

# Ein flüchtiges Lacton aus *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, dem Pathogen der Europäischen Esche, inhibiert die Keimung seines Wirtes\*\*

Christian A. Citron, Corina Junker, Barbara Schulz und Jeroen S. Dickschat\*

**Abstract:** Der weitgehend unbekannte Sekundärmetabolismus des phytopathogenen Pilzes *Hymenoscyphus pseudoalbidus* wurde mittels der CLSA-Methode untersucht. Eine Serie flüchtiger Lactone wurde per GC/MS identifiziert. Die Lactone wurden synthetisiert und in einem Bioaktivitätstest eingesetzt, in dem eine der Verbindungen als starker Keimungs-inhibitor gegenüber Eschensamen auffiel. Diese Verbindung verursachte überdies Nekrosen im pflanzlichen Gewebe.

Die Gemeine oder Europäische Esche, *Fraxinus excelsior*, ist ein ökologisch und ökonomisch bedeutsamer Baum, der in fast ganz Europa und Teilen Asiens rund um das Schwarze Meer beheimatet ist. Die Art ist durch das Eschensterben, eine Krankheit, die durch den pathogenen Pilz *Hymenoscyphus pseudoalbidus* verursacht wird, stark gefährdet. Bei dem Pilz handelt es sich um eine Spezies, die aus Fernost nach Europa eindringt.<sup>[1]</sup> Im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte hat sich die Krankheit in Europa rasch von Ost nach West ausgebreitet und im Jahr 2012 die britischen Inseln erreicht.<sup>[2–11]</sup> Vor kurzem wurde das bekannte Phytotoxin Viridiol als ein wichtiger Virulenzfaktor von *H. pseudoalbidus* vorgeschlagen,<sup>[12]</sup> da diese Verbindung aber auch von der avirulenten Geschwisterspezies *H. albidus* produziert wird und die Konzentration dieses Metaboliten in verschiedenen Pilzisolaten nicht mit der Virulenz korreliert, kann Viridiol nicht der einzige für die Pathogenität verantwortliche Virulenzfaktor sein.<sup>[13]</sup> Das Pathogen produziert Exoenzyme, die das Gewebe der Wirtspflanze abbauen,<sup>[13]</sup> es sind aber keine anderen Phytotoxine bekannt. Wir berichten hier, dass das flüchtige Lacton 3,4-Dimethylpentan-4-olid von *H. pseudoalbidus* als Enantiomerenmischung emittiert wird, die Keimung von *F. excelsior* stark hemmt und Nekrosen im Pflanzengewebe verursacht. Die stärkste keimhemmende Wirkung wurde für das Racemat beobachtet, wohingegen die reinen Enantiomere geringere Aktivität zeigten. Unsere Ergebnisse

zeigen, dass das Phytotoxin 3,4-Dimethylpentan-4-olid aus *H. pseudoalbidus* eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor im Eschensterben spielt. Die Kenntnis dieses Phytotoxins ist wichtig, da sie die Grundlage für zukünftige Untersuchungen legt, um das molekulare Target zu finden und die Pathogenität von *H. pseudoalbidus* sowie Resistenzmechanismen der Esche gegen das Pathogen zu verstehen.

