

Acridonepoxidgehalte in Kalluskulturen von *Ruta graveolens* und ihre Steigerung durch Mischkultur mit Pilzen.*

Accumulation of Acridone-Epoxides in Callus Cultures of *Ruta graveolens* Increased by Coculture with Not Host-Specific Fungi

Bruno Wolters und Udo Eilert

Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität, Postfach 3329, D-3300 Braunschweig

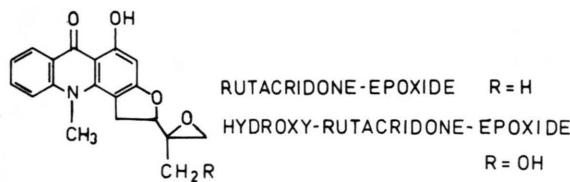
Z. Naturforsch. 37c, 575 – 583 (1982), received March 22, 1982

Acridone-Epoxide, Cell Culture, Coculture with Fungi, Phytoalexin, *Ruta graveolens*

The classic attempt to find optimum culture conditions lead to hormonautrophic cultures and to dark grown cultures. We made the new attempt to rise the yield of rutacridone-epoxides by coculture with not hostspecific fungi. Conditions were chosen that only diffusible elicitors could influence callus tissue. 14 days of coculture mostly caused reduced acridone-epoxide content, growthrate and up to total disappearance of chlorophyll. Within 3 – 7 days of coculture some fungi induced a significant rise of acridone-epoxide content (up to 50-fold). Culture filtrates of these fungi showed comparable effects. Our results proved the acridone-epoxides to be phytoalexins. The use of fungal elicitors could be a new method to increase secondary product accumulation in tissue culture.

Kalluskulturen von *Ruta graveolens* bilden eine Anzahl antimikrobieller Stoffe, zum überwiegenden Teil Cumarine und Alkaloide; die stärkste Wirkung haben bestimmte Acridonalkaloide [1, 2]. Die Acridonalkaloide sind in der Pflanze überwiegend in der Wurzel lokalisiert, in den oberirdischen Teilen konnte von Reisch *et al.* [1] nur Arborinin, von uns auch Rutacridonepoxid in geringer Konzentration nachgewiesen werden. Über das Auftreten von Acridonalkaloiden in Kalluskulturen wurde von Scharlemann [3], Kuzovkina [4] und Reisch [1] berichtet. Die von Johne u. Gröger [5] postulierten biogenetischen Zwischenstufen Rutacridonepoxid (**I**) und Hydroxy-Rutacridonepoxid (**II**) wurden erstmals von uns nachgewiesen [7, 6].

Ziel dieser Arbeit war, in Kalluskulturen die Ausbeute an diesen antibiotisch hoch wirksamen Acridonepoxiden zu steigern. Zu diesem Zweck wurde der Einfluß folgender Faktoren untersucht:



* Die Arbeit ist Teil der geplanten Dissertation von U. Eilert.

Sonderdruckanforderungen an Dr. B. Wolters.

0341-0382/82/0700-0575 \$ 01.30/0

1) Kulturbedingungen: Kulturdauer, Lichtintensität und Phytohormone wurden variiert.

2) Mischkultur mit Pilzen: Pilze sind in der Lage, Phytohormone schnell abzubauen; außerdem deuten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Lokalisation im Pflanzengewebe auf eine Funktion der Alkaloide als Infektionsschutz hin [8]. Haben die Acridonepoxide Phytoalexincharakter, dann müssen Elicitoren von Pilzen die Acridonepoxid-Akkumulation steigern. Soweit bekannt, ist dies der erste Versuch, die Sekundärstoffproduktion in Gewebekulturen durch Einfluß nicht wirtsspezifischer Mikroorganismen anzuregen.

Material und Methoden

Gewebekultur: Die Kalluskulturen (Stamm Würzburg; Reinhard 1967) wurden auf modifiziertem Eriksson-Medium mit 1 mg/l NAA und 0,02 mg/l Kinetin in Erlenmeyerkolben bei 25 °C und 5500 lx Weißlicht bzw. im Dunkeln gehalten.

Pilzkultur: Nährmedium war das Gewebekulturmedium.

Mischkultur: In Erlenmeyerkolben (100 ml) mit 25 ml Medium wurde je ein Kallusstück von 1 – 2 g Frischgewicht geimpft. Nach einer bestimmten Kulturdauer wurde 1 cm² frisch gewachsenes Pilzmyzel so zugeimpft, daß der Kallus nicht kontaminiert wurde. Nach der vorgesehenen Zeit der Mischkultur



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

ALKALOID-BESTIMMUNG

MIKROBIOLOGISCHE METHODE

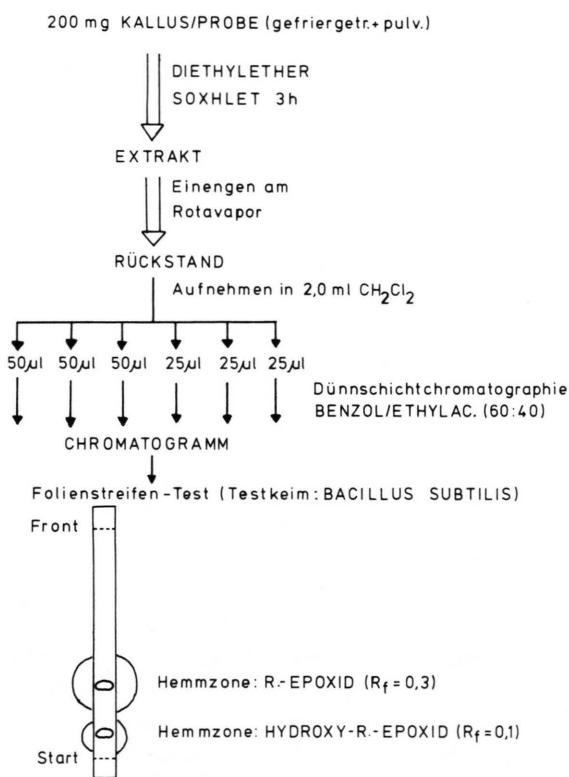


Abb. 1. Mikrobiologische Methode der Alkaloidbestimmung.

