

Neue pilzabweisende Eigenschaften von mit UV-Licht behandelten Pflanzen

Olivier Schumpp¹, Valentine Berger¹, Eric Remolif¹, Bernard Messerli², Peter Frei¹, Michel Monod³, Jean-Luc Wolfender⁴ und Katia Gindro¹

¹Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon

²Schweizerisches Nationalmuseum, Château de Prangins, 1197 Prangins

³Departement der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Labor für Pilzkunde, Universitätsspital des Kantons Waadt, Lausanne

⁴Phytochemie und natürlich-bioaktive Substanzen, Sektion der Pharmazeutischen Wissenschaften, Universität Genf - Universität Lausanne, Quai Ernest Ansermet 30, 1211 Genf 4

Auskünfte: Olivier Schumpp, E-Mail olivier.schumpp@acw.admin.ch, Tel. +41 22 363 43 53



Die pflanzliche Biodiversität kann der Ausgangspunkt für interessante Moleküle mit fungistatischer Wirkung sein.

Einleitung

Mit der Entwicklung von Resistenzen gegen Pflanzenschutzmittel und dem Auftreten neuer Krankheiten in Spitälern sind die Medizin und die Agronomie aufgerufen, neue Aktivsubstanzen zu erforschen (Fisher *et al.* 2012). In einer natürlichen Umwelt, in welcher die Mikroorganismen sehr präsent sind, vermögen die Pflanzen und Mikroorganismen sich selbst gegen ihre Angreifer durch die Produktion toxischer Substanzen zu schützen

(Bennet und Wallsgrave 1994; Spiteller 2008). Der Mensch hat es verstanden, diese Quelle von aktiven Molekülen für sich zu nutzen. Bis heute ist ein grosser Teil der antimikrobiellen Stoffe in der Medizin sowie einige Pflanzenschutzmittel aus natürlichen Substanzen abgeleitet oder in der Grundidee diesen nachgebildet (Newam und Cragg 2007). Allerdings hat das Interesse an natürlichen Substanzen in den letzten zwei Jahrzehnten abgenommen, da es schwierig ist, mit komplexen Extrakten zu arbeiten, und die Isolation der bioaktiven

Produkte sehr viel Zeit benötigt. Heute neigt die Industrie prioritär dazu, vorhandene synthetische Moleküle nach potenziell einsatzfähigen Molekülen zu durchkämmen (Strohl 200; Li und Vederas 2009).

Um die Produktion natürlicher, neuer, aber eher seltener Substanzen zu aktivieren, unterziehen Mikrobiologen ihre Kulturen Umweltstressfaktoren (Bode *et al.* 2002; Scherlach und Hertweck 2009). Chemische Substanzen, welche Pflanzen als Reaktion auf den Befall durch einen pathogenen Keim oder einen Schädling erzeugen, können zum Kulturmedium hinzugegeben werden, was ebenfalls die Entdeckung neuer Aktivsubstanzen bewirken kann (Poulev *et al.* 2003).

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, zu prüfen, ob mit einem unspezifischen Stress auf Blätter oder Blüten von Pflanzen die Produktion neuer Verbindungen für agronomische oder medizinische Zwecke stimuliert werden kann. UV-Licht induziert einen generellen Stress, welcher zu einer Stimulierung des Sekundärstoffwechsels führen kann. In diesem Zusammenhang haben wir die fungiziden Eigenschaften von Molekülen erforscht, deren Produktion durch UV-Licht hervorgerufen wird. Die fungizide Aktivität wurde bei *Fusarium*-Arten untersucht, die besonders in der Landwirtschaft grosse Verluste verursachen. Diese Pilzarten treten aber auch vermehrt als klinische Fälle von Nagelerkrankungen auf.

