

Synergistische und antagonistische Wirkungen von Phenolen und Phenolderivaten mit Indolessigsäure auf Wachstum und Differenzierung in vitro kultivierter Pflanzengewebe

Von

Waltraud Rücker*

Aus der Landwirtschaftlichen Forschungsabteilung,
Reaktorzentrum Seibersdorf

(Eingegangen am 15. Juni 1970)

Es wurde das Zusammenwirken von Indol-3-essigsäure mit Monophenolen, Polyphenolen und Phenolderivaten an in vitro kultiviertem Rhizomgewebe von Topinambur untersucht. Dabei konnten chemisch-strukturelle Wirkungsbeziehungen erkannt werden.

Monophenole wirken schwach stimulierend auf die Bildung von Wurzeln, Polyphenole fördern die Wurzelbildung stark, Methylendioxyzimtsäure (Blockierung beider phenolischer Hydroxylgruppen) hemmt die Wurzelbildung vollständig, regt jedoch im Gegensatz zu den untersuchten Mono- und Polyphenolen die Indol-3-essigsäure-Wirkung auf das Gewebewachstum an.

Synergistic and Antagonistic Action of Phenols with Indole Acetic Acid on Plant Tissue Cultivated in Vitro

The action of indole-3-acetic acid in combination with monophenols, polyphenols and phenol derivatives on rhizome tissue of Jerusalem artichoke cultivated in vitro was investigated, and structure-activity relationships established.

Monophenols exert a weak stimulatory effect on root formation while polyphenols promote vigorous root growth. Methylendioxy-cinnamic acid (where both phenolic hydroxy groups are masked) inhibits root formation completely but accentuates the effect of indole acetic acid on tissue growth in contrast to the mono- and polyphenols investigated.

Rhizomgewebe von Topinambur (*Helianthus tuberosus*, Varietät Violet de Rennes) ist ein gutes Material für Untersuchungen über Wachstum und Wurzeldifferenzierung, da sich dieses Gewebe bei in vitro-Kultur regelmäßig zur Neubildung von Geweben und Wurzeln anregen läßt. Die Voraussetzung dafür ist das Zusammenspiel mehrerer Umweltfaktoren. Für das Gewebewachstum sind es die Zusammensetzung der Mineral-

* Herrn Professor *E. Broda* zum 60. Geburtstag gewidmet.

stoffe und die Wuchsstoffkonzentration im Nährmedium sowie günstige Temperaturbedingungen; für die Wurzelbildung wurden zusätzlich bestimmte Zuckerkonzentrationen im Nährmedium und geeignete Lichtbedingungen als notwendig erkannt^{1, 2}.

Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, in dieses physiologische Geschehen einzugreifen und auf diese Weise der Aufklärung des Wachstums- und Differenzierungsprozesses näherzukommen³. Besonders kann der Wuchsstoffeffekt durch Zugabe organischer Substanzen modifiziert werden⁴. Zu diesen sind auch phenolische Substanzen, die in der Natur weit verbreitet sind, zu zählen. Ihr Einfluß auf die Wuchsstoffwirkung konnte vielfach sowohl physiologisch^{5, 6, 7, 8} als auch biochemisch^{9, 10, 11, 12} nachgewiesen werden.

Wir haben bereits früher gezeigt, daß Phenole auch bei Topinambur morphogenetische Veränderungen auszulösen vermögen¹³. Besonders nach Zugabe von Kaffeesäure zum Nährmedium konnte eine auffallende Wurzelstimulation beobachtet werden. Es schien uns interessant, bei Topinambur weitere phenolische Derivate zu prüfen und miteinander zu vergleichen, um eventuelle für die Wirkung verantwortliche chemisch-strukturelle Zusammenhänge aufzudecken.

Material und Methode

Die Rhizome von Topinambur wurden nach der Ernte bei 4° C gelagert. Nach einer Ruheperiode von zwei Monaten konnten wir sie in den ersten sechs Monaten des Jahres für Versuche verwenden. Es wurden dabei größere Organe ausgewählt, würfelförmige Fragmente unter aseptischen Bedingungen herausgeschnitten und in Kultur-Eprouvetten verpflanzt, die 20 ml sterile Nährlösung enthielten¹. Das Frischgewicht der Explantate schwankte zwischen 400 und 500 mg (Trockengewicht etwa 20%). Für die Nährböden wurde die Mineralsalzlösung nach *Knop* (verdünnt mit gleichem Volumen Wasser) herangezogen, der Spurenelemente¹⁴, ferner 5% Glucose und 0,8% Agar zugesetzt wurden.

