirkung auf *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida vulgaris*, *Escherichia coli*, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* festzustellen⁵⁾.

Im Verlauf der Untersuchungen kamen uns die Nachweismethoden des Diaporthins auf Grund von R_f -Wert und Fluoreszenz sowie mit Hilfe des Welketests sehr zustatten. Ihre Anwendung gestattete die laufende Überprüfung der Aufarbeitung und zeigte, dass weder im *Endothia*-Myzel noch in der sterilisierten Nährlösung Diaporthin enthalten ist. Diese letztere Feststellung ist in Anbetracht der geringen Ausbeute von grosser Bedeutung, weil erst dadurch Diaporthin eindeutig als welkaktives Stoffwechselprodukt von *Endothia parasitica* nachgewiesen werden konnte.

Diaporthin, der Bruttoformel C₁₃H₁₄O₅, scheint mit keiner der zahlreichen bisher beschriebenen Verbindungen gleicher Bruttozusammensetzung identisch zu sein. Einem in geringer Menge isolierten Nebenprodukt vom Smp. 76–77° ($[\alpha]_D = +10,3^\circ$) kommt die gleiche Formel zu und in den nichtkristallisierenden Mutterlaugen scheint noch mindestens eine weitere Verbindung C₁₃H₁₄O₅ enthalten zu sein.

³⁾ I. E. Bush, Biochem. J. **50**, 370 (1952).

⁴⁾ E. Gäumann, St. Naeff-Roth & G. Miescher, Phytopath. Z. **16**, 257 (1950).

⁵⁾ E. Gäumann & St. Naeff-Roth, Pflanzenschutzberichte der Bundesanstalt f. Pflanzenschutz, Wien (1957) im Druck.

Die nahe Verwandtschaft dieser Verbindungen folgt anhand der IR.-Spektren⁶⁾.

Aus dem IR.-Spektrum⁶⁾ des Diaporthins ergibt sich das Vorhandensein einer oder mehrerer Hydroxylgruppen (starke Bande bei 2,86 μ). Die starke Bande bei 5,91 μ gehört einer Carbonylgruppe an (kein Ester), die wahrscheinlich mit einem aromatischen System (Banden bei 6,32 μ und 6,63 μ und im Gebiet von 12–15 μ) oder einer cis-disubstituierten oder trisubstituierten (Bande bei 12 μ) oder auch einer tri- oder tetrasubstituierten C=C-Doppelbindung (Bande bei 6,11 μ) in Konjugation steht. Im UV. zeigt das Diaporthin Maxima bei 246 m μ (log ϵ = 4,70), 279 m μ (log ϵ = 3,90), 327 m μ (log ϵ = 3,86) mit Schultern bei 259 und 289 m μ .

Diaporthin enthält nach *Zeisel* 1 Methoxyl, nach *Kuhn-Roth* 1 C-Methyl und nach *Zerewitinoff* 2 aktive „H“-Atome. Der pK-Wert von 11,17 (in 80-proz. Methyl-cellosolve) und die rote Eisenchlorid-Reaktion weisen auf mindestens 1 enolisches oder phenolisches Hydroxyl hin. In Übereinstimmung damit zeigt das mit Acetanhydrid in Pyridin bei 20° hergestellte Di-O-acetyl-diaporthin C₁₇H₁₈O₇ vom Smp. 66–67° keine Eisenchlorid-Reaktion. Über die Herkunft eines geringfügigen, bei der Acetylierung erhaltenen Nebenprodukts C₁₇H₁₈O₇ vom Smp. 136–137° ($[\alpha]_D = -2,0^\circ$) sind wir noch im Ungewissen.

Diaporthin wird in alkalischer Lösung von Luft bzw. Sauerstoff unter Erhaltung der optischen Aktivität fast quantitativ zu einer Monocarbonsäure C₁₃H₁₄O₆ vom Smp. 115–116° oxydiert, welche als kristallisierte Methylester (Smp. 99–99,5°) charakterisiert wurde.

Über weitere Umsetzungen mit Diaporthin werden wir demnächst berichten.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds* und der *F. Hoffmann-La Roche & Cie. AG.* in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil⁷⁾.