oder wenn Gefahr der Infektion des Kallus durch Pilzmycel bestand, wurde abgeerntet. Es wurden jeweils 4 Kolben pro Versuch eingesetzt und das Material vereinigt.

Bei dieser Methode waren stärkere Schwankungen der Wachstumsrate zu beobachten, da einzelne Kallusstücke immer wieder einmal vom allgemeinen Wuchsverhalten abweichen, für Screeningversuche war die Methodik jedoch ausreichend.

Kulturfiltrat: Auf flüssiges Nährmedium wurde der ausgewählte Pilz geimpft und 5 Tage bei 25 °C kultiviert. Dann wurde das Medium sterilfiltriert und 2,5 ml des Filtrats pro Kolben für den Versuch zugegeben.

Phytohormonabbau: Die eingesetzten Pilze wurden mittels Folienscheibentest [9] auf die Fähigkeit zum Phytohormonabbau untersucht.

Gehaltsbestimmung: Der Gehalt wurde mikrobiologisch mittels Folienstreifentest bestimmt [9] (Abb. 1).

Das Hydroxy-Rutacridonepoxid lag im DC mit zwei noch nicht identifizierten, ebenfalls antibiotisch aktiven Acridonalkaloiden (vermutlich Gravacridonchlorin und Isogravacridonchlorin) vor, war aber Hauptsubstanz. Andere Substanzen störten im DC nicht durch ihre Aktivität.

Der Gehalt wurde aus dem Hemmhofdurchmesser nach 36 Stunden Brüten der Bakterienplatten bei 37 °C mittels einer Eichkurve errechnet. Die Schwankungsbreite dieser mikrobiologischen Bestimmung war relativ hoch (± 1 mm Hemmhofdurchmesser) (Abb. 2 u. 3).

Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehalts: Photometrisch nach Scharlemann [3]. 100 mg

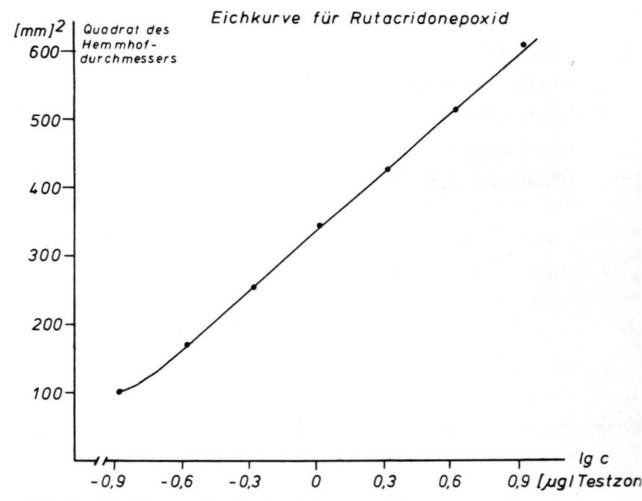


Abb. 2. Eichkurve für Rutacridonepoxid.

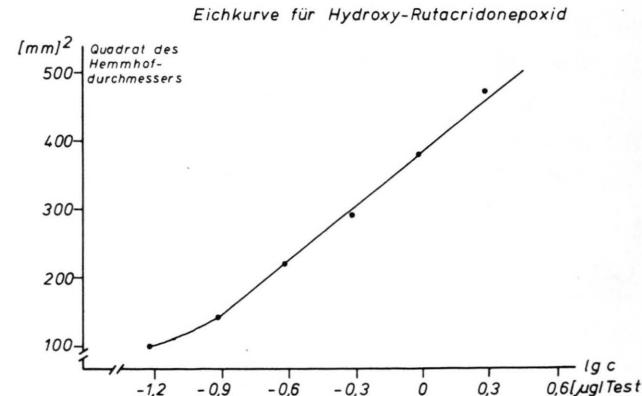


Abb. 3. Eichkurve für Hydroxy-rutacridonepoxid.

gefriergetrocknetes Material wurde mit 10 ml Aceton/H₂O (80:20) extrahiert und die Extinktion der Lösung bei 663, 645 und 453 nm gemessen.

Pilzsubstanzen: Gibberellic acid (min. 90% Gibberellin A₃) Diacetoxyscirpenol (von *Fusarium sambucinum*) und Zearalenone von SIGMA Chemical Comp.