Material und Methoden

Biologisches Material

Das Pflanzenmaterial wurde auf dem Landwirtschaftsbetrieb von Agroscope ACW und im Garten der alten Sorten des Schlosses von Prangins gesammelt. Die Blätter und Blüten wurden auf Filterpapier, das mit 30 ml Wasser durchtränkt war, in Polystyrenschachteln gelegt. Diese Dosen wurden einer Bestrahlung mit UV-C (Wellenlänge 253 nm; Abb. 1) ausgesetzt, anschliessend verschlossen und in eine Wachstumskabine gebracht. Der Pilzstamm *Fusarium solani* Sin74 stammt aus einer Sammlung von Pilzkulturen, welche von Patienten im waadtländischen Kantonsspital isoliert wurden, die eine Erkrankung der Nägel aufwiesen. Die Stämme wurden nach dem bestehenden Standardprotokoll in die Pilzsammlung Mycoscope (<http://mycoscope.bcis.ch/>) integriert. Kleine bewachsene Agarstücke werden in PDB (Potato Dextrose Broth, Difco), ein Viertel der vom Fabrikanten empfohlenen Konzentration überimpft.

Biotests

Die Extraktion der Proben mit Ultraschall wurde an frischem Material während 20 Minuten bei einer Frequenz von 25 KHz in Methanol (30 ml pro Gramm Pflanzenma-

Zusammenfassung ■ Unter Stress erzeugen Pflanzen chemische Verbindungen, um sich zu schützen. Diese Moleküle helfen ihnen, sich an Veränderungen in ihrer Umwelt anzupassen und sich, unter anderem, gegen Pilzkrankheiten zu verteidigen. Gewisse pflanzenpathogene Pilze, insbesondere jene, die zur Gruppe der Fusarien gehören, sind fähig, auch beim Menschen Krankheiten hervorzurufen. Um neue, pilzabtötende Moleküle zu entdecken, welche im agronomischen und medizinischen Bereich nutzbar wären, wurden etwa dreissig Pflanzenarten einem Lichtstress durch Behandlung mit UV-C unterworfen. Die Arten der Familie Vitaceae reagieren besonders gut auf diese Stimulation indem sie neue Substanzen mit Wirkung gegen Fusarien produzieren.

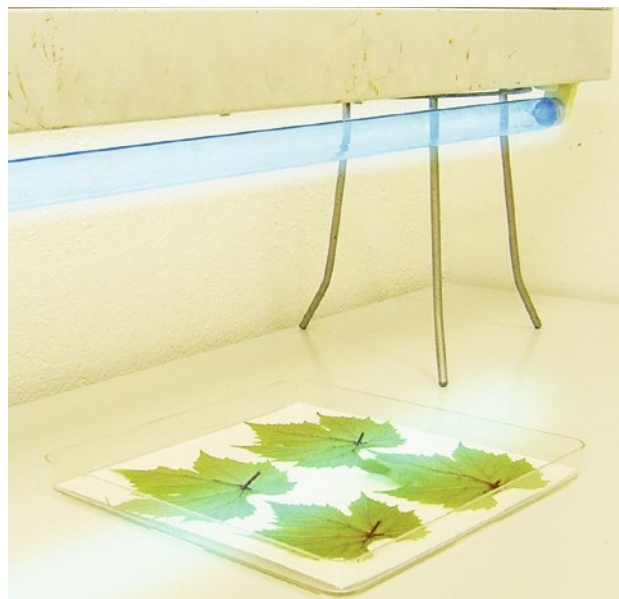


Abb. 1 | Exposition von Rebenblättern gegenüber UV-C Licht (253 nm).