Züchtung von *Endothia parasitica*. Für die Produktion von Diaportin wurde der Stamm *Endothia parasitica* (Murr.) *And.* ETH M 156 auf der nach *Bazzigher*²⁾ modifizierten *Knopschen* Nährlösung folgender Zusammensetzung gezüchtet: Calciumnitrat 1 g, Magnesiumsulfat 0,25 g, Monokaliumphosphat 0,25 g, Kaliumchlorid 0,25 g, Ferrichlorid 0,25 g, *Difco* Hefeextrakt 5 g, Glucose 20 g, totalentsalztes Wasser 1000 cm³. Die Nährlösung wurde jeweils bei 1 Atü 20 Min. sterilisiert. Der Pilz wurde in Standkultur in 500-cm³-*Erlenmeyer*-Kolben mit je 100 cm³ Nährlösung bei 18° 20 Tage kultiviert. Die Aktivitätsbestimmung²⁾ der Kulturlösung erfolgte periodisch mit *Bacillus subtilis* im

⁶⁾ Wir danken den Herren Dr. *L. H. Chopard-dit-Jean* und Prof. Dr. *Hs. H. Günthard* für die Interpretation der IR.-Spektren.

⁷⁾ Alle Smp. sind korrigiert; die spez. Drehungen wurden in Chloroform bei c = 1 bestimmt.

Plattendiffusionstest, mit *Ustilago zae* im Sporenceimungstest und anhand von Rf-Wert und Fluoreszenz im Papierchromatogramm.

Nachweis von Diaporthin im Papierchromatogramm. 10 mm³ Kulturfiltrat wurden auf *Whatman*-Papier Nr. 1 im System *Bush*³) B₃ (670 cm³ Benzin Sdp. 70—80°, 330 cm³ Benzol, 800 cm³ Methanol, 200 cm³ Wasser) entwickelt. Das Papier wurde nach dem Trocknen mit 2-n. NaOH besprüht. Diaporthin erscheint bei Rf 0,3 unter der Hg-Lampe mit hellvioletter Fluoreszenz. Der Nachweis eignet sich auch für Essigester- oder Benzol-Extrakte aus Kulturfiltraten.

Durch Vergleich mit einer Standardlösung (1‰ Diaporthin in 5-proz. Alkohol und Verdünnungsreihen) kann im Papierchromatogramm der Diaporthingehalt von Kulturfiltraten auf Grund der Fluoreszenz im UV. von blossen Auge mit einer Genauigkeit von ca. ± 50% bestimmt werden.

Isolierung des Diaporthins. 50 l Kulturfiltrat vom pH ca. 4,5 wurden mit Kochsalz gesättigt und dreimal mit je 5 l Benzol ausgeschüttelt. Die leicht getrübbten, gelblichen benzolischen Lösungen waren nach Filtration durch Celite klar. Sie wurden im Wasserstrahlvakuum zur Trockene eingedampft. Der nichtflüchtige Rückstand (= Rohextrakt) wog je nach Ansatz 300—500 mg.

A. 5,0 g Rohextrakt wurden in 300 cm³ Äther gelöst, je dreimal mit gesättigter KHCO₃-Lösung und eiskalter 2-n. NaOH ausgeschüttelt. Der braun gefärbte KHCO₃-Auszug und die intensiv rote Lauge wurden sofort mit 2-n. Schwefelsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Wir erhielten 0,2 g KHCO₃-lösliche Anteile, *Dosis min.* 1200—2100 mg/kg; 1,8 g NaOH-lösliche Anteile, *Dosis min.* 650—750 mg/kg; 2,6 g Neutralteile, *Dosis min.* 1700—10000 mg/kg. Die NaOH-löslichen Anteile wurden zwischen Benzol und Phosphat-Puffer vom pH 11,0 (5 l 0,05-m. Na₂HPO₄ und 70 cm³ 0,1-n. NaOH) im Gegenstrom über 75 Stufen verteilt.