¹ *R. J. Gautheret*, La culture des tissus végétaux, Masson & Cie., Paris (1959).

² *R. J. Gautheret*, Amer. J. Bot. **56**, 702 (1969).

³ *S. Narayanaswamy*, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. **257**, 508 (1963).

⁴ *J. P. Nitsch* und *C. Nitsch*, Bl. Soc. Bot. France **107**, 326 (1960).

⁵ *J. H. M. Henderson* und *J. P. Nitsch*, Nature **195**, 780 (1962).

⁶ *R. L. Wain* und *H. F. Taylor*, Nature **207**, 167 (1965).

⁷ *F. Constabel*, Ber. dtsch. bot. Ges. **77**, 1 (1964).

⁸ *C. E. Hess*, Plant Physiol. Meetings XIV (1965).

⁹ *R. S. Rabin* und *R. M. Klein*, Arch. Biochem. Biophys. **70**, 11 (1957).

¹⁰ *F. H. Witham* und *A. C. Gentile*, J. Exper. Bot. **12**, 188 (1961).

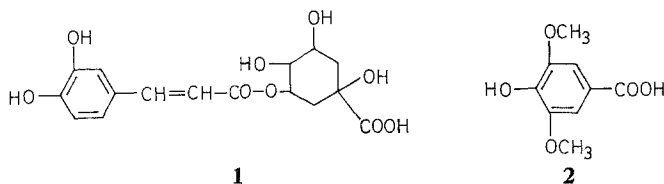
¹¹ *A. C. Leopold* und *T. H. Plummer*, Plant Physiol. **36**, 589 (1961).

¹² *S. A. Gordon* und *L. G. Pateg*, Plant Physiol. **36**, 838 (1961).

¹³ *W. Rucker* und *C. Paupardin*, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. **268**, 1279 (1969).

¹⁴ *A. Berthelot*, Bull. Soc. Chim. Biol. **16**, 1553 (1934).

Bei diesem Gewebematerial wird das Wachstum und die Wurzelbildung nur in Anwesenheit geeigneter Wachstumsstoffe angeregt^{1, 2}. In den vorliegenden Versuchen wurde Indol-3-essigsäure (*I*ES), ein nativer Wachstumsstoff, gewählt und in einer Konzentration von $5,5 \cdot 10^{-8}M$ verwendet. Der zusätzliche Einfluß folgender Phenole und Phenolderivate wurde in einem Konzentrationsbereich von $10^{-5}M$ bis $10^{-3}M$ untersucht: p-Kresol (Schuchardt, München), Tyrosin (Schuchardt), Syringasäure (**2**, Fluka, Basel), Brenzcatechin (Merck, Darmstadt), Pyrogallol (Merck), Protocatechusäure (Schuchardt), *DOPA* (Schuchardt), Chlorogensäure (**1**, Schuchardt), Kaffeesäure (Schuchardt), Methylendioxyzimtsäure (Schuchardt).



Während der sechswöchigen Versuchsdauer, während welcher Licht- und Dunkelperioden in 12stdg. Rhythmus abwechselten, wurden die Kulturen in Bruträumen bei 22—23° C gehalten.

Diese Zusammenstellung der Umweltbedingungen ist weder für die Wurzelbildung noch für das Wachstum optimal, so daß stimulierende Effekte leicht erfaßt werden können.

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden folgende Daten ermittelt: (1) der prozentuelle Anteil der Kulturen, die Wurzeln ausgebildet hatten, (2) die durchschnittliche Anzahl der Wurzeln je Kultur, (3) das Frischgewicht und (4) das Trockengewicht der Gewebestücke; Länge und Trockengewicht der Wurzeln indes nur bei deutlicher Wurzelstimulation.

In einer Versuchsreihe wurde die Wirkung jeweils mehrerer Substanzen geprüft, wobei für jede der untersuchten Konzentrationen 24 Parallelkulturen angesetzt wurden. Die Ergebnisse wurden in Wiederholungsexperimenten bestätigt. In der Tab. 1 sind die Werte (1), (2), (3), (4) aus jeweils einer Versuchsserie angeführt.