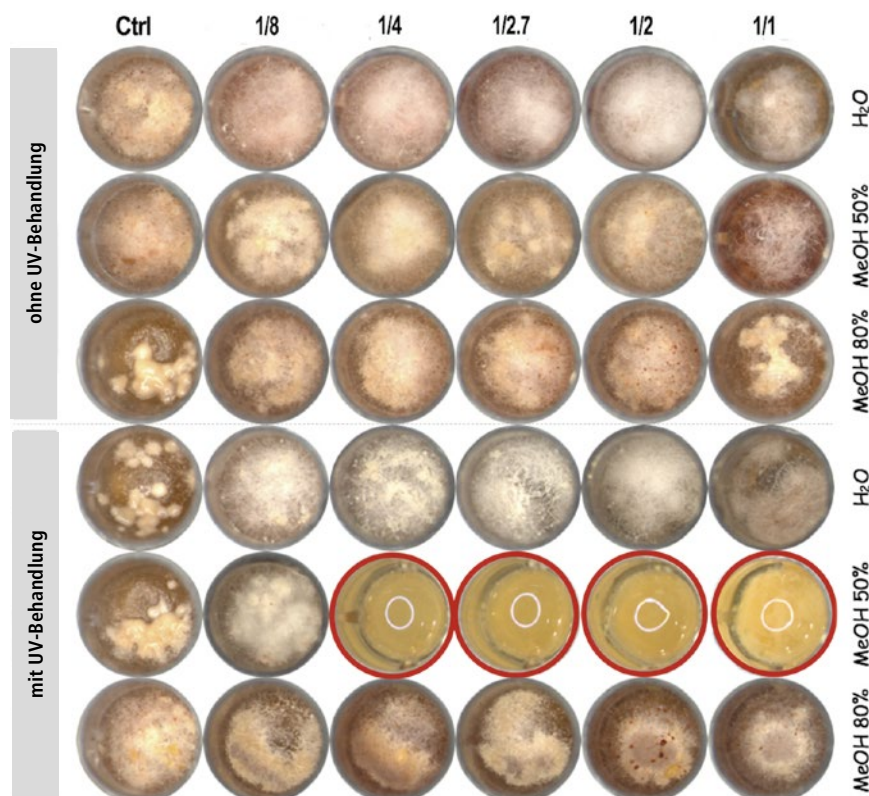


Abb. 2 | Test der fungistatischen Wirkung von Rebenextrakten mit und ohne Behandlung mit UV-C Licht gegen den Pilzstamm *Fusarium solani* Sin 74, welcher gegenüber bekannten Behandlungen resistent ist. Die Verdünnungsfaktoren sind mit grauen Buchstaben angegeben. Nach einer UV-C Licht Exposition zeigt die halbpolare Fraktion, die mit 50 % Alkohol eluiert wurde, eine fungistatische Wirkung, welche das Wachstum des Pilzstammes *Fusarium solani* Sin 74 hemmt (Teststellen rot umrandet). Das ursprüngliche Extrakt verliert seine Aktivität wenn es achtfach oder mehr verdünnt wird (Ctrl = Kontrollmilieu ohne pflanzliches Extrakt).

terial) durchgeführt. Die Extrakte wurden anschliessend mit einer Filterspritze der Maschenweite 0,45 µm gefiltert, danach in eine Wassersuspension überführt und auf eine Chromatographiesäule mit Umkehrphase aufgetragen (Supelclean TM LC18, 3 ml, 500 mg von Sigma, Buch, Schweiz). Die Chromatographiesäule war vorgängig mit 3×3 Volumeneinheiten von Methanol und 3×3 Volumeneinheiten von Wasser vorbereitet worden. Die Extrakte wurden schrittweise in drei Fraktionen verschiedener Polarität aufgetrennt und getrocknet. Der polaren Fraktion wird 6 ml Wasser zugegeben. Der halbpolaren Fraktion wird 6 ml 50%-iges Methanol und der am wenigsten polaren Fraktion 6 ml 80%-iges Methanol hinzugefügt. Die biologische Aktivität gegen Fusarien wurde auf Mikroplatten mit einer Verdünnungsreihe von eins bis acht gemessen. Die Extraktmenge, welche aus vier Gramm frischem Pflanzenmaterial gewonnen werden konnte, wird für die höchste Konzentration erneut in 1 ml Kulturmilieu in Suspension gebracht. Die

nächsten vier Fraktionen werden verdünnt gemäss Schumppe *et al.* (2012).

HPLC - Analyse

Von jeder getesteten Pflanzenart hat man drei Blattrondellen mit einem Durchmesser von 4 mm entnommen, gewogen und sofort unter Schütteln in 100 µl Methanol während 10 Minuten bei 60 °C extrahiert. Nach Zentrifugation der pflanzlichen Reste wurden 30 µl des oben aufschwimmenden Konzentrates direkt in ein HPLC-UV-Ultimate-300-(Dionex)-Chromatographiegerät mit einer Säule mit Umkehrphase Lichrospher C18 (Merck) injiziert und bei 250 nm analysiert.