Ergebnisse

1) Variation der Kulturbedingungen

Einfluß der Kulturdauer

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen die Ausbeuten in Abhängigkeit von der Zeit.

a) **Standardkultur:** Bei der Standardkultur war die Wachstumsphase nach etwa 5 Wochen abgeschlossen. In dieser Zeit erfolgte eine Zunahme des Frischgewichts um etwa 500% und die Alkaloidepoxidge-

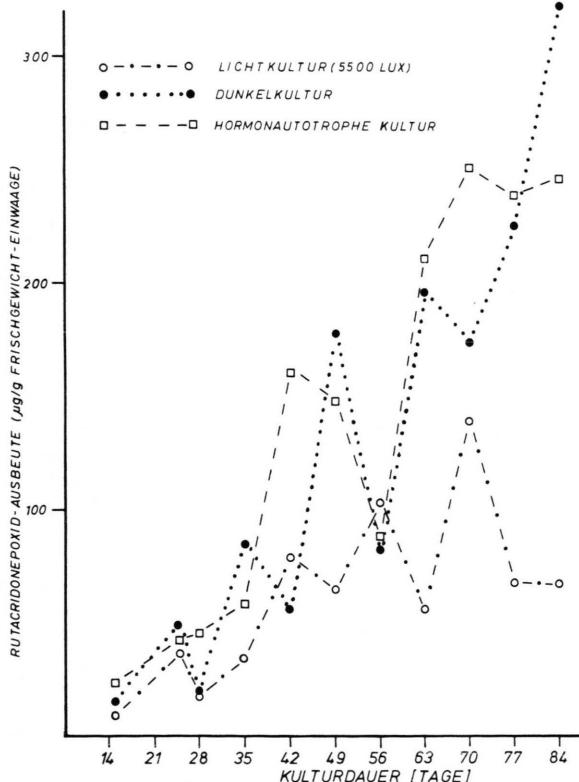


Abb. 4. Einfluß der Kulturdauer auf die Rutacridonepoxid-Ausbeute. Vgl. Text.

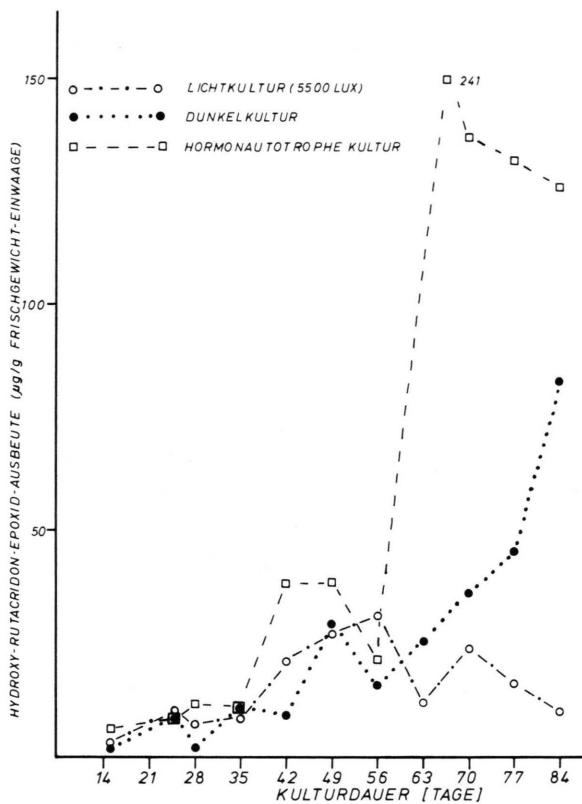


Abb. 5. Einfluß der Kulturdauer auf die Hydroxy-rutacridonepoxid-Ausbeute. Vgl. Text.

halte blieben niedrig. Ab der 6. Woche stieg der Alkaloidepoxidgehalt stark an auf etwa 200 – 300% der Ausgangswerte und schwankte in den folgenden Wochen um den erreichten Pegel.

b) **Dunkelkultur:** Die Wachstumsphase war erst nach etwa 8–9 Wochen abgeschlossen; das Wachstum ging wesentlich langsamer vor sich als bei der Lichtkultur. Es erfolgte hier eine Zunahme der Biomasse um 500 bis 600%. Der Alkaloidepoxidgehalt war etwa doppelt so hoch wie der Gehalt der Standardkultur in der Wachstumsphase und steigerte sich ab der 7. Woche, kurz vor Ende des Wachstums auf das Doppelte dieser Menge. Im folgenden kam es noch zu einem Anstieg des Gehalts.

c) **Hormonautotrophe Kultur:** Die Wachstumsphase war nach 7–8 Wochen beendet; die Zunahme der Biomasse blieb etwas geringer mit 450 bis 500%. Während der ersten 5 Wochen waren die Alkaloidgehalte konstant; die Rutacridonepoxidkonzentration entsprach der in Dunkelkulturen desselben Al-

ters. Die Konzentration des Hydroxy-Derivates war jedoch um 200 bis 300% erhöht. Ab der 6. Woche stiegen die Gehalte, dies setzte sich mit Schwankungen zur 9. bis 10. Woche fort. Der Gehalt betrug nun das 3 bis 4fache, dann begann er wieder zu sinken, wobei die Konzentration an Hydroxy-Rutacridonepoxid im Verhältnis sehr hoch blieb (Abb. 6).

Variation der Lichtintensität

Bei Kultur mit unterschiedlicher Lichtintensität ergaben sich Gehalte an RE von 320–1000 µg/g Trockengewicht (Auxin: 1 mg/l NAA) bzw. 280–520 µg/g (1 mg/l 2,4-D), für OH-RE 25–130 µg/g (NAA) bzw. 45–65 µg/g (2,4-D). Eine Korrelation zur Lichtintensität war nicht zu sichern. Dunkelkulturen (NAA) dagegen erzielten deutlich erhöhte Gehalte an RE (1450–3250 µg/g) und OH-RE (160–320 µg/g). Abkürzungen s. Tab. I.

