

## Produktion pflanzlicher C<sub>6</sub>-Wundgase und ihre Wirkung auf einige phytopathogene Pilze

Production of C<sub>6</sub>-Wound Gases by Plants and the Effect on Some Phytopathogenic Fungi

Irene Urbasch

Institut für Angewandte Botanik, Lehrstuhl für Pharmakognosie der Universität Hamburg, Bundesstraße 43, D-2000 Hamburg 13

Z. Naturforsch. **39c**, 1003–1007 (1984); received April 12/June 1, 1984

Wound Gas, Antifungal Property, Phytopathogenic Fungi

The production of C<sub>6</sub>-wound gases by cultivated and wild tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill., *L. hirsutum* Humb. et Bonpl., *L. peruvianum* (L.) Mill., *L. pimpinellifolium* Mill., *L. glandulosum* C. H. Muller) and the tree tomato (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.) was investigated. The genuine mixture of compounds and the single compounds showed antifungal properties against the phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea* Pers., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, *Didymella lycopersici* Kleb. and *Cladosporium fulvum* Cooke.

Auf Verwundung reagieren Pflanzen mit zahlreichen metabolischen Veränderungen: z.B. nimmt die Atmungsintensität zu (Wundatmung), die Pro-

teinsynthese wird aktiviert, phenolische Komponenten werden vermehrt gebildet und flüchtige Stoffe freigesetzt. Diese liegen zum Teil bereits fertig synthetisiert vor, wie die meisten ätherischen Öle, die bei Verletzung des Pflanzengewebes nur aus den dabei zerstörten Exkretbehältern verdampfen.

Andere flüchtige Substanzen hingegen werden nach mechanischer Verletzung von Pflanzengewebe, zum Teil auf unterschiedlichen Biosynthesewegen, erst neu gebildet [1–7] und anschließend an die Umgebung abgegeben ("Wundgase"). Dazu gehören auch die C<sub>6</sub>-Wundgase, die bei Verwundung von Pflanzenzellen aus Linolsäure bzw. Linolensäure entstehen (Abb. 1). Diese mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden aus Lipiden der Membranen freigesetzt und durch Katalyse von Enzymen, die bei Zellzerstörung dekompartimentiert werden, oxidativ gespalten. Dabei werden die flüchtigen Verbindungen *n*-Hexanal und *n*-Hexanol bzw. *cis*-3-Hexenal, *cis*-3-Hexenol, *trans*-2-Hexenal und *trans*-2-Hexenol gebildet [3, 8].

Pflanzen können, z.B. durch Insektenfraß, Pilzbefall, Kultur- und Erntemaßnahmen oder durch Sturm und heftige Regengüsse verwundet werden.

Über die Funktion der dabei entstehenden Wundgase, insbesondere im Zusammenhang mit Pflanzen-