Resultate und Diskussion

Das Pflanzenmaterial, das im Feld oder im Gewächshaus eingesammelt worden war, wurde unverzüglich in Dosen gelegt mit der Unterseite der Blätter nach oben.

Tab. 1 | Antifungistatische Eigenschaften von 31 Pflanzenarten. Die Pflanzenextrakte wurden in Mikroschalen mit je 96 Teststellen geprüft. Die Symbole (-, +, ++... etc.) geben den Grad der antifungistatischen Aktivität an. Die Proben, welche eine induzierte, unterdrückte oder von UV-Licht nicht beeinflusste antifungistatische Wirkung aufweisen sind blau unterlegt; nd = nicht bestimmte Aktivität

Trivialname:	Wissenschaftlicher Name	Familie	Polare Fraktion (Wasser)		Halb-polare Fraktion (MeOH 50%)		Nicht-polare Fraktion (MeOH 80%)	
			Kontrolle	UV	Kontrolle	UV	Kontrolle	UV
Süßwurz	<i>Sium sisarum</i>	Apiaceae	-	-	-	-	-	-
Echter Wermut	<i>Artemisia absinthium</i>	Asteraceae	-	-	-	-	-	-
Wilde Artischoke	<i>Cynara cardunculus</i>	Asteraceae	-	-	-	-	-	-
Topinambur	<i>Helianthus tuberosus</i>	Asteraceae	-	-	-	-	-	-
Grüner Salat	<i>Lactuca sativa</i>	Asteraceae	-	-	-	-	-	-
Einjähriger Borretsch	<i>Borago officinalis</i>	Boraginaceae	-	-	-	-	-	-
Öl-Rauke	<i>Brassica eruca</i>	Brassicaceae	-	-	-	-	-	-
Gewöhnlicher Meerrettich	<i>Cochlearia armoracia</i>	Brassicaceae	-	-	-	-	-	-
Hanf	<i>Cannabis sativa</i>	Cannabaceae	-	-	-	-	-	-
-	<i>Euphorbia leuconeura</i>	Euphorbiaceae	-	-	-	-	-	-
-	<i>Euphorbia pulcherrina</i>	Euphorbiaceae	-	-	-	-	-	-
Erbse	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	++	-	+++	+++	-	-
Echter Safran	<i>Crocus sativus_</i>	Iridaceae	-	-	-	-	-	-
Ysop	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	-	-	-	-	-	-
Schlangen – Lauch	<i>Allium scorodoprasum</i>	Liliaceae	+	+	-	-	-	-
Gerandeter Drachenbaum	<i>Dracaena marginata</i>	Liliaceae	-	-	-	-	-	-
Echte Feige	<i>Ficus carica</i>	Moracées	-	-	-	-	-	-
Dendrobium	<i>Dendrobium sp.</i>	Orchidaceae	-	-	-	-	-	-
Krähenfuss -Wegerich	<i>Plantago coronopus_</i>	Plantaginaceae	-	-	-	-	-	-
Mais	<i>Zea mays</i>	Poacées	-	-	-	-	-	-
Schwarze Nieswurz	<i>Helleborus niger</i>	Ranunculaceae	+++	+++	++	+	++	-
Zitronenbaum	<i>Citrus limon</i>	Rutaceae	-	-	-	-	-	-
Wein-Raute	<i>Ruta graveolens</i>	Rutaceae	-	-	-	-	+	+
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Solanaceae	-	-	-	-	-	-
-	<i>Ampelopsis sp.</i>	Vitaceae	nd	nd	-	++	nd	nd
Känguruhwein	<i>Cissus antartica</i>	Vitaceae	-	-	+	+	-	-
Zimmerrebe	<i>Cissus rhombifolia</i>	Vitaceae	-	-	++	-	++	++
-	<i>Vitis candicans</i>	Vitaceae	nd	nd	+	+++	nd	nd
Muscadine	<i>Muscadina rotundifolia</i>	Vitaceae	nd	nd	+	++	nd	nd
Sand-Rebe	<i>Vitis rupestris</i>	Vitaceae	nd	nd	+	+++	nd	nd
Weinrebe	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	-	-	-	+++	-	-