Phytohormone

a) Einfluß verschiedener Auxine

Die Verwendung von IAA, 2,4-D oder NAA als Auxin hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Epoxidgehalte. So ergab sich bei 2250 lx ein OH-RE-Gehalt von 45 µg/g bei 2,4-D und NAA bzw. 60 µg/g bei IAA.

b) Unterschiedliche Hormonkonzentrationen (Tab. I)

Die Kulturen wurden von Normalmedium (1 mg/l NAA; 0,02 mg/l Kinetin) für den Versuch auf das hormonmodifizierte Medium geimpft. Die Alkaloidgehalte waren bei Kultur auf hormonarmen Medien gesteigert, die Wachstumsraten meist gering. Um ei-

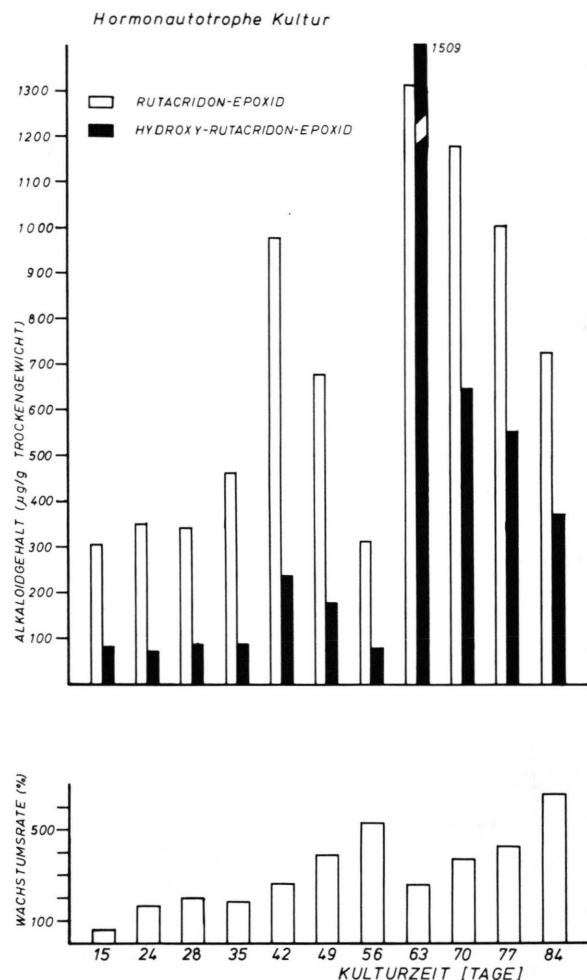


Abb. 6. Acridonepoxid-Gehalte in hormonautotroper Kultur. Vgl. Text.

Tab. I. Einfluß von Naphthylessigsäure (NAA) und Kinetin auf Epoxidgehalte von Ruta-Kallusgewebe. RE=Rutacridonepoxid; OH-RE=Hydroxy-rutacridonepoxid. + = Gehalte deutlich höher als im normalen Eriksson-Medium.

NAA [ppm]	Kinetin			
	0,1 ppm	0,02 ppm	0,005 ppm	0,001 ppm
3				
1		(Normal- medium)	RE +	RE +
0,2	RE +		RE + OH-RE +	RE +
0,05	RE +	RE + OH-RE +	RE + OH-RE +	RE +
0,01	RE +	RE + OH-RE +	RE + OH-RE +	RE +

nen „Schock“ durch die Medienänderung als Ursache auszuschalten, wurde versucht, hormonautrophe Kulturen zu erhalten. Nach Adaption zeigten sie gute Wachstumsraten und hohe Alkaloidproduktion.

2) Mischkultur mit Pilzen

a) *Vorversuche*: Ausgehend von der Vermutung, daß die Acridonepoxide als Phytoalexine fungieren, sollte versucht werden, durch Mischkultur mit Pilzen den Gehalt der Gewebekultur zu steigern. Erste Versuche ergaben, daß Mischkulturen mit sechs von zwölf eingesetzten Pilzen einen deutlich erhöhten Alkaloidgehalt gegenüber der Kontrollkultur aufwiesen (Abb. 7).

b) *Pilze und Phytohormone*: Durch Pilzeinfluß auf den Phytohormongehalt des Mediums könnte eine Steigerung der Alkaloidproduktion verursacht werden. Pilze sind in der Lage, teils Phytohormone abzubauen, teils zu synthetisieren [10]. Da geringe Hormonkonzentration und hoher Alkaloidgehalt korreliert sind, bestand die Möglichkeit, daß der Pilzeffekt auf einem Phytohormonabbau beruht. Es könnte so eine rasche Umsteuerung von optimalen Wachstumsbedingungen (hohe Phytohormongehalte im Medium) zu optimalen Produktionsbedingungen ohne Medienaustausch vorgenommen werden. Pilze wurden auf hohe Kinetin- und Auxin (IAA, NAA, 2,4-D)-Abbaufähigkeit selektiert [11] und in Mischkultur getestet (Tab. II).