Fraktion	Gewicht mg	<i>Dosis min.</i> mg/kg	Eigenschaften
1—23	300	390	rote Lösungen, kein Diaporthin!
24—49	900	520—580	farblose Lösungen, starke Fluoreszenz, enthält Diaporthin
50—56 } 57—75 }	160	1300	farblos } gelb } kein Diaporthin

Aus den zusammengenommenen Fraktionen 24—49 (900 mg) wurden durch Umkristallisieren aus Äther-Hexan 440 mg Diaporthin vom Smp. 91,5—92,5° gewonnen. Diaporthin gibt in Methanol rote Eisenchlorid-Reaktion. [α]_D = +58°⁷); pK = 11,17 (in 80-proz. Methylcellosolve).

C₁₃H₁₄O₅ Ber. C 62,39 H 5,64 O 31,97 O—CH₃ 12,40 C—CH₃ 6,01%
 Gef. „ 62,13; 62,21 „ 5,69; 5,78 „ 31,99 „ 12,78 „ 5,75%
 „H“ kalt 0,70% (entspr. 1,8 „H“); heiss, 0,91% (entspr. 2,2 „H“).

B. 6,55 g Rohextrakt wurden durch Verteilungs-Chromatographie aufgetrennt. Stationäre Phase: untere, wässrige Schicht eines Gemisches von 3 l Benzin (Sdp. 70—80°), 1,5 l Benzol, 4,5 l Methanol, 1 l Wasser. 1,62 kg der stationären Phase wurden mit 1,8 kg Celite und 1,8 kg trockenem Silicagel gemischt. Das erhaltene feuchte Pulver wurde mit der oberen, Benzin-Benzol-Phase portionenweise in ein Chromatographierrohr von 10 cm Durchmesser eingeschlammmt und zu einer Säule von 110 cm Höhe gestopft. Der Rohextrakt wurde in 50 cm³ der Benzin-Benzol-Phase auf die Säule gebracht; mit derselben Phase wurde entwickelt bzw. eluiert. Es wurden 55 Fraktionen à 425 cm³ aufgefangen, die zusammen 6,363 g eluierten.

Fraktion	Gewicht g	Eigenschaften
5—10	2,674	flüssig
11—17	0,113	teilweise fest
18—24	0,097	fest
25—26	0,029	kristallin
27—36	0,538	flüssig
37—45	2,239	fest, starke Fluoreszenz im UV.: Diaporthin!
46—55	0,673	fest, kein Diaporthin

Die vereinigten Fraktionen 37—45 lieferten aus Äther-Hexan 924 mg leicht gelbliche Kristalle vom Smp. 89—90°, die nach Sublimation bei 80° im Hochvakuum völlig weiss waren, bei 91,5—92,5° schmolzen und mit nach *A.* isoliertem Diaporthin keine Smp.-Depression gaben.

$C_{13}H_{14}O_5$ Ber. C 62,39 H 5,64% Gef. C 62,35 H 5,94%

Aus den Mutterlaugen konnten noch 31 mg einer Verbindung von gleicher Bruttozusammensetzung wie Diaporthin gewonnen werden; nach Kristallisation aus Äther-Hexan und mehrmaligem Sublimieren Smp. 76—77°; $[\alpha]_D = +10,3^\circ$.

$C_{13}H_{14}O_5$ Ber. C 62,39 H 5,64% Gef. C 62,41 H 5,72%

Di-O-acetyl-diaporthin. 600 mg Diaporthin, 1 cm³ Pyridin und 1 cm³ Acetanhydrid wurden 15 Std. bei Zimmertemperatur gehalten, dann in Vakuum zur Trockene eingedampft, in 20 cm³ Äther aufgenommen, mit 2-n. HCl, gesättigter KHCO₃-Lösung und anschliessend mit wenig Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde der Äther weggedampft. Das unscharf von 65—85° schmelzende Produkt konnte durch fraktionierte Kristallisation aus Äther-Hexan in 2 Komponenten zerlegt werden: Diacetyl-diaporthin (528 mg), Smp. 66—67°, $[\alpha]_D = 14,5^\circ$; Nebenprodukt (25 mg), Smp. 136—137°, $[\alpha]_D = -2,0^\circ$. Beide Präparate gaben keine Eisenchlorid-Reaktion.