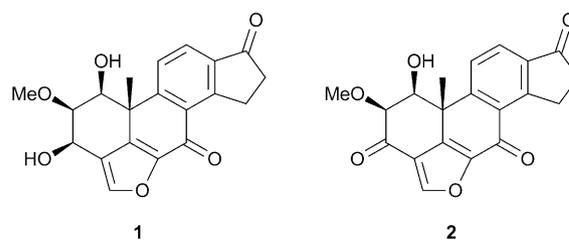
*H. pseudoalbidus* (Syn. *Chalara fraxinea*) ist der Erreger des Eschensterbens, einer Krankheit, die in den vergangenen zwei Jahrzehnten zunehmend die gesamte Population der Gemeinen Esche (*F. excelsior*) in Europa bedroht hat.<sup>[2–4]</sup> Jüngst wurde die Krankheit auch in anderen Spezies wie der Schmalblättrigen Esche (*Fraxinus angustifolia*) gefunden.<sup>[14]</sup> Nach der Infektion verursacht der Pilz ein Welken der Blätter, Absterben der Krone, nekrotische Wundmale in der Rinde, und eine Verfärbung des Holzes.<sup>[15]</sup> Eine kleine, aber evolutionär wichtige Subpopulation der Esche scheint gegen den Pilz resistent zu sein, es ist aber unklar, ob diese Subpopulation groß genug ist, um den akuten Kollaps der Eschenwälder zu verhindern und das Überleben der Spezies zu sichern.<sup>[16]</sup> Das Pathogen *H. pseudoalbidus* und seine avirulente Geschwisterspezies *H. albidus* sind morphologisch fast identisch, sie können aber auf DNA-Ebene unterschieden werden. Epidemiologische Studien<sup>[17]</sup> sowie Untersuchungen an Proben aus Herbarien legen nahe, dass *H. albidus* langsam von *H. pseudoalbidus* verdrängt wird,<sup>[18]</sup> wobei der evolutionäre Vorteil des Pathogens unklar bleibt. Es ist nur wenig über den Sekundärmetabolismus von *H. pseudoalbidus* bekannt, dessen Kenntnis aber ein Schlüssel zum Verständnis der Pathogenität bieten kann. Die bisher charakterisierten Sekundärmetabolite, die aus Kulturextrakten von *H. pseudoalbidus* isoliert worden sind, umfassen Viridiol (**1**, Abbildung 1), Viridin (**2**) und mehrere dem Viridin verwandte Furanosteroide.<sup>[12,13,19]</sup> Während Viridiol sich in Blattsegmenttests als phytotoxisch gegen *F. excelsior* erwies,<sup>[12]</sup> zeigten spätere Untersuchungen, dass die Konzentration dieses Metaboliten in Kulturextrakten individueller Isolate von *H.*

[\*] Dr. C. A. Citron, Priv.-Doz. Dr. J. S. Dickschat  
Institut für Organische Chemie  
Technische Universität Braunschweig  
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)  
E-Mail: j.dickschat@tu-braunschweig.de

Dr. C. Junker, Priv.-Doz. Dr. B. Schulz  
Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig  
Spielmannstraße 7, 38106 Braunschweig (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft mit einem Emmy-Noether-Stipendium (DI1536/1-3) und einem Heisenberg-Stipendium (DI1536/4-1) sowie durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt mit einem Promotionsstipendium (an C.J.) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201402290> zu finden.



**Abbildung 1.** Strukturen der bekannten Phytotoxine Viridiol (**1**) und Viridin (**2**).

*pseudoalbidus* nicht mit dessen variabler Virulenz korreliert.<sup>[13]</sup>

Daher ist die Beteiligung anderer Sekundärmetabolite vermutlich wichtiger für die Virulenz des Pathogens. Nur die vollständige chemische Charakterisierung bisher unidentifizierter Sekundärmetabolite aus *H. pseudoalbidus* und ihre Bereitstellung durch Fermentation oder Synthese werden es ermöglichen, ihre Funktionen in der Interaktion von Pflanze und Pathogen zu evaluieren. Dies wiederum wird Untersuchungen ermöglichen, wie das Pathogen kontrolliert werden kann.<sup>[3,4]</sup> Wir haben jüngst Arbeiten mit einem komplementären Ansatz begonnen, in denen nicht flüchtige Sekundärmetabolite aus Flüssigkulturextrakten und flüchtige Verbindungen aus Headspace-Extrakten studiert werden. Ein interessantes Ergebnis war die Identifizierung von Hymenoseitin, einem neuen 3-Decalinoyltetransäure-Antibiotikum aus *H. pseudoalbidus*,<sup>[20]</sup> allerdings scheint diese Verbindung keine Rolle für die Pathogenität zu spielen. Wir berichten hier über die Identifizierung, Synthese und Bioaktivität einer Serie flüchtiger Lactone, die von *H. pseudoalbidus* emittiert werden und toxisch gegen *F. excelsior* sind.