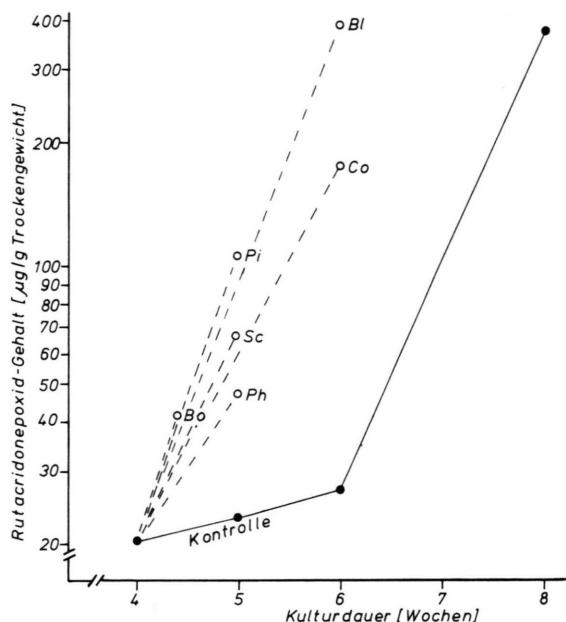


Abb. 7. Steigerung des Rutacridonepoxidgehaltes durch Mischkultur mit nicht wirtspezifischen Pilzen. Bl = *Blakeslea trispora*, Bo = *Botrytis allii*, Co = *Coniocephala cerebella*, Ph = *Phytophthora cactorum*, Pi = *Piricularia oryzae*, Sc = *Sclerotinia fructicola*.

Es zeigte sich deutlich, daß es bei Mischkulturen mit hormonabbauenden Pilzen zu unterschiedlichen Effekten auf den Alkaloidepoxidgehalt kam ohne eine Parallelie zur Hormonabbaufähigkeit. Einige Pilze hatten überhaupt keinen Einfluß, andere senkten

Tab. II Einfluß phytohormonabbauender Pilzstämme auf Kalluskulturen von *R. graveolens*. Kulturzeit: 28 Tage + 3 bis 7 Tage Mischkultur. + = Abbaufähigkeit vorhanden; - = Abbaufähigkeit sehr gering oder fehlend; Tr. = Trockengewicht.

Mischkultur	Abbaufähigkeit für		Rutacridonepoxid		OH-Rutacridon-epoxid		Wachstumsrate der Kalli
	Auxin	Kinetin	µg/g Tr.	relativ	µg/g Tr.	relativ	
Kontrolle 5500 lx, 35 Tage	NAA	Kinetin	263	1	35	1	6,3
<i>Polystictus versicolor</i>	+	-	295	1,1	48	1,4	6,6
<i>Rhodotorula rubra</i>	-	+	446	1,7	66	1,9	5,3
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	+	+	166	0,6	28	0,8	5,9
<i>Cochliobolus lunatus</i>	+	+	316	1,2	50	1,5	5,8
<i>Piricularia oryzae</i>	+	+	426	1,6	54	1,6	6,6
Kontrolle 2250 lx, 35 Tage	2,4-D	Kinetin	208	1	30	1	5,6
<i>Claviceps purpurea</i>	+	-	224	1,1	19	0,6	6,2
<i>Fusarium bulbigenum</i>	+	-	245	1,2	21	0,7	7,3
<i>Botrytis allii</i>	+	-	831	4,0	490	16,0	7,2
Kontrolle 2250 lx, 35 Tage	IAA	Kinetin	426	1	37	1	7,8
<i>Sclerotinia fructicola</i>	+	-	519	1,2	29	0,8	6,2
<i>Polystictus versicolor</i>	+	-	209	0,5	29	0,8	6,9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	980	2,3	96	2,6	6,8
<i>Cochliobolus lunatus</i>	+	+	1950	4,6	107	2,9	6,4

den Gehalt und manche steigerten ihn erheblich (bis auf das 16-fache). Bei Versuchen mit hormonautotrophen Kulturen blieb der Pilzeinfluß bestehen (Tab. II). Dies bestätigt, daß der Hormonabbau nicht der auslösende Faktor war.

c) *Pilzeinfluß auf den Chlorophyll- und Carotinoidgehalt und die Wachstumsraten*: Die Kulturen waren erst am Ende der Wachstumsphase und nur kurz (3–7 Tage) mit den Pilzen in Mischkultur gebracht worden. Erst 1–2 Tage nach dem Zuimpfen kam es zu sichtbarem Pilzwachstum. Eine Schädigung der Gewebekultur in diesem Zeitraum war weder optisch noch in den Wachstumsraten oder den Chlorophyll- und Carotinoidgehalten feststellbar. Um zu klären, inwieweit Schädigungen bei Mischkulturen auftraten, wurden zu 14 Tage alten Kulturen sich nur langsam ausbreitende Pilze zugeimpft und die Mischkultur über weitere 14 Tage gezogen.

Saccharomyces-Arten schädigten die Kulturen sowohl im Wachstum als auch in der Chlorophyllbildung, während *Rhodotorula rubra* auch über 14 Tage Mischkultur das Wachstum kaum beeinträchtigte und den Chlorophyllgehalt gar nicht. Die mycelbildenden Pilze schädigten das Wachstum nur wenig, auch Chlorophyll- und Carotinoidgehalt blieben meist unverändert, die Epoxidgehalte allerdings fielen meist ab (Tab. III).

Der Einfluß von Mycotoxinen wurde nur bei Fusarienarten im Vorversuch analysiert (Tab. IV).