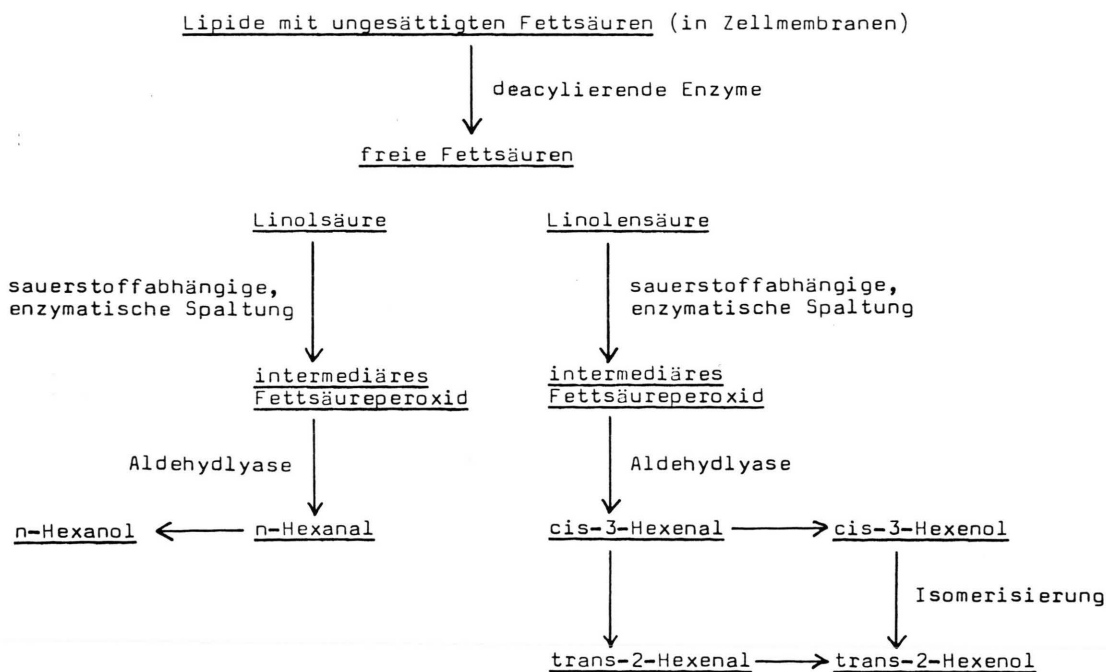


Abb. 1. Schema zur Biosynthese der C<sub>6</sub>-Wundgase.



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 digitalized 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.

krankheiten, die durch Pilze verursacht werden, ist noch recht wenig bekannt [9–11]. Da gerade Wunden von vielen Krankheitserregern als bevorzugte Eintrittswege in die Wirtspflanze benutzt werden, würde eine Schutz- und Abwehrfunktion der Wundgase gegen angreifende Pathogene einen wesentlichen Überlebensvorteil für die Pflanze bieten.

In den vorliegenden Untersuchungen soll über die Produktion pflanzlicher C<sub>6</sub>-Wundgase durch verschiedene Kultur- und Wildtomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* Mill., *L. hirsutum* Humb. et Bonpl., *L. peruvianum* (L.) Mill., *L. pimpinellifolium* Mill., *L. glandulosum* C. H. Muller) und Baumtomaten (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.) berichtet werden und die Wirkung dieser Wundgase auf einige an den betreffenden Pflanzen vorkommende Pilze dargestellt werden.

Zur Gewinnung der Wundgase wurden die Versuchspflanzen – differenziert in Blattspreiten, Blattstiele und Sproßabschnitte – in ca. 1 cm<sup>2</sup> große bzw. 1 cm lange Stücke zerschnitten und einer Kreislauf-Wasserdampfdestillation [12] unterworfen.

Die Identifizierung der einzelnen Wundgaskomponenten erfolgte gaschromatographisch (Glas-kapillarsäule, Länge 22 m, WG 11 und gepackte V<sub>2</sub>A-Stahlsäule, Länge 4 m, 3% SE 30) sowie massenspektrometrisch mittels GC-MS-Kopplung (Hitachi Perkin-Elmer RMU-60 Mass Spectrometer, direkte

Kopplung, Ionisierungsenergie 70 eV, 180 °C, Glas-kapillarsäule, Länge 25 m, WG 11).

Die Wundgasanalysen ergaben folgendes:

Frische, unzerkleinerte Gesamtpflanzen wiesen keine flüchtigen C<sub>6</sub>-Verbindungen auf. Direkt nach Zerkleinerung produzierten alle Pflanzenteile der verschiedenen Versuchspflanzen *trans*-2-Hexenal als Hauptkomponente, in geringeren Mengen außerdem *n*-Hexenal und *cis*-3-Hexenol, während *n*-Hexenol und *trans*-2-Hexenol nicht oder nur in Spuren auftraten (Tab. I).

Um zu prüfen, wie sich die Gesamtkonzentration und der Anteil der einzelnen Wundgaskomponenten vom Zeitpunkt der Wundreizung an verändern, wurde das zerkleinerte Pflanzenmaterial für unterschiedliche Zeitdauer (5, 10, 15, 30, 60 min, 19, 20 Std.) im verschlossenen Destillationskolben stehengelassen und anschließend analysiert. Diese Untersuchungen zeigten: nach einer anfänglichen lag-Phase von 5 min stieg die Wundgasproduktion rasch an (Maximum nach 10 min) und fiel in der Folgezeit kontinuierlich bis auf Spuren ab (nach 19–20 Std.). Die Konzentration der Alkohole nahm dabei infolge Reduktion bzw. Isomerisierung aus den korrespondierenden Aldehyden zu, die Konzentration der Aldehyde entsprechend ab (Abb. 2).