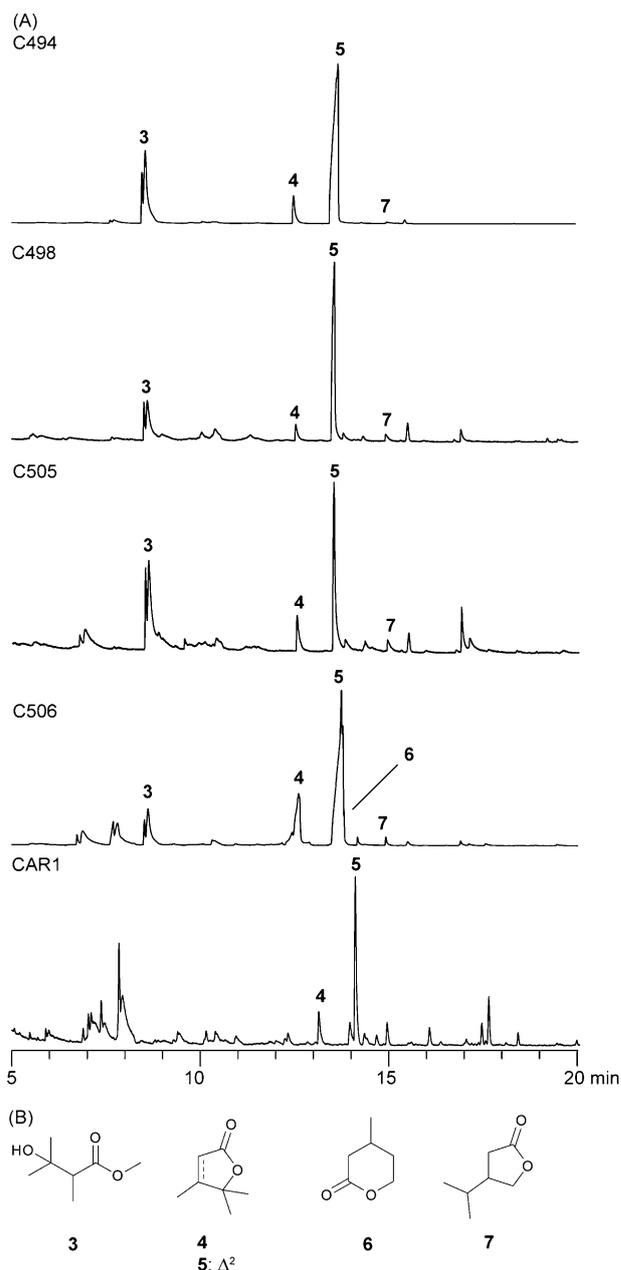
Um das Spektrum flüchtiger Sekundärmetabolite zu untersuchen, das von *H. pseudoalbidus* emittiert wird, wurden Agarplatten-Kulturen von vier Stämmen von *H. pseudoalbidus* (C494, C498, C505 und C506), die aus infizierten Eschen in einer Baumschule in Ellerhoop (Deutschland) isoliert worden sind, mit Hilfe eines Closed-Loop-Stripping-Apparates (CLSA) in Kombination mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert.<sup>[21,22]</sup> Die Methode basiert auf einem zirkulierenden Luftstrom in einem geschlossenen System, der über eine biologische Probe wie eine mikrobielle Kultur und anschließend durch einen Aktivkohlefilter geleitet wird, um die von der Probe abgegebenen flüchtigen Verbindungen aufzufangen. Nach Elution mit einem Lösungsmittel wird ein konzentrierter Duftstoffextrakt erhalten, der direkt per GC/MS analysiert werden kann. Die Virulenz aller vier Stämme wurde in Pathogenitätstests durch Infektion axenischer Sämlinge von *F. excelsior* bestätigt (Tabelle 1).<sup>[13]</sup>

Zum Vergleich wurde auch ein Isolat der avirulenten Spezies *H. albidus* (CAR1) aus der Camargue in Frankreich studiert. Repräsentative Chromatogramme der Headspace-Extrakte aller fünf Stämme sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Bouquets werden von fünf Komponenten dominiert, für

**Tabelle 1:** Pathogenitätstest mit *H. albidus* und *H. pseudoalbidus*.

Isolat	Asymptomatisch <sup>[a]</sup> [%]	Symptomatisch <sup>[a]</sup> [%]	Tot <sup>[a]</sup>
Kontrolle	100	0	0
C494	25.0	62.5	12.5
C498	0	50.0	50.0
C505	37.5	50.0	12.5
C506	12.5	75.0	12.5
CAR1	100	0	0

[a] In jedem Experiment wurden acht individuelle axenische Sämlinge von *F. excelsior* mit einem Stamm von *H. pseudoalbidus* (C494–C506) oder mit *H. albidus* (CAR1) infiziert. Im Kontrollexperiment erfolgte keine Infektion. Die Tabelle listet die gefundenen prozentualen Anteile asymptomatischer, symptomatischer (nekrotische Wundmale) und toter Sämlinge auf.



