

Dr. M. Geibel, Lehrstuhl f. Obstbau, TU München-Weihenstephan, 8050 Freising

Möglicher Abwehrmechanismus von *Prunus cerasus* gegen *Cytospora persoonii* durch pflanzeneigene Flavonoid 5-Glucoside

Summary

Cytospora persoonii causes necrotic bark-tissues of several *Prunus* species. Near an infection of *P. avium* there is a large accumulation of several phenols. Since *P. cerasus* is more resistant as *P. avium*, the typical phenols of the bark of *P. cerasus* were isolated and identified. There were mainly flavonoid 5-glucosides compared with 7-glucosides in *P. avium*. *In vitro* tests showed, that most of the isolated phenols could reduce mycelia-growth of the fungus. The reduction was higher with aglycones than with glycosides. Because of the typical ability of the 5-glucosides to hydrolyse more rapidly than the corresponding 7-glucosides, the following hypothesis is formed: In the case of wounding or infection the 5-glucosides of *P. cerasus* produce more rapidly the more toxic aglycones than 7-glucosides in *P. avium*. Therefore *P. cerasus* is more resistant to *C. persoonii* than *P. avium*.

Einleitung

Cytospora persoonii, der Erreger der Krötenhaut- oder Valsakrankheit des Steinobstes, ist ein Wundparasit, der zu Rindennekrosen und in schlimmen Fällen sogar zum Absterben ganzer Bäume führt (1). Da einerseits als einzige Bekämpfungsmöglichkeit nur die sorgfältige Wundpflege und großzügiges Ausschneiden befallener Astpartien in Frage kommen und andererseits Phenole in vielen Fällen als Resistenzursachen bekannt sind, wurde auch bei diesem Wirt-Parasit-System die Bedeutung der Phenole untersucht.

Nekrosen, deren Ausbreitung zum Stillstand gekommen ist, zeigten bei 21 Süßkirscharten einen deutlichen Konzentrationsanstieg der meisten Phenole in den Abgrenzungsgeweben (2).

Unterschiede im Phenolmuster von Süß- und Sauerkirschen

Ein anderer Schwerpunkt der Untersuchungen lag im Unterschied des Phenolmusters zwischen Süß- und Sauerkirschen. Sauerkirschen (*P. cerasus*) sind in der Regel weniger anfällig als Süßkirschen (*P. avium*). Es wurden die typischen Sauerkirschphenole aus den Rindengeweben isoliert und identifiziert (3, 4). Diese unterscheiden sich von den Süßkirschphenolen deutlich durch die Bindungsstelle des Glukose-Restes. Während bei Sauerkirschen sogenannte 5-Glukoside vorherrschen, treten diese in Süßkirschen, wenn überhaupt, nur in Spuren auf.

Hemmwirkung der isolierten Phenole auf *Cytospora personii* *in vitro*

Es wurde eine Testmethode entwickelt, um den Einfluß der isolierten Phenole auf das Wachstum von *Cytospora*-Mycel zu erfassen:

Testplatten: Mikrotiterplatten (96 Löcher á 50 µl Nährmedium).

Nährmedium: 0,5 % Agar, 0,1 % Biomalz und 0,03 % Streptomycinsulfat.

Versuchsumfang 2 Versuche x 4 Wiederholungen x 13 Phenole x 4 Konzentrationen

Phenolzugabe: Auf den erkalteten Agar in jedes Loch 8 µl methanolische Phenollösung (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM und 2,5 mM)

Kontrolle: Ohne Zugabe oder mit Methanol.