Gibberellin und das Antiauxin Diacetoxyscirpenol [19] sowie Zearalenon (0,1 mg/ml) hatten innerhalb von 5 Tagen keinen wesentlichen Einfluß auf den Epoxidgehalt, während Mischkultur mit *Fusarium poae* (Trichothecenbildner) starke Steigerungen, mit *F. moniliforme* (Gibberellinbildner) geringe Steigerungen verursachten. *F. oxysporum* und *F. graminearum* (Zearalenonbildner) hatten keinen signifikanten Einfluß.

d) *Einfluß von Licht auf die Alkaloidproduktion bei Mischkultur*: Der Pilzeinfluß war nicht abhängig von der Beleuchtung. Ein signifikanter Einfluß der Beleuchtungsintensität auf den Alkaloidgehalt konnte nicht festgestellt werden. Auch Dunkelkulturen wurden von den Pilzen wie die Lichtkulturen beeinflußt. Wegen des höheren Ausgangspegels in diesen Kulturen waren die Steigerungsraten wie erwartet relativ geringer, die absolute Menge wurde jedoch beträchtlich erhöht (vgl. Tabelle VI).

e) *Beweis des Phytoalexincharakters der Acridonepoxide*: Nach Kuć [12] und Cruickshank [13] sollten folgende Punkte erfüllt sein: 1) unspezifische Wirkung: Das Wirkungsspektrum der Acridonepoxide ist dem Spektrum eines Breitbandantibiotikums vergleichbar [2]; 2) Biogenetische Vorstufen sind

Tab. III. Einfluß von Pilzen bei langfristiger Mischkultur mit Kalluskulturen von *R. graveolens*. Kulturzeit: 14 Tage + 14 Tage Mischkultur. RE=Rutacridonepoxid; OH-RE=Hydroxy-Rutacridonepoxid; Chl.=Chlorophyll; Tr.=Trockengewicht.

Auxin im Medium	Mischkultur	Wachstumsrate	RE µg/g Tr.	OH-RE µg/g Tr.	Chl. a µg/g Tr.	Chl. b µg/g Tr.	Carotin µg/g Tr.
NAA	Kontrolle 5500 lx, 28 Tage	4,5	240	22	215	92	101
NAA	Bäckerhefe	1,6	*	*	—	—	16
NAA	<i>Piricularia oryzae</i>	4,2	120	17	205	78	88
NAA	<i>Rhizoctonia solani</i>	3,1	117	24	245	93	99
NAA	<i>Saccharomyces carlsb.</i>	2,3	*	*	—	—	—
NAA	<i>Saccharomyces carlsb.</i>	1,9	269	49	30	18	30
NAA	<i>Rhodotorula rubra</i>	4,2	288	56	180	68	81
2,4-D	Kontrolle 2250 lx, 28 Tage	5,4	54	11	240	85	94
2,4-D	<i>Candida reukauffii</i>	2,4	105	12	114	54	40
2,4-D	<i>Fusarium lini</i>	3,2	*	*	240	87	81
2,4-D	<i>Claviceps purpurea</i>	5,4	120	36	264	105	107
IAA	Kontrolle 250 lx, 28 Tage	4,8	85	16	209	96	75
IAA	<i>Sclerotinia fructicola</i>	5,7	188	38	219	92	90
IAA	<i>Rhodotorula rubra</i>	2,3	1200	600	230	88	83
IAA	<i>Polystictus versicolor</i>	6,5	62	12	169	72	71

* nicht untersucht

Tab. IV. Einfluß von Fusarienarten und einiger ihrer Stoffwechselprodukte auf Kalluskulturen von *R. graveolens*. Kulturzeit: 28 Tage + 5 Tage Mischkultur; Dunkel = Dunkelkultur; 5500 lx = Kultur bei der Lichtstärke; Auxin: NAA.

Mischkultur mit	Wachstumsrate relativ zur Kontrolle	RE relativ zur Kontrolle	OH-RE relativ zur Kontrolle
Zearalenone Dunkel	1	0,9	1,1
Diacetoxyscirpenol 5500 lx	0,8	1,1	1,0
Diacetoxyscirpenol Dunkel	0,7	1,0	1,4
Gibberellin 5500 lx	1,0	0,9	0,9
<i>Fusarium poae</i> 5500 lx	1,1	2,3	1,9
<i>Fusarium poae</i> Dunkel	0,7	1,1	1,3
<i>Fusarium moniliforme</i> 5500 lx	1,1	1,1	1,1
<i>Fusarium moniliforme</i> Dunkel	0,9	0,8	1,3
<i>Fusarium graminearum</i> 5500 lx	1,0	0,7	0,7
<i>Fusarium graminearum</i> Dunkel	0,7	0,8	0,8
<i>Fusarium oxysporum</i> 5500 lx	0,9	1,4	1,1
<i>Fusarium oxysporum</i> Dunkel	0,9	0,7	0,9
<i>Fusarium bulbigenum</i> Dunkel	0,9	1,1	1,7

schwach wirksam oder unwirksam: Die unmittelbare Vorstufe Rutacridon aber auch Furacridon (biogenetisches Endprodukt) zeigten bis 15 µg im Folienscheibentest keine Hemmwirkung gegen Bakterien und Pilze (Eilert unveröffentl.). 3) Hemmung des auslösenden Mikroorganismus durch die erreichte Konzentration: Die Tabelle V zeigt, daß die Bedingung meistens erfüllt ist. 4) Steigerung der Konzentration in kurzer Zeit: Die Bedingung ist nach den Tabellen II u. VI erfüllt. Die Zeit von 3 – 7 Tagen zur Steigerung des Gehalts ist für viele andere Phytoalexine beobachtet worden [10]. 5) Abhängigkeit der Steigerungsraten von der Höhe des Ausgangsspiegels: Die Tabelle VI belegt, daß auch diese Bedin-