Nach der UV-Exposition wurden die Blätter während drei Tagen in eine Wachstumskombi verbracht. Nach dieser Periode hat man bei den gegenüber der Behandlung empfindlichsten Arten Symptome von Gewebezellerfall (nektrotische Ablagerungen) beobachtet. Aus diesen Gründen wurde die Inkubationszeit für die Blüten auf 48 h angesetzt. Eine Behandlung der Blätter oder der Blüten mit UV induziert chemische Modifikationen, welche mit HPLC-UV-Technik beobachtet werden können. Diese Veränderungen sind qualitativer Natur: neue

Peaks erscheinen auf dem Chromatogramm der behandelten Proben im Gegensatz zu unbehandelten Proben, was neue Substanzen anzeigt. Diese Veränderungen sind auch quantitativer Art bei jenen Substanzen, welche schon in den unbehandelten Proben vorhanden sind, aber für welche die Konzentration manchmal merklich ansteigt drei Tage nach der Behandlung mit UV-C. Pflanzen, die einer starken Bestrahlung ausgesetzt werden, produzieren sekundäre Verbindungen, welche UV-Strahlung absorbieren, was einen Abwehrmechanismus

mus der exponierten Pflanzen darstellt (Frohneier und Staiger 2003). Es werden aber auch sekundäre Verbindungen unter denselben Bedingungen erzeugt, wobei deren Produktion in den Pflanzen als Abwehrreaktion gegen Mikroorganismen zu verstehen ist (Schumpp *et al.*, 2012). Um deren pilzabtötende Aktivität besser herauszuarbeiten, werden die gesamten pflanzlichen Extrakte in drei Fraktionen unterschiedlicher Polarität auf einer SPE-Säule aufgetrennt. Jede Fraktion wird anschliessend auf Mikroplatten (Abb. 2) in Bezug auf ihre biologische Aktivität gegen *Fusarium solani* Sin74 untersucht. Dieser Pilz ist gegenüber konventionellen Behandlungen wenig empfindlich. Auf den Blüten konnte keine Reaktion und keine gegen Pilze gerichtete Aktivität nachgewiesen werden. Bei fünf Arten von insgesamt 31 Arten, deren Blätter einer UV-Bestrahlung ausgesetzt worden waren, konnte hingegen eine gegen Fusarien gerichtete Aktivität in der halbpolaren Fraktion nachgewiesen werden. Fünf andere Arten weisen eine gegen Fusarien gerichtete Aktivität auf, welche durch die Exposition gegenüber UV in einer der drei Fraktionen nicht beeinflusst wird. Drei Arten verlieren ihre fungizide Wirkung in einer oder zwei der drei Fraktionen nach UV-Exposition (Tab. 1). Dieser Wirkungsverlust lässt sich durch einen Abbau der Moleküle erklären, welche der UV-Strahlung ausgesetzt waren (Isomeration, Polymerisation, Photolyse...). Eine mögliche Erklärung liegt in der Reorientierung des metabolischen Flusses in der Pflanze in Folge einer Aktivierung gewisser Biosynthesewege, welche an die Resistenz gegenüber Lichtstress gekoppelt sind.

Obwohl die Pflanzenarten, welche in dieser Studie verwendet wurden, oft eine Aktivierung von Molekülen zeigen, was mit HPLC-UV beobachtet werden kann, wird nur bei gewissen Pflanzen der Familie der *Vitaceae* die Erzeugung neuer Moleküle ausgelöst. Dabei handelt es sich um Moleküle mit gegen Pilze gerichteter Aktivität, die in dieser Studie in der einen oder der andern der drei Fraktionen genutzt werden kann. Die Fraktionierung des Brutto-Extraktes erlaubt es, die Fraktionen mit aktiven Molekülen anzureichern, was erste Informationen über die Polarität dieser aktiven Moleküle liefert. So findet sich bei den *Vitaceae* diese Aktivität vorwiegend in der Fraktion mit 50 %-igem Alkohol. Dies weist darauf hin, dass die gegen Fusarien gerichtete Aktivität jene Familie von Molekülen betreffen könnte, welche eine mittlere Polarität aufweisen.