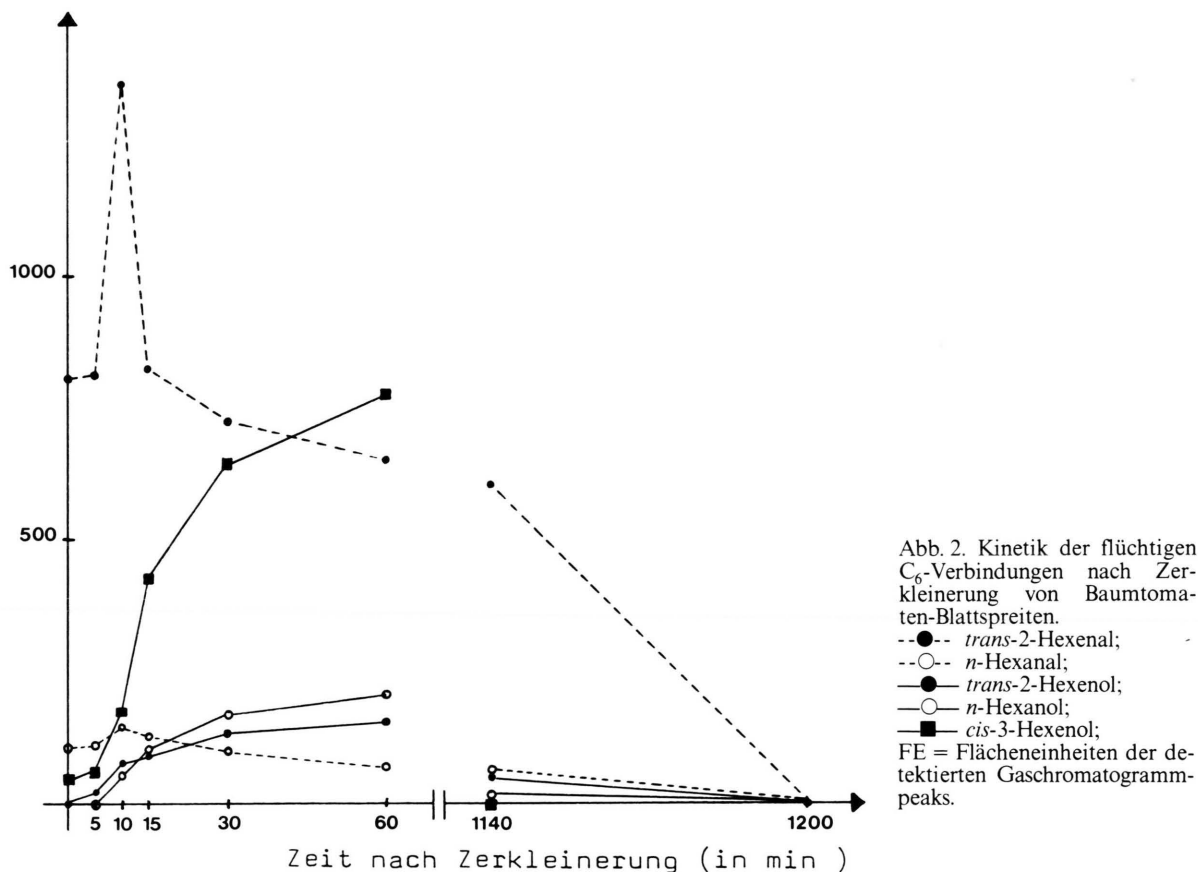
Vergleichbare Pflanzenteile (Blattspreiten, Blattstiele, Sproßachsen) der verschiedenen Pflanzen

Tab. I. Bildung von C<sub>6</sub>-Wundgasen durch Blattspreiten von Kultur-, Wild- und Baumtomaten (12 Wochen alte Gewächshauspflanzen) nach Zerkleinerung und sofortiger Analyse (siehe Text).