Ergebnisse

Von den drei untersuchten Monophenolen bewirkte p-Kresol nicht einmal in der höchsten Konzentration eine deutliche Erhöhung der Wurzelbildung; dennoch kann auch bei dieser Substanz eine wurzelstimulierende Aktivität nicht ganz ausgeschlossen werden. Bei Tyrosin und besonders bei Syringasäure war die Wirksamkeit in der höchsten Konzentration auf die Wurzelbildung etwas stärker.

Bei den untersuchten Polyphenolen trat eine viel stärkere wurzelstimulierende Wirkung auf. Bereits die einfachsten der untersuchten Vertreter dieser Gruppe, nämlich Brenzcatechin und Pyrogallol, zeigten deutlich die Fähigkeit zur Wurzelstimulation. Die Anwendung dieser Substanzen stieß insofern auf experimentelle Schwierigkeiten, als der Konzentrationsbereich zwischen stimulierender und toxischer Wirkung eng war; eine Erhöhung über die stimulierend wirkende Konzentration

Tabelle 1

Substanz	Konz., <i>M</i>	Wurzelbildung		Wachstum	
		% Expl. m. Wurzel	Anzahl Wurzel /Expl.	F. G. mg	T. G. mg
<i>IES</i> allein (Kontrolle)		20	0,21	1080	180
p-Kresol (4-Methylphenol)	10 ⁻⁵	15	0,10	1100	150
	10 ⁻⁴	18	0,10	1170	160
	10 ⁻³	27	0,30	1180	180
Tyrosin (4-Hydroxyphenylalanin)	10 ⁻⁵	16	0,16	920	150
	10 ⁻⁴	20	0,20	1050	160
	10 ⁻³	30	0,40	960	140
Syringasäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-benzoesäure) (2)	10 ⁻⁵	19	0,18	1020	140
	10 ⁻⁴	19	0,27	1030	150
	10 ⁻³	40	0,40	920	120
Brenzcatechin (1,2-Dihydroxybenzol)	10 ⁻⁵	—	—	—	—
	10 ⁻⁴	50	0,64	1010	180
	10 ⁻³	0	0	730	120
				(Nekrosen)	
Pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzol)	10 ⁻⁵	22	0,55	1120	160
	10 ⁻⁴	33	0,64	960	160
	10 ⁻³	30	0,50	910	180
				(Nekrosen)	
Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure)	10 ⁻⁵	38	0,66	1050	160
	10 ⁻⁴	43	0,57	1100	170
	10 ⁻³	60	1,00	960	140
DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin)	10 ⁻⁵	20	0,20	1010	180
	10 ⁻⁴	40	0,75	980	160
	10 ⁻³	0	0	0	0
				(Nekrosen)	
Chlorogensäure (3-[3,4-Dihydroxycinnamoyl]-chinasäure) (1)	10 ⁻⁵	30	0,60	1180	190
	10 ⁻⁴	45	0,55	1060	180
	10 ⁻³	50	1,46	1060	180
Kaffeensäure (3,4-Dihydroxymzimtsäure)	10 ⁻⁵	32	0,36	1000	180
	10 ⁻⁴	60	0,95	1080	190
	10 ⁻³	80	2,11	1010	180
3,4-Methylen-dioxyzimtsäure	10 ⁻⁵	5	0,04	1010	170
	10 ⁻⁴	0	0	1080	190
	10 ⁻⁵	0	0	1380	230

Die nach Ablauf der Versuchsdauer ermittelten Daten sind in den Spalten 3—6 angegeben. In der Spalte 3 (% Expl. m. Wurzel) ist der prozentuelle Anteil jener Kulturen, bei denen Wurzeln auftraten, in der Spalte 4 (Anzahl Wurzel/Expl.) ist die durchschnittliche Anzahl der gebildeten Wurzeln je Explantat angeführt. Die 5. und 6. Spalte zeigt die Werte für Frisch- und Trockengewicht der Gewebestücke.

Jeder der Werte wurde aus 20—24 Parallel-Kulturen gewonnen. In allen Fällen war die *IES* in der Konz. von $5,5 \cdot 10^{-8}$ zugegen. Die angeführten Kontrollwerte für die *IES* allein sind Mittelwerte.