**Abbildung 2.** Identifizierung der Duftstoffe von *H. pseudoalbidus* und *H. albidus*: A) Totalionenstromchromatogramm von CLSA-Headspace-Extrakten von fünf individuellen Isolaten (*H. pseudoalbidus* Stämme C494, C498, C505 und C506 sowie *H. albidus* CAR1); B) Strukturen der Duftstoffe.

die auf Basis der Massenspektren (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen) die Strukturen des Methylesters **3** und der Lactone **4–7** vorgeschlagen wurden. Die Strukturen wurden durch Vergleich mit synthetischen Referenzverbindungen (Hintergrundinformationen) bestätigt.<sup>[23–25]</sup> Derselbe Satz an Verbindungen wurde in zwölf von 16 weiteren Isolaten von *H. pseudoalbidus* identifiziert, während die Verbindungen von vier Isolaten nicht produziert wurden (Hintergrundinformationen).

Mit den synthetischen Verbindungen in der Hand wurde ein initialer Biotest durchgeführt, um die Aktivitäten gegen *F.*



zentrationen zwischen 100 nM und 1 nM inhibierten nur das Racemat und das reine (*R*)-**4** die Keimung, während das (*S*)-Enantiomer inaktiv war. Zum Vergleich wurde die keimungshemmende Wirkung von **4** auch gegen *Ocimum basilicum*, einem Vertreter derselben Pflanzenordnung wie *F. excelsior* (Lamiales), getestet. Es zeigten sich keine negativen Auswirkungen auf die Keimentwicklung, was die Interaktion von **4** mit einem spezifischen Target, das auf *F. excelsior* beschränkt ist, untermauert.

Die keimungshemmende Wirkung von **4** steht im Gegensatz zur gut untersuchten keimungsfördernden Wirkung der Karrikine, einer Klasse von Butenoliden, die im Rauch verbrennenden Pflanzenmaterials zu finden sind.<sup>[27,28]</sup> Obwohl das molekulare Target von **4** unbekannt ist, hat dieses Lacton wahrscheinlich maßgeblichen Anteil an der Pathogenität von *H. pseudoalbidus* gegen die Esche. Allerdings sind vermutlich noch weitere Pathogenitätsfaktoren relevant, da **4** in einigen der pathogenen Isolate von *H. pseudoalbidus* nicht detektiert werden konnte.

Der Umstand, dass **4** ebenfalls von einem nicht-pathogenen *H. albidus* Kontrollstamm produziert wird, scheint zunächst gegen dessen Rolle als Virulenzfaktor zu sprechen, allerdings wurde die Bioaktivität in Bezug auf die Keimungshemmung und Nekrosenbildung in Pflanzengewebe eindeutig nachgewiesen. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte eine unterschiedliche Regulation der Produktion von **4** in infizierten Pflanzen sein, die möglicherweise durch einen Sekundärmetaboliten oder einen ähnlichen Faktor von *F. excelsior* beeinflusst wird. Dies würde bedeuten, dass das biosynthetische Potential des Virulenzfaktors **4** sowohl in *H. albidus* als auch in *H. pseudoalbidus* angelegt wäre, der Biosyntheseweg aber lediglich in dem invasiven Pathogen, und zugleich nicht notwendigerweise in allen virulenten Stämmen von *H. pseudoalbidus* in Laborkultur aktiv wäre. Der Einfluss eines Pflanzenfaktors auf die Pathogenität des Pilzes würde außerdem erklären, warum *H. pseudoalbidus* nicht pathogen gegenüber der Japanischen Esche (*Fraxinus mandshurica*) ist und warum Individuen von *F. excelsior* vergleichsweise resistent sind.

Die Interaktion von **4** mit spezifischen Targets in endophytischen Mikroorganismen der Gemeinen Esche ist ebenso denkbar, in Analogie zu der kürzlich berichteten Interaktion der Karrikine mit bakteriellen Quorum-Sensing-Systemen.<sup>[29]</sup> Durch einen solchen Mechanismus könnten Endophyten als Mediatoren zwischen der Pflanze und ihrem Pathogen fungieren. In der Zusammenfassung sind unsere Erkenntnisse relevant, da sie die Grundlage für Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Virulenzfaktors aus *H. pseudoalbidus* und für das Auffinden des molekularen Targets legen. Weiterhin ist es nun möglich, in zukünftigen Studien die Resistenzmechanismen in *F. mandshurica* und Individuen von *F. excelsior* zu adressieren. Die Identifizierung von 3,4-Dimethylpentan-4-olid als Virulenzfaktor von *H. pseudoalbidus* wird hoffentlich den Weg für die Kontrolle eines Pathogens,

das zur Zeit die gesamte Population von *Fraxinus excelsior* in Europa bedroht, freimachen.