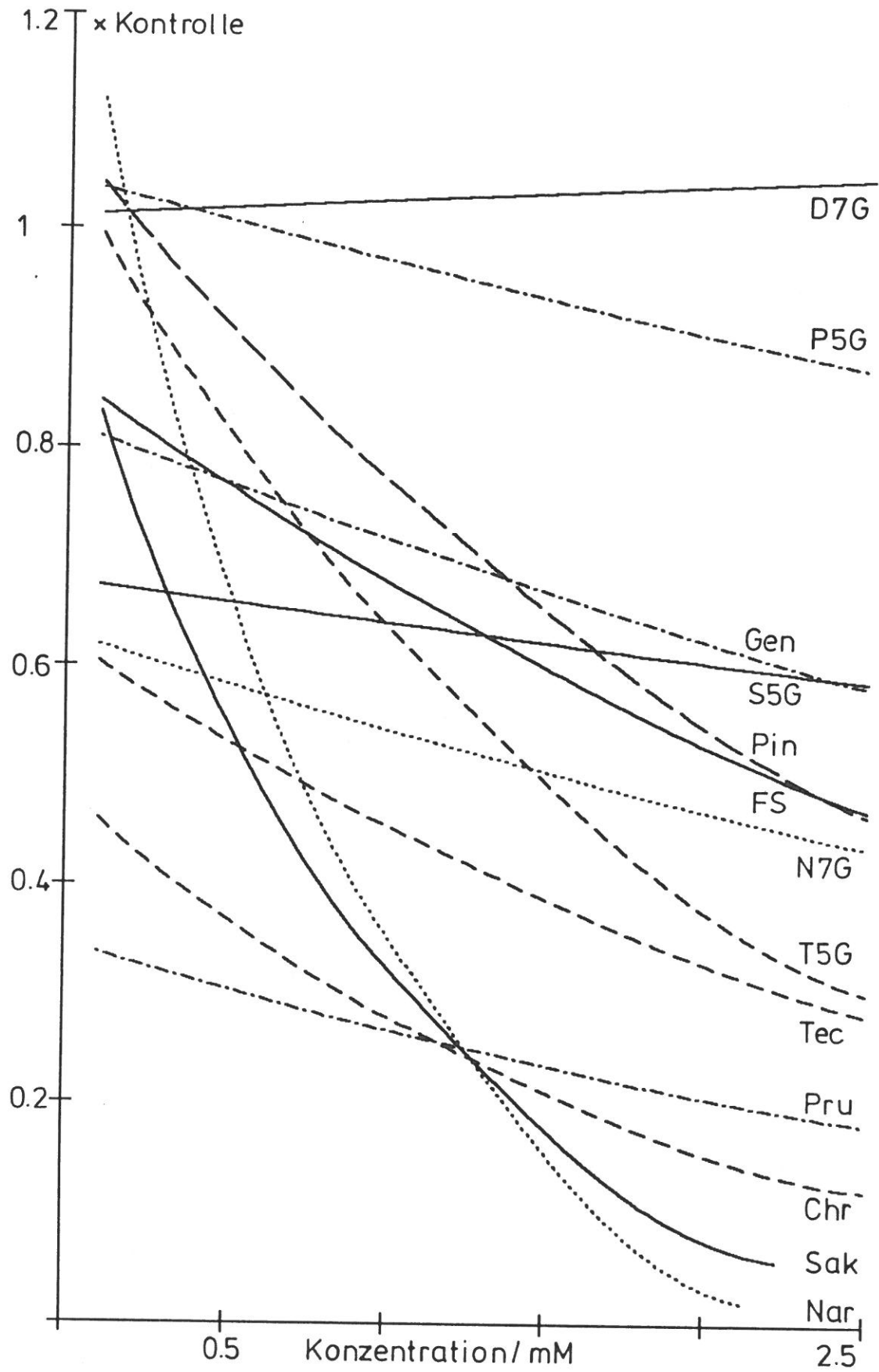
Inokulation: Mit Pasteurpipetten ausgestochene runde Agarscheiben mit 2 Wochen altem Mycel; Übertragung mittels Lanzettnadel.

Bonitur: Mycel-bedeckte Fläche (in 10% Schritten) nach 3 und 6 Tagen (1. Versuch) bzw. 5 und 8 Tagen (2. Versuch).

Auswertung: Regression der Boniturnwerte bezogen auf Werte bei Methanol.

Die Regressionsanalyse (Abbildung 1) faßt zwei Versuche mit 13 unterschiedlichen Phenolen zusammen. Fast alle Phenole führten zumindest bei höherer Konzentration zu einer Hemmung des Pilzwachstums. Lediglich bei Dihydrowogonin 7-glc und Prunetin 5-glc konnte dies nicht bestätigt werden. Vollständige Hemmung war bei 2,5 mM Naringenin immer und bei 1 mM und 2,5 mM Chrysin teilweise zu beobachten. Sakuranetin hemmte bei 0,5 mM, 1 mM und 2,5 mM in den meisten Fällen vollständig, aber bei 0,1 mM praktisch nicht mehr. Genistein hemmte in einem Versuch recht stark (ähnlich Chrysin oder Prunetin), aber im zweiten Versuch gar nicht. Aglykone beeinträchtigten in der Regel das Wachstum stärker als ihre Glykoside. Besonders bei Naringenin fällt auf, daß es bei hohen Konzentrationen wesentlich stärker hemmt als das Glykosid Prunin (Naringenin 7-glc). Bei niedrigen Konzentrationen hemmte jedoch Prunin stärker. Etwas Ähnliches könnte auch im Bereich von 0,1 bis 0,5 mM Sakuranetin und Sakuranin (Sakuranetin 5-glc) vorliegen. Die Kontrolle mit Methanol wies verglichen mit der Kontrolle ohne Zugabe um ca. 20 % weniger Wachstum auf. Deshalb wurden die Phenolwerte immer auf den Methanolmittelwert bezogen.