($10^{-4}M$ auf $10^{-3}M$) löste Gewebenekrosen aus und hatte außerdem Wachstumsrückgang und Hemmung der Organdifferenzierung zur Folge.

Ähnlich ist der Unterschied beim Vergleich der beiden Benzoessäuren. Während Protocatechusäure bereits in der niedrigsten der verwendeten Konzentrationen deutlich stimulierend wirkte, war eine gegenüber *IES* erhöhte Stimulation der Wurzelbildung durch Syringasäure erst bei der höchsten Konzentration zu beobachten. Außerdem reichte das Ausmaß der Wirkung der Syringasäure nicht an jenes der Protocatechusäure heran.

Von allen untersuchten Substanzen zeigten die Polyphenole mit carboxylierter Seitenkette die höchste biologische Wirksamkeit; bereits bei der Konzentration $10^{-5}M$ war bei Chlorogensäure und bei Kaffeesäure ein physiologischer Einfluß deutlich feststellbar, der mit steigender Konzentration noch zunahm. Die starke wurzelstimulierende Wirkung der Chlorogensäure wurde von jener der Kaffeesäure in den höheren Konzentrationen $10^{-4}M$ und $10^{-3}M$ noch übertroffen. *DOPA* dagegen stimulierte die Wurzelbildung erst in der Konzentration $10^{-4}M$. Ähnlich wie bei Brenzcatechin und Pyrogallol traten jedoch auch bei dieser Verbindung in der höchsten Konzentration, $10^{-3}M$, nekrotische Effekte auf.

Eine mit *IES* synergistische Wirkung auf das Wachstum der Gewebe konnte bei keiner der bisher angeführten Substanzen beobachtet werden, und zwar auch nicht in den wurzelstimulierenden Konzentrationen. Konträr zu diesem Verhalten war die Wirkung der Methylendioxyzimtsäure, indem sie synergistisch mit der *IES*-Wirkung das Gewebewachstum und antagonistisch zu der *IES*-Wirkung die Wurzelbildung beeinflusste. Die Applikation von 10^{-3} Mol/l Methylendioxyzimtsäure steigerte das Wachstum; sowohl das Frisch- als auch das Trockengewicht waren im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. Wenn auch bei den Konzentrationen $10^{-5}M$ und $10^{-4}M$ noch keine Gewichtszunahme festgestellt werden konnte, so deutete eine Veränderung der Morphologie der neugebildeten Gewebe auf eine wachstumsstimulierende Wirkung hin. Der Einfluß dieser Substanz auf die Wurzelbildung führte bei $10^{-5}M$ zu einem starken Rückgang und im Konzentrationsbereich von $10^{-4}M$ und $10^{-3}M$ zu einer totalen Hemmung der Organdifferenzierung.

Es wäre noch die Beobachtung zu erwähnen, daß durch die meisten der wurzelstimulierenden Stoffe nicht nur die Induktion der Wurzelneubildung beeinflusst wurde, sondern auch die Morphologie der gebildeten Wurzeln. In der Regel nahm mit steigender Konzentration die Länge der Wurzeln zu.

Diskussion

Der Synergismus von *IES*- und Phenolwirkung konnte in verschiedenen biologischen Wachstums- und Differenzierungstesten nach-

gewiesen werden^{4, 5}. Bei Rhizomgewebe von Topinambur tritt dieser Synergismus vornehmlich als Stimulierung der Wurzelbildung in Erscheinung.

Beim Vergleich der chemischen Struktur der hier untersuchten Stoffe und ihrer wurzelstimulierenden Wirkung konnten folgende Beziehungen erkannt werden: 1. Substanzen mit einer phenolischen Hydroxylgruppe zeigen einen *IES*-Synergismus nur in sehr geringem Ausmaß. 2. Substanzen mit zwei phenolischen Hydroxylgruppen in Orthostellung fördern kräftig die Wurzelbildung. 3. Wenn in Polyphenolen die Hydroxylgruppen bis auf eine blockiert sind (Syringasäure), kommt es zu starker Verminderung des stimulierenden Effektes. 4. Bei Blockierung beider Hydroxylgruppen (Methylenedioxyzimtsäure) tritt nicht Stimulation, sondern Hemmung der Wurzelbildung ein.