gung erfüllt ist. 6) Auslösung durch Elicitoren [14]: Die Pilze können bei der angewandten Kulturtechnik den Kallus nur durch diffusible Stoffe beeinflussen. Wenn es sich um diffusible Elicitor-Substanzen handelt, müssen zellfreie Kulturfiltrate der Pilze die gleichen Effekte zeigen. Es wurden die drei Pilze mit den besten Steigerungsraten (*Botrytis allii*, *Rhodotorula rubra*, *Cochliobolus lunatus*) eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Kulturfiltrate die Gewebekultur genau so zur Alkaloidakkumulation anregen wie die Pilze. Damit sind alle geforderten Eigenschaften erbracht und wir sehen den Phytoalexincharakter für die Acridonepoxide als bewiesen an (Tab. VI).

Tab. V. Mittlerer Acridonepoxidgehalt im Kallusgewebe und Vergleich zur minimalen Hemmkonzentration für Pilze. () = partielle Hemmung; ± = bis 10 µg keine Hemmung; * = nicht getestet.

Pilz	Rutacridonepoxid- gehalt im Kallus [µg/ml]		Hemmung des Pilzes ab [µg/ml]	OH-Rutacridonepoxid- gehalt im Kallus [µg/ml]		Hemmung des Pilzes ab [µg/ml]
	Kontrolle	Mischkultur		Kontrolle	Mischkultur	
<i>Sclerotinia fructicola</i>	19	23	1	1,7	1,7	1
<i>Polystictus versicolor</i>	12	13	0,5	1,7	2,2	5
<i>Rhodotorula rubra</i>	12	20	(5)	1,7	3,0	*
<i>Cochliobolus lunatus</i>	12	14	*	1,7	2,3	5
<i>Piricularia oryzae</i>	12	19	±	1,7	2,4	10
<i>Fusarium bulbigenum</i>	9	11	10	1,4	0,9	10
<i>Botrytis allii</i>	9	37	5	1,4	22	5

Tab. VI. Einfluß von Pilzen und ihrer Kulturfiltrate auf den Acridonepoxidgehalt in Kalluskulturen von *R. graveolens*. Tr. = Trockengewicht; Auxin: NAA. Versuchsdauer 3 Tage.

Kultur mit	Rutacridonepoxid		OH-Rutacridonepoxid	
	µg/g Tr.	relative Steigerung	µg/g Tr.	relative Steigerung
Dunkelkultur Kontrolle	1500	1	157	1
<i>Rhodotorula rubra</i> (Pilz)	2400	1,6	2600	16,0
<i>Rhodotorula rubra</i> (Filtrat)	1780	1,2	447	2,8
<i>Botrytis allii</i> (Pilz)	2050	1,4	285	1,8
<i>Botrytis allii</i> (Filtrat)	3000	2,0	2700	17,0
<i>Cochliobolus lunatus</i> (Pilz)	1760	1,2	223	1,4
<i>Cochliobolus lunatus</i> (Filtrat)	1740	1,2	378	2,4
Kontrolle Kultur bei 5500 lx	48	1	6	1
<i>Rhodotorula rubra</i> (Pilz)	258	5,3	187	30,0
<i>Rhodotorula rubra</i> (Filtrat)	68	1,4	12	2
<i>Botrytis allii</i> (Pilz)	83	1,7	60	10,0
<i>Botrytis allii</i> (Filtrat)	488	10,0	322	54
<i>Cochliobolus lunatus</i> (Pilz)	44	0,9	12	2,0
<i>Cochliobolus lunatus</i> (Filtrat)	50	1,0	12	2,0
Hormonautrophe Kultur Kontrolle	198	1	24	1
<i>Rhodotorula rubra</i> (Pilz)	877	4,4	270	11
<i>Rhodotorula rubra</i> (Filtrat)	422	2,1	64	2,7
<i>Botrytis allii</i> (Pilz)	531	2,7	98	4,0
<i>Botrytis allii</i> (Filtrat)	930	4,7	440	18

Diskussion

Die Suche nach optimalen Kulturbedingungen ist die klassische Methode zur Steigerung der Sekundärstoffausbeute. Während der Kultur tritt kein Gehaltsmaximum auf, wie vielfach bei anderen Biosynthesezwischenprodukten beobachtet wird. Variation der Hormone führte zwar zu gesteigerten Gehalten, die aber mit verringertem Wachstum der Kulturen verknüpft waren; die Ausbeute wurde nicht wesentlich verbessert. Erst die adaptierten hormonautrophen Kulturen wiesen deutlich gesteigerte Ausbeuten auf. Der Übergang von Licht- auf Dunkelkulturen brachte nach etwa einjähriger Adaptionszeit eine deutliche Steigerung der Ausbeute. Entsprechend der Verteilung in der intakten Pflanze wiesen die Dunkelkulturen stark erhöhte Acridonepoxidmengen auf. Das Wachstum der Kulturen ist etwas verzögert. Die Möglichkeiten der Produktionssteigerung durch Variation der Kulturbedingungen hatten somit nur bis zu einem gewissen Grade Erfolg.