Abb. 1: Hemmwirkung der isolierten Phenole [**D7G** Dihydrowogonin 7-glc, **P5G** Prunetin 5-glc, **Gen** Genistein, **S5G** Sakuranetin 5-glc (Sakuranin), **Pin** Pinostrobin, **FS** Ferulasäure, **N7G** Naringenin 7-glc (Prunin), **T5G** Tectochrysin 5-glc, **Tec** Tectochrysin, **Pru** Prunetin, **Chr** Chrysin, **Sak** Sakuranetin, **Nar** Naringenin]; Mycelwachstum relativ zur Kontrolle (Methanol = 1).



Leichte Hydrolysierbarkeit der 5-Glukoside

Als typische Reaktion der 5-Glukoside konnte die Fähigkeit nachgewiesen werden, ihren Zuckerrest in saurer Umgebung wesentlich leichter abzuspalten, als die 7-Glukoside aus Süßkirschen (4). Apigenin 5-Glukosid hatte in 3 M Äpfelsäure bei Zimmertemperatur eine Halbwertszeit von 5,5 Tagen. Andererseits reagierte Apigenin 7-glukosid noch bei 60 °C bedeutend langsamer und es setzte erst in der zweiten Woche eine stärkere Hydrolyse ein. Zum Vergleich aller 5-Glukoside sind in Tabelle 1 die Halbwertszeit der 5-Glukoside aus *P. cerasus* in 1 molarer Äpfelsäure bei 60 °C angeführt.

Tab. 1: Strukturelle Zusammenhänge und Halbwertszeiten der isolierten Glukoside

Substituenten -OMe -OH	Chalkone	Flavanone <i>Halbwertszeiten in 1 M Äpfelsäure bei 60 °C</i>	Flavone	Isoflavone
7	5	Pinostrobin 5-glc 18,7 h	Tectochrysin 5-glc 3,1 h	
-	5, 7, 4'		Apigenin 5-glc 2,8 h	Genistein 5-glc 1,3 h
7	5, 4'	Neosakuranin 4,0 h	Sakuranin 27,0 h	Genkwanin 5-glc 2,1 h
				Prunetin 5-glc 1,6 h

Anmerkung: Nummerierung von Neosakuranin anders, aber als Chalkon von Sakuranin, in derselben Reihe. Halbwertszeit von Neosakuranin nicht aufgrund der Hydrolyse, sondern wegen Umsetzung zum Flavanon Sakuranin.

Diese leichte Hydrolysierbarkeit der 5-Glukoside aus *P. cerasus* deutet zusammen mit den Ergebnissen der Biotests auf den Resistenzmechanismus hin. Danach könnte im Fall einer Verwundung oder Infektion bei *P. cerasus* aus den üblicherweise vorliegenden Phenol-Glukosiden durch Hydrolyse schneller als in *P. avium* die deutlich toxischeren Aglykone entstehen. In *Prunus cerasus* existiert somit schneller ein Abwehrmechanismus als in *P. avium*, was letztendlich zur erhöhten Widerstandskraft führt.

Literatur:

- (1) GEIBEL, M. und T. VOGEL, 1989: Valsagefähr als Folge des Frostwinters 1984/85, *Obstbau* **14** (1), S. 18-20
- (2) GEIBEL, M., 1991: *Strukturen von Phenolen aus Geweben der Kirschenrinde und deren Beziehung zum Resistenzverhalten gegen Leucostoma personii (Nits.) v. Höhnelt, den Erreger des Rindenkrebses*, Dissertation TU-München
- (3) GEIBEL, M., H. GEIGER und D. TREUTTER, 1990: Tectochrysin 5- and Genistein 5-glucosides from the bark of *Prunus cerasus*, *Phytochemistry* **29** (4), S. 1351-1353
- (4) GEIBEL, M. und W. FEUCHT, 1991: Flavonoid 5-glucosides from *Prunus cerasus* bark and their characteristic weak glycosidic bonding, *Phytochemistry* **30** (5), S. 1519-1521.