Diacetyl-diaporthin $C_{17}H_{18}O_7$ Ber. C 61,07 H 5,43% Gef. C 60,91 5,57%
Nebenprodukt $C_{17}H_{18}O_7$ Ber. C 61,07 H 5,43% Gef. C 60,95 5,56%

Diaporthinsäure. Durch die Lösung von 229 mg Diaporthin in 70 cm³ n. NaOH wurde während 6 Std. Luft geblasen. Nach dieser Zeit war die UV.-Fluoreszenz vollständig verschwunden. Die Lösung wurde mit 2-n. HCl angesäuert und mit 300 cm³ Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wurde neutral gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdampfen des Äthers blieb ein Öl zurück (226 mg), das aus Äther-Hexan teilweise kristallisierte. Die aus Äther-Hexan umkristallisierte Diaporthinsäure (48 mg) schmolz bei 115—116°. Braune Eisenchlorid-Reaktion. $[\alpha]_D = +6,5^\circ$; pK = 5,36; 5,54 (in 80-proz. Methylcellosolve).

$C_{13}H_{14}O_6$ Ber. C 58,64 H 5,30% Gef. C 58,90 H 5,41%

Diaporthinsäure-methylester. 170 mg Mutterlaugenprodukte von Diaporthinsäure wurden in 10 cm³ Äther mit Diazomethan verestert. Der aus Cyclohexan kristallisierte Ester (135 mg) schmolz bei 99—99,5°. Braune Eisenchlorid-Reaktion. $[\alpha]_D = +7,3^\circ$.

$C_{14}H_{16}O_6$ Ber. C 59,99 H 5,75% Gef. C 59,96 H 5,70%

Ein identisches Präparat wurde aus kristallisierter Diaporthinsäure und Diazomethan erhalten.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung *W. Manser*) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Aus der Kulturflüssigkeit von *Endothia parasitica* (Murr.) And. konnte erstmals in reiner Form ein neues Welketoxin, das Diaporthin isoliert werden. Diaporthin ist optisch aktiv, hat die Bruttoformel $C_{13}H_{14}O_5$, schmilzt bei $91,5-92,5^\circ$ und gibt nach Einwirkung von Alkali im UV. eine intensiv hellviolette Fluoreszenz, wodurch es noch in kleinsten Mengen ($0,01 \gamma$) nachgewiesen werden kann. Im Welketest an Tomatensprossen ist Diaporthin mit der *Dosis minima* von 220 mg/kg etwas weniger wirksam als Lycomarasmin und Fusarinsäure. Ein in geringer Menge isoliertes Nebenprodukt gleicher Bruttozusammensetzung $C_{13}H_{14}O_5$ und einige Derivate des Diaporthins werden beschrieben.

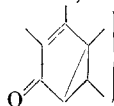
Institut für spezielle Botanik
und Organ.-chemisches Laboratorium
der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

Errata.

Helv. **40**, 265 (1957), Abhandlung Nr. 40 von P. Karrer & W. Hess, Textzeilen 15 und 17 von unten, lies: Essigester, anstatt: Eisessig.

Helv. **40**, 347 (1957), Abhandlung Nr. 41 von J. Druey & G. Huber, 3. Zeile, S. 348, 8. Zeile von unten und S. 349, 1. und 2. Zeile, lies: 1-Desoxy-1-dibenzylamino-D-tagatose, anstatt: 1-Desoxy-1-dibenzylamino-D-sorbose. — *Ibid.* S. 345, 7. Zeile, S. 347, 1. und 9. Zeile und S. 349, 1. und 24. Zeile, lies: 1-Desoxy-1-amino-D-tagatose, anstatt: 1-Desoxy-1-amino-D-sorbose. — *Ibid.* S. 345, Fussnote ²⁸) und S. 349, 6. Zeile von unten, lies: D-Tagatosamin, anstatt: D-Sorbosamin.

Helv. **40**, 497 (1957), Abhandlung Nr. 60 von H. Dutler, H. Bossard & O. Jeger, soll die Formel XII b wie folgt sein:



Ibid., 2. Zeile von unten, lies: 1,17 β -Diacetat XI, anstatt: 3,17 β -Diacetat XI.