Der zweite Ansatzpunkt war der Einfluß von Mischkultur mit nicht wirtsspezifischen Pilzen. Der Gehalt konnte auch bei optimierten Kulturen noch beträchtlich und in kurzer Zeit gesteigert werden. Wir führen die Steigerung der Alkaloidproduktion auf diffusible Elicitoren zurück und konnten zu-

gleich den Phytoalexincharakter der Acridonepoxide nachweisen.

Es bietet sich an, die Biosynthese anderer Sekundärstoffe in Gewebekultur durch Elicitoren anzuregen. Andere Phytoalexine gehören zu den Stoffgruppen der Isoflavone (z. B. Pisatin, Glyceollin, Pterocarpane), Sesquiterpene (z. B. Rishitin, Ipomeamaron, Acetylenderivate (Wyerone u. a.), Phenanthrene (Orchinol u. a.), Stilbene, Isocumarine und Cumarine (z. B. Scopoletin und Xanthotoxin, beide auch in *R. graveolens* vorkommend).

Einige Arbeiten zum Einfluß wirtsspezifischer Pilze bzw. Elicitoren sind bereits an Gewebekulturen durchgeführt worden. So berichten Ersek *et al.* [15] über die Produktion von Phytoherin und Rishitin in Kalluskulturen von *Solanum tuberosum* nach Behandlung mit zellfreiem Myzelhomogenat des Kartoffelparasiten *Phytophthora infestans*. Dixon [16] löst mit Kulturfiltraten von *Botrytis cinerea* die Phasellinsynthese in *Phaseolus vulgaris* aus. Er konnte einen diffusiblen Elicitor nachweisen. Kulturfiltrate von *Botrytis allii* hatten in unseren Versuchen starke Acridonepoxidakkumulation in *R. graveolens* zur Folge. Wir postulieren auch deshalb einen diffusiblen Elicitor als Ursache. Zähringer *et al.* [17] untersuchten die Induktion der Phytoalexinsynthese (Pterocarpan und Glyceollin) in Sojabohnen-Suspen-

sionskulturen. Als Elicitor wenden sie ein Glucan aus der Zellwand von *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, einem spezifischen Sojaparasiten, an. Hahlbrock *et al.* [18] wenden den gleichen Elicitor nicht nur auf Sojakulturen an sondern auch auf Suspensionskulturen von *Petroselinum*, die im Gegensatz zu *Glycine* kein natürlicher Wirt für *Phytophthora* ist. Hahlbrock *et al.* finden bei den Kulturen eine

Induktion der Phenylalanin-ammoniumlyase und der 4-Cumarat-CoA-ligase. Wenn es möglich ist, die Aktivität von Enzymen des Sekundärstoffwechsels anzuregen, ist zu hoffen, daß nicht nur bestimmte Phytoalexine sondern auch andere sekundäre Pflanzenstoffe, die denselben Biosyntheseweg haben, auf Elicitorinduktion in Gewebekulturen vermehrt gebildet werden.

- [1] J. Reisch, Die Darstellung biologisch aktiver Acridon-derivate unter Berücksichtigung natürlicher Vorbilder. Westdeutscher Verlag, Opladen 1978.
- [2] B. Wolters und U. Eilert, *Planta med.* **43**, 166 (1981).
- [3] W. Scharlemann, Dissertation Würzburg 1972.
- [4] J. N. Kuzovkina, K. Szendrei, Z. Rosza und J. Reisch, *Rastit. Resur.* **16** (1), 112 (1980).
- [5] S. Johne und D. Gröger, *Pharmazie* **27**, 195 (1972).
- [6] A. Nahrstedt, U. Eilert, B. Wolters und V. Wray, *Z. Naturforsch.* **36c**, 200 (1981).
- [7] U. Eilert, B. Wolters, A. Nahrstedt und V. Wray, *Z. Naturforsch.* **37c**, 132 (1982).
- [8] G. Verzar-Petri, K. Csödö, H. Möllmann, K. Szendrei und J. Reisch, *Planta med.* **29**, 370 (1976).
- [9] B. Wolters, *Planta med.* **17**, 42 (1969).
- [10] B. Wolters und U. Eilert, *Publ. in Vorbereitung*.
- [11] U. Eilert, Dissertation in Vorbereitung.
- [12] J. Kuć, *Ann Rev. Phytopath.* **10**, 207 (1972).
- [13] J. A. M. Cruickshank, in (J. G. Horsfall und E. B. Cowling ed.) *Plant Disease, an Advanced Treatise* – **Vol. V** Academic press, Inc. New York 1980.
- [14] Ch. A. West, *Naturwissenschaften* **68** (9), 447 (1981).
- [15] T. Ersek und J. Sziráki, *Phytopath. Z.* **97**, 364 (1980).
- [16] R. A. Dixon, in D. S. Ingram und J. P. Helgeson, *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists* (Conf.) 1979, Oxford 1980.
- [17] U. Zähringer, E. Schaller und H. Grisebach, *Z. Naturforsch* **36c**, 234 (1981).
- [18] K. Hahlbrock, Ch. J. Lamb, C. Purwin, J. Ebel, E. Fautz und E. Schäfer, *Plant Physiol.* **67**, 768 (1981).
- [19] G. A. Strobel, *Ann. Rev. of Plant Physiol.* **25**, 541 (1974).