Bei Topinambur sind für das Gewebewachstum im Gegensatz zur Wurzelbildung die Hydroxylgruppen nicht bedeutsam. Während alle untersuchten Mono- und Polyphenole das durch *IES* induzierte Gewebewachstum nur geringfügig beeinflussten, trat bei Zusatz von Methylenedioxyzimtsäure deutliche Verstärkung des Wachstums ein.

Die Monophenole p-Kresol und Tyrosin zeigten nur einen geringen *IES*-Synergismus. Bei Syringasäure tritt der Wurzelstimulationseffekt etwas deutlicher zutage. Diese höhere Wirksamkeit der Syringasäure gegenüber den anderen untersuchten Monophenolen könnte vielleicht durch Spaltung einer Methoxygruppe unter Ausbildung eines Diphenols bedingt sein.

Die unterschiedliche Wirkung von Mono- und Polyphenolen steht in Übereinstimmung mit verschiedenen biochemischen Untersuchungen^{15, 16, 17}. Man erkannte, daß in Gegenwart von Polyphenolen der enzymatische *IES*-Abbau verzögert wird, während in Anwesenheit von Monophenolen diese Hemmung des *IES*-Abbaus unterblieb. Diese Schutzwirkung durch Polyphenole führt zu einer Anreicherung der *IES* in den Zellen und damit zu einer Steigerung ihrer Wirkung.

Untersuchungen an Tabakgewebekulturen nach Behandlung mit verschiedenen phenolischen Substanzen weisen im Zusammenhang mit *IES* ebenfalls auf ein unterschiedliches Verhalten von Mono- und Polyphenolen hin¹⁸. Allerdings wirkten bei Tabakgewebe Monophenole stimulierend auf die Knospenbildung und Polyphenole hemmend. Für die Knospenbildung hat sich bei Tabakgewebe in erster Linie das Verhältnis der Konzentrationen von *IES* zu Kinetin im Medium als aus-

¹⁵ E. Sondheimer und D. H. Griffin, Science **131**, 672 (1960).

¹⁶ M. Tomaszewski, Régulateurs Naturels, Gif sur Yvette **1964**, 335.

¹⁷ M. Tomaszewski und K. V. Thimann, Plant Physiol. **41**, 1443 (1966).

¹⁸ T. T. Lee und F. Skoog, Physiol. Plant. **18**, 386 (1965).

schlaggebend erwiesen¹⁹ und nicht die *IES*-Konzentration; Knospenbildung wird dann ausgelöst, wenn das Verhältnis auf seiten des Kinetins liegt. Durch Behandlung mit Polyphenolen wird das Wuchsstoffverhältnis zugunsten der *IES* verschoben und die Knospenbildung gehemmt²⁰. In unseren Versuchen wurde die stärkste wurzelstimulierende Aktivität bei der Kaffeesäure gefunden, während die Tyrosinwirkung auf die Wurzelbildung vernachlässigbar gering war. Bei Tabakgewebe hingegen zeigte¹⁸ Tyrosin eine die Knospenbildung fördernde Aktivität, Kaffeesäure eine hemmende.

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß phenolische Substanzen die Wirkung der *IES* bei Topinambur verändern und daß zwischen ihrer biologischen Struktur und Art und Ausmaß ihrer biologischen Wirkung Zusammenhänge bestehen. Die biologische Wirkung phenolischer Stoffe auf Wachstum und Wurzelbildung muß bei Topinambur noch näher untersucht werden. In weiteren Versuchen soll vor allem geprüft werden, welche Wirksamkeit die Hydroxylgruppen in Meta- und Parastellung haben und welche Bedeutung der Carboxylgruppe zuzuordnen ist.

Für die Überlassung einiger Substanzen möchte ich Herrn Prof. Dr. *H. Kinzel*, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Wien, und der Firma Schuchardt in München danken. Frau Doz. Dr. *E. Primost*, Stickstoffwerke Linz, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Kultivierung des Pflanzenmaterials.

¹⁹ *F. Skoog* und *C. O. Miller*, Sympos. Soc. Exper. Biol. **11**, 118 (1957).

²⁰ *P. Paulet* und *J. P. Nüsch*, Soc. Bot. France **110**, 361 (1963).