Eingegangen am 11. Februar 2014  
Online veröffentlicht am 18. März 2014

**Stichwörter:** Eschensterben · *Fraxinus excelsior* · *Hymenoscyphus pseudoalbidus* · Lactone · Phytopathogene

- [1] Y.-J. Zhao, T. Hosoya, H.-O. Baral, K. Hosaka, M. Kakishima, *Mycotaxon* **2012**, *122*, 25–41.
- [2] T. Kowalski, *For. Path.* **2006**, *36*, 264–270.
- [3] T. Kowalski, O. Holdenrieder, *For. Path.* **2009**, *39*, 304–308.
- [4] V. Queloz, C. R. Grünig, R. Berndt, T. Kowalski, T. N. Sieber, O. Holdenrieder, *For. Path.* **2011**, *41*, 133–142.
- [5] K. Przybyl, *For. Path.* **2002**, *32*, 387–394.
- [6] J. P. Skovsgaard, I. M. Thomsen, I. M. Skovgaard, T. Martinussen, *For. Path.* **2010**, *40*, 7–18.
- [7] J. Schumacher, A. Wulf, S. Leonhard, *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienstes* **2007**, *59*, 121–123.
- [8] E. Halmschlager, T. Kirisits, *Plant Pathol.* **2008**, *57*, 1177.
- [9] R. Bakys, R. Vasaitis, P. Barklund, I. M. Thomsen, J. Stenlid, *Eur. J. For. Res.* **2009**, *128*, 51–60.
- [10] L. Jankovsky, O. Holdenrieder, *Plant Prot. Sci.* **2009**, *45*, 74–78.
- [11] I. Szabó, *Plant Pathol.* **2009**, *58*, 797.
- [12] P. F. Andersson, S. B. K. Johansson, J. Stenlid, A. Broberg, *For. Path.* **2010**, *40*, 43–46.
- [13] C. Junker, F. Mandey, A. Pais, R. Ebel, B. Schulz, *For. Path.* **2014**, *44*, 39–44.
- [14] T. Kirisits, M. Matlakova, S. Mottinger-Kroupa, E. Halmschlager, F. Lakatos, *Plant Pathol.* **2010**, *59*, 411.
- [15] T. Kowalski, O. Holdenrieder, *For. Path.* **2009**, *39*, 1–7.
- [16] L. V. McKinney, L. R. Nielsen, J. K. Hansen, E. D. Kjær, *Heredity* **2011**, *106*, 788–797.
- [17] C. Husson, B. Scala, O. Caël, P. Frey, N. Feau, B. Marçais, *Eur. J. Plant Pathol.* **2011**, *130*, 311–324.
- [18] L. V. McKinney, I. M. Thomsen, E. D. Kjær, S. B. K. Bengtsson, L. R. Nielsen, *Fungal Ecol.* **2012**, *5*, 663–669.
- [19] P. F. Andersson, S. Bengtsson, M. Cleary, J. Stenlid, A. Broberg, *Phytochemistry* **2013**, *86*, 195–200.
- [20] S. Halecker, F. Surup, E. Kuhnert, K. I. Mohr, N. L. Brock, J. S. Dickschat, C. Junker, B. Schulz, M. Stadler, *Phytochemistry* **2014**, *100*, 86–91.
- [21] C. A. Citron, S. M. Wickel, B. Schulz, S. Draeger, J. S. Dickschat, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6636–6646.
- [22] J. S. Dickschat, S. C. Wenzel, H. B. Bode, R. Müller, S. Schulz, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 778–787.
- [23] G. Hughes, M. Kimura, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11253–11258.
- [24] V. Jäger, H. J. Günther, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 2543–2546.
- [25] E. Guntrum, W. Kuhn, W. Spönlein, V. Jäger, *Synthesis* **1986**, 921–925.
- [26] S. Beszant, E. Giannini, G. Zanoni, G. Vidari, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3958–3968.
- [27] G. R. Flematti, E. L. Ghisalberti, K. W. Dixon, R. D. Trengove, *Science* **2004**, *305*, 977.
- [28] D. C. Nelson, G. R. Flematti, E. L. Ghisalberti, K. W. Dixon, S. M. Smith, *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2012**, *63*, 107–130.
- [29] A. Mandabi, H. Ganin, P. Krief, J. Rayo, M. M. Meijler, *Chem. Commun.* **2014**, DOI: 10.1039/c3cc47501h.