Testpflanze	Gehalt an C <sub>6</sub> -Wundgaskomponenten (in rel. Fe <sup>a</sup> /g Blattspreiten-Frischgewicht)				
	<i>trans</i> -2-Hexenal	<i>n</i> -Hexenal	<i>cis</i> -3-Hexenol	<i>n</i> -Hexenol	<i>trans</i> -2-Hexenol
Kulturtomaten:					
<i>Lycopersicon esculentum</i> cv.					
Rheinlands Ruhm	1611 (± 20)	234 (± 6)	93 (± 3)	0	0
Vetomold	1386 (± 18)	148 (± 3)	87 (± 2)	0	0
Leafmould	1328 (± 15)	140 (± 5)	81 (± 3)	0	0
V 121	1129 (± 16)	118 (± 3)	72 (± 1)	0	0
Hellfrucht	994 (± 19)	110 (± 4)	78 (± 2)	0	0
Moneymaker	876 (± 17)	93 (± 2)	76 (± 2)	0	0
R 59	876 (± 15)	90 (± 1)	71 (± 1)	0	0
V 473	784 (± 13)	93 (± 1)	70 (± 2)	0	0
Wildtomaten:					
<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	2371 (± 21)	110 (± 3)	103 (± 5)	0	0
<i>Lycopersicon hirsutum</i>	1888 (± 19)	121 (± 2)	94 (± 4)	0	0
<i>Lycopersicon glandulosum</i>	879 (± 16)	138 (± 4)	75 (± 2)	0	0
<i>Lycopersicon peruvianum</i>	777 (± 11)	201 (± 5)	67 (± 2)	0	0
Baumtomate:					
<i>Cyphomandra betacea</i>	805 (± 16)	102 (± 4)	49 (± 1)	0	0

<sup>a</sup> Fe = Flächeneinheiten der detektierten Gaschromatogramm-peaks.

Gehalt an C<sub>6</sub>-Wundgaskomponenten  
(in rel.FE/g Blattspreiten-Frischgewicht)



produzierten nahezu gleiche absolute Mengen an C<sub>6</sub>-Wundgasen. Dabei wiesen stets die Blattspreiten die höchsten Konzentrationen mit dem größten Anteil ungesättigter Verbindungen auf.

Die Wirkung der identifizierten C<sub>6</sub>-Wundgase wurde an folgenden Testpilzen untersucht:

*Botrytis cinerea* Pers. (4 Isolate), *Rhizoctonia solani* Kühn (2 Isolate), *Fusarium oxysporum*, f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen (2 Isolate), *Didymella lycopersici* Klebahn (1 Isolat) und *Cladosporium fulvum* Cooke (3 Isolate).

Nachdem in Vorversuchen festgestellt worden war, daß flüchtige Substanzen aus zerkleinerten Pflanzen wesentlich stärker antimykotisch wirkten als aus unverletzten und daß der Zerkleinerungsgrad direkt mit der pilzhemmenden Aktivität korrelierte, wurden Agarplatten-Pilzkulturen sofort nach

Beimpfung mit Myzelstücken (Ø 0,5 cm) oder Sporen (Dichte 50/mm<sup>2</sup>) den Dämpfen der einzelnen Wundgaskomponenten ausgesetzt. Dazu wurden die flüchtigen, bei Zimmertemperatur flüssigen Verbindungen als Reinsubstanzen (nach vorheriger gaschromatographischer Überprüfung) mit einer Mikroliterspritze auf Rundfilter in den Petrischalendeckeln appliziert [11], die Schalen einzeln versiegelt, um das Abdampfen der Substanzen zu verhindern, und bei 22 °C im Dauerdunkeln kultiviert. Der durch die Versiegelung begrenzte Sauerstoffvorrat in den Schalen beeinflusste in der Versuchszeit (5 Tage) nicht die Sporenkeimung und das Myzelwachstum der Pilze, wie Kontrollversuche zeigten.

Von den getesteten Wundgaskomponenten besaß *trans*-2-Hexenal bei weitem die höchste antimyko-

Tab. II. Minimale Hemmstoffkonzentrationen (MHK) für das lineare Oberflächenmyzelwachstum der Pilze *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Didymella lycopersici* und *Cladosporium fulvum* nach gasförmiger Einwirkung der C<sub>6</sub>-Wundgaskomponenten *trans*-2-Hexenal, *n*-Hexenal, *n*-Hexanol, *trans*-2-Hexenol und *cis*-3-Hexenol. (Nährmedium Biomalz-Agar 2%, Inokulum-Alter 7 Tage, Kulturdauer 5 Tage, 22 °C, Dauerdunkel.) Die Substanzen wirken bei ihren MHK alle fungizid.