Die UV-Induktion erlaubt somit bei gewissen Arten die Erzeugung neuer, aktiver Moleküle in einer Pflanze auszulösen, welche diese Moleküle unter Standardbedingungen nicht erzeugen würde. Diese Resultate zeigen auf, dass die Verwendung von Stress, so zum Beispiel UV-Licht, in gewissen Pflanzen biologische

Aktivitäten auslösen können, die bisher unbekannt waren, die jedoch für pharmakologische und agronomische Zwecke genutzt werden können.

Schlussfolgerungen

- Die überwiegende Mehrheit der Pflanzen kann sich gegen äussere Angreifer verteidigen. Dieses Abwehrverhalten ist üblicherweise nicht in der grundlegenden Konstitution der Pflanzen angelegt, sondern wird als Reaktion auf biotische oder abiotische Faktoren ausgelöst.
- Wird der sekundäre Stoffwechsel durch einen allgemeinen Stress aktiviert, so führt die UV-C-Exposition bei gewissen Pflanzen der Familie der *Vitaceae* zum Auftreten neuer Antipilz-Substanzen.
- Die UV-C-Bestrahlung erweist sich als innovatives und wirksames Werkzeug, um neue biologische Eigenschaften aufzuzeigen. Dabei werden vor allem Kulturpflanzen oder alte Sorten erforscht, welche die lokale Biodiversität vertreten. ■

Riassunto

Nuove proprietà antifungine di piante esposte ai raggi UV

In situazioni di stress, le piante producono dei composti chimici per proteggersi. Queste molecole le aiutano ad adattarsi ai cambiamenti del loro ambiente e a difendersi tra l'altro contro le malattie fungine. Certe specie di funghi fitopatogeni, in particolare quelle che appartengono al gruppo *Fusarium*, sono pure capaci di sviluppare delle malattie nell'uomo. Per scoprire nuove molecole fungicide, sfruttabili sia nel settore agronomico che in quello medico, una trentina di specie vegetali hanno subito uno stress luminoso attraverso trattamento agli UV-C. Le specie della famiglia delle Vitaceae rispondono particolarmente bene a questo stimolo, producendo delle nuove sostanze efficaci contro i *Fusarium*.

Summary

Antifungal properties of plants exposed to UV irradiation

When exposed to stress, plants produce protective compounds. These molecules contribute to their adaptation to environmental changes and to resistance to microbial attacks. Some fungal phytopathogenic species, especially those belonging to the *Fusarium* group, are also able to develop diseases in humans. In order to identify new sources of antifungal molecules of pharmacologic or agronomic interest, around thirty plant species from different taxonomical groups have been exposed to UV-C. Plant species from the *Vitaceae* group respond to UV treatment with the induction of a strong anti-fusaric activity.

Key words: *Fusarium*, UV-C, stress, OSMAC, fungicides.

Literatur

- Bennett R. & Wallsgrove R., 1994. Secondary Metabolites in Plant Defense-Mechanisms. *New Phytol* **127** (4), 617–633.
- Bode H. Bethe B., Hofs R. & Zeeck A., 2002. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **3** (7), 619–627.
- Fisher M. C., Henk D. A., Briggs C. J., Brownstein J. S., Madoff L. C., McCraw S. L. & Gurr S. J., 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484** (7393), 186–194.
- Frohnmeyer H. & Staiger D., 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol.* **133** (4), 1420–1428.
- Li J. W. H. & Vederas J. C., 2009. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science* **325** (5937), 161–165.
- Newman D. J. & Cragg G. M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70** (3), 461–477.
- Poulev A., O'Neal J., Logendra S., Pouleva R., Timeva V., Garvey A., Gleba D., Jenkins I., Halpern B., Kneer R., Cragg G. & Raskin I., 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem.* **46** (12), 2542–2547.
- Scherlach K. & Hertweck C., 2009. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org. Biomol. Chem.* **7** (9), 1753–1760.
- Schumpp O., Bruderhofer N., Monod M., Wolfender J.L. & Gindro K., 2012. Ultraviolet induction of antifungal activity in plants. *Mycoses* doi:10.1111/j.1439-0507.2012.02192.x
- Spitteller P., 2008. Chemical defence strategies of higher fungi. *Chemistry* **14** (30), 9100–9110.
- Strohl W., 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discov Today* **5** (2), 39–41.