MHK (in µl/Petrischale 9 cm Ø) für das lineare Oberflächenmyzelwachstum

Testpilze	Anzahl der Isolate	Wundgaskomponenten				
		<i>trans</i> -2-Hexenal	<i>n</i> -Hexenal	<i>n</i> -Hexanol	<i>trans</i> -2-Hexenol	<i>cis</i> -3-Hexenol
<i>Botrytis cinerea</i>	4	0,6 (± 0,0)	6 (± 0,2)	10 (± 0,2)	10 (± 0,5)	20 (± 0,5)
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	0,8 (± 0,2)	10 (± 0,3)	10 (± 0,5)	8 (± 0,4)	17 (± 0,6)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	2	1,0 (± 0,1)	16 (± 0,2)	12 (± 0,3)	10 (± 0,4)	23 (± 0,3)
<i>Didymella lycopersici</i>	1	1,5 (± 0,1)	10 (± 0,2)	12 (± 0,5)	12 (± 0,5)	17 (± 0,4)
<i>Cladosporium fulvum</i>	3	1,5 (± 0,1)	12 (± 0,4)	12 (± 0,3)	14 (± 0,6)	20 (± 0,5)

tische Aktivität (vgl. Tab. II). Diese hohe Wirksamkeit ist kennzeichnend für zahlreiche weitere  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Aldehyde und beruht auf der reaktionsfähigen Doppelbindung in Konjugation zur Aldehydgruppe [13–18].

Die verschiedenen Pilz-Arten wiesen gegen die Wundgaskomponenten unterschiedliche Empfindlichkeiten auf (Tab. II). Auch Sensitivitätsunterschiede zwischen einzelnen Isolaten einer Art traten auf, diese Abweichungen überschritten aber nicht die Variationsbreite gleicher Behandlungen einer Art.

Für die zum Wirkungstest verwendeten Reaktionskriterien (Sporen-Keimschlauchwachstum, Myzeltrockengewichtsproduktion und lineares Oberflächenmyzelwachstum) waren für alle Pilze gleichermaßen folgende Sensitivitätsabstufungen festzustellen:

Hohe Sensitivität	→			Geringe Sensitivität
Keimschlauchwachstum	>	Myzelgewichtsproduktion	>	lineares Oberflächenmyzelwachstum

In Anwesenheit der Wundgase erwies sich die flächenmäßige Ausbreitung auf dem Nährmedium bzw. die Entwicklung von Substrathyphen demnach am günstigsten für die Pilze.

Die stärkere Hemmung auf die Myzeltrockengewichtsproduktion mag zum einen auf einer größeren Schädigung durch direkt über die Gasphase auf die Lufthyphen erfolgende Einwirkung der Sub-

stanzen beruhen, zum anderen in einem Nährstoffmangel in den Lufthyphen infolge gestörten Stofftransportes vom Substratmyzel aus.

Die besonders hohe Beeinträchtigung des Keimschlauchwachstums basiert möglicherweise auf der geringen Stärke und unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung der Keimschlauchwände im Vergleich zu älteren Substrat- oder Lufthyphen.

Für Versuche zur Wirksamkeit der Wundgaskomponenten in Abhängigkeit vom Ernährungszustand der Pilze wurden diese auf Wasseragrar (WA), Biomalz-Agar (BM) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Malzextrakt (0,2%, 1%, 2%, 4%, 8%), Czapek-Dox-Agar (CzA) und Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA) kultiviert.

Die geringste Hemmwirkung durch die Wundgaskomponenten lag jeweils bei Verwendung des für die Sporenkeimung bzw. das vegetative Myzelwachstum optimalen Nährmediums vor:

für <i>Botrytis cinerea</i>	BM 4%,
<i>Rhizoctonia solani</i>	BM 2%,
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	BM 2%,
<i>Didymella lycopersici</i>	BM 2%,
<i>Cladosporium fulvum</i>	PDA.

Viele Organismen verfügen bei hoher Vitalität eher über kompensatorische Fähigkeiten gegenüber Schadeinflüssen als unter Mangelsituationen, die Einschränkungen bestimmter Stoffwechselprozesse bedingen können.

Die Pilze zeigten außerdem eine klare altersbedingte unterschiedliche Sensitivität gegen die Wundgaskomponenten. Sehr junge und sehr alte Inokula reagierten besonders sensibel, während bei einem

Inokulum-Alter von 7–10 Tagen die maximale Toleranz erreicht war. Als ursächliche Faktoren für diese vom Alter abhängige Reaktion der Pilze wären u.a. möglich: noch nicht ausdifferenzierte, wenig schützende Zellwände im frühen Entwicklungsstadium bzw. in weit fortgeschrittenem Alter ein allgemeiner Vitalitätsverlust infolge Erschöpfung endogener und exogener Reserve- und Nährstoffe, verminderte Syntheseleistung hinsichtlich eigener Baustoffe oder eine verringerte Produktion und Aktivität von Enzymen, welche Hemmstoffe abbauen können, sowie altersbedingte Permeabilitätsveränderungen.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß die identifizierten pflanzlichen C<sub>6</sub>-Wundgase als genuines Komponentengemisch und als Einzelkomponenten antimykotisch wirken können, und in welcher Weise die Empfindlichkeit der Pilze in entscheidendem Maße

- von der Gesamtkonzentration und dem Anteil der verschiedenen Wundgaskomponenten (wirksamster Bestandteil: *trans*-2-Hexenal),
- von der systematischen Stellung des Pilzes,
- vom Reaktionskriterium der Wirkungsprüfung,
- vom Ernährungszustand des Pilzes und
- vom Inokulum-Alter des Pilzes beeinflusst wird.

Inwiefern pflanzlichen Wundgasen auch *in vivo*, zumindest in unmittelbarer Nähe um verletztes Gewebe, eine Schutzfunktion gegenüber pathogenen Pilzen zukommt, bedarf detaillierter Infektionsversuche am natürlichen Standort der Pflanzen.

#### Danksagung

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für Sachbeihilfen zum Projekt „Flüchtige pflanzliche Antimykotika“.

- [1] S. J. Kazeniac and R. M. Hall, *Journ. Food Sci.* **35**, 519 (1970).
- [2] R. T. Major, D. D. Collins, P. Marchini, and H. W. Schnabel, *Phytochemistry* **11**, 607 (1972).
- [3] R. T. Major and M. Thomas, *Phytochemistry* **11**, 611 (1972).
- [4] F. B. Abeles, *Ethylene in Plant Biology*. Acad. Press New York, London 1973.
- [5] A. Hatanaka and T. Harada, *Phytochemistry* **12**, 2341 (1973).
- [6] T. Galliard, J. A. Matthew, M. J. Fishwick, and A. J. Wright, *Phytochemistry* **15**, 1647 (1976).
- [7] E. F. Elstner, *Biologie in unserer Zeit* **8**, 82 (1978).
- [8] J. G. Gonzales, P. Coggon, and G. W. Sanderson, *Journ. Food Sci.* **37**, 797 (1972).
- [9] R. T. Major, P. Marchini, and T. Sproston, *J. Biol. Chem.* **235**, 3298 (1960).
- [10] H. Schildknecht and G. Rauch, *Z. Naturforsch.* **16 b**, 422 (1961).
- [11] I. Urbasch, *Diss. Hamburg* (1982).
- [12] E. Sprecher, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **103**, 213 (1963).
- [13] J. C. Maruzzella, J. S. Chiamonte, and M. M. Garofalo, *Journ. Pharm. Sci.* **50**, 665 (1961).
- [14] B. Nandi and N. Fries, *Zeitschr. Pfl.krankh. Pfl.schutz* **83**, 284 (1976).
- [15] L. B. Bullerman, F. Y. Lieu, and S. A. Seier, *Journ. Food Sci.* **42**, 1107 (1977).
- [16] B. Nandi, *Zeitschr. Pfl.krankh. Pfl.schutz* **84**, 114 (1977a).
- [17] B. Nandi, *Phytopath. Z.* **92**, 251 (1977b).
- [18] N. Kurita, M. Miyaji, R. Kurane, and Y. Takahara, *Agric. Biol. Chem.* **45**, 945 (1980).