

Transformationen von *trans*-2-Hexenal durch *Botrytis cinerea* PERS. als Entgiftungsmechanismen

Transformations of *trans*-2-Hexenal by *Botrytis cinerea* PERS. as Detoxification Mechanisms

Irene Urbasch

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

Z. Naturforsch. **42c**, 64–68 (1987); received August 26/November 12, 1986

Botrytis cinerea, *tr*-2-Hexenal Conversion, Biological Activity, Detoxification

The metabolism of *trans*-2-hexenal – one of the main components of plant wound gases with antibiotic activity – was investigated for 5 different isolates of *Botrytis cinerea* PERS. The transformation products as well as the kinetics of their formation were analyzed.

Isolates exclusively mycelium forming (Bc 1 and Bc 13) transformed *tr*-2-hexenal into *tr*-2-hexenol, while sporulating isolates (Bc 3, Bc 9 and Bc 10) converted *tr*-2-hexenal to hexanol-1.

Basically the metabolism of *tr*-2-hexenal proceeded in the same way via the aqueous phase as in the gas phase.

The transformation products *tr*-2-hexenol and hexanol-1 showed significantly lower toxicity against the tested *B. cinerea* isolates than *tr*-2-hexenal. In each isolate the end product of *tr*-2-hexenal conversion had the weakest inhibitory activity. The transformation reactions thus represent detoxification mechanisms for these fungi.

Einleitung

Der ungesättigte, aliphatische Aldehyd *trans*-2-Hexenal stellt eine wesentliche Komponente pflanzlicher „Wundgase“ dar, die nach mechanischer Verletzung von Pflanzengewebe aus Vorläufern neu synthetisiert und als flüchtige Verbindungen freigesetzt werden [1–8].

Trans-2-Hexenal kann die „Wundheilung“ von Pflanzen beschleunigen [9, 10] und besitzt antibakterielle sowie antimykotische Aktivität [9–11, 13], so daß zumindest eine lokale Schutz- und Abwehrfunktion dieser Substanz gegenüber phytopathogenen Mikroorganismen wahrscheinlich ist.

Über die Wirkung von *tr*-2-Hexenal in direktem Zusammenhang mit dessen Metabolismus durch phytopathogene Pilze ist bisher nur wenig bekannt [12, 14, 15].

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand darin, den ubiquitären, wirtsunspezifischen Erreger des Grauschimmels *Botrytis cinerea* PERS. im Hinblick auf dessen Reaktion nach Einwirkung der Wundgaskomponente *tr*-2-Hexenal zu testen sowie die Fähigkeit dieses Pilzes *tr*-2-Hexenal zu metabolisieren.

Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

1) Kann *B. cinerea* *tr*-2-Hexenal metabolisieren?

- 2) Welche Transformationsprodukte entstehen dabei?
- 3) Inwieweit handelt es sich bei einer nachweisbaren Transformation um einen Entgiftungsmechanismus, d. h. besitzen die Transformationsprodukte im Vergleich zur Ausgangssubstanz *tr*-2-Hexenal eine geringere Toxizität gegenüber *B. cinerea*?

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an 5 verschiedenen Isolaten von *Botrytis cinerea* PERS. durchgeführt: Bc 1 (von *Lactuca sativa* L. isoliert), Bc 3 (von *Fragaria vesca* L. isoliert), Bc 9 (CBS 144.55), Bc 10 (CBS 124.58) und Bc 13 (CBS 146.61).

Metabolisierung von *trans*-2-Hexenal durch *B. cinerea*

Für die Transformationsversuche wurden Flüssigkulturen in 250 ml-Erlenmeyerkolben mit je 15 ml einprozentiger Biomalzlösung angelegt. Die Nährlösung wurde fraktioniert, an drei aufeinanderfolgenden Tagen, für 20 Minuten bei 100 °C sterilisiert. Nach der Sterilisation betrug der pH-Wert 5,4 (1. Versuchsserie) bzw. wurde in einer 2. Versuchsserie auf pH 4,0 gepuffert. Zur Inokulation wurden Mycelimpfstücke (1 cm Ø) aus 7 Tage alten Vorkulturen der 5 *B. cinerea*-Isolate von Biomalz-Agarplatten (1% Malzextrakt, 2% Agar) verwendet.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/87/0100-0064 \$ 01.30/0

 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.

Nach 4 Tagen Wachstum als Flüssigstandkulturen bei einer Standardtemperatur von 22 °C wurde mit einer Mikroliterspritze *trans*-2-Hexenal (FLUKA) als einprozentige ethanolische Lösung in einer Ausgangskonzentration von $6,8 \times 10^{-4}$ M zugesetzt.

Parallel zu diesen Transformationskulturen (a) wurden Kontrollkulturen (b) (mit *B. cinerea* beimpft, aber ohne Testsubstanz) angesetzt, um die von den Pilzen eventuell selbst synthetisierten flüchtigen Stoffe zu berücksichtigen. Außerdem wurden Blindversuche (c) (ohne Beimpfung, aber mit Testsubstanz) angelegt, um zu prüfen, ob ohne Beteiligung der Pilze Veränderungen der Testsubstanz auftraten. Ferner wurde die Nährlösung (d) (ohne Beimpfung und ohne Testsubstanz) auf flüchtige Verbindungen getestet.

Von diesen Versuchsansätzen (a–d) wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (sofort nach Ansatz, 1, 2, 3, 4, 7 und 10 Tage) jeweils 8 Kolben entnommen, der pH-Wert der Medien bestimmt und die wasserdampfflüchtigen Stoffe gewonnen. Dazu wurden die Kulturen einer Kreislauf-Wasserdampfdestillation mit der modifizierten „Karlsruher Apparatur“ [16] unterzogen. Die Destillationsbedingungen wurden folgendermaßen standardisiert: Destillationsgefäß: 2 l-Rundkolben, Destillationsgut: je 8 Kulturen + 500 ml Aqua dest., Destillationsmilieu: a) bei den ungepufferten Kulturmedien wie zum jeweiligen Kulturerntezeitpunkt vorliegend (vergl. Tab. II), b) bei den gepufferten Kulturmedien pH 4,0, Destillationszeit: 3 Stunden, Destillationsgeschwindigkeit: 3,5 ml/Minute, Vorlage von 1 ml Pentan p.a., Nachspülen mit 1 ml Pentan p.a.

Nach der Destillation wurde das Myceltröckengewicht als Maß für das Pilzwachstum bestimmt. Dazu wurden die Pilzmycelien jeweils eines Versuchsansatzes (8 Kulturen) über ein bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes, vorgewogenes Filterpapier abgequetscht und bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz (± 1 mg) getrocknet.

Die Analyse der Destillate erfolgte gaschromatographisch an Säulen unterschiedlicher Polarität (Carbowax 20M, SE-30) durch Retentionszeitenvergleich und Cochromatographie mit authentischen Substanzen sowie durch GC-MS-Kopplung wie zuvor beschrieben [17].

In zusätzlichen Versuchsserien (den *tr*-2-Hexenal-Transformationsversuchen entsprechend angelegt) wurde untersucht, inwieweit *B. cinerea* die identifizierten Transformationsprodukte *trans*-2-Hexenol

und Hexanol-1 nach separater, externer Applikation um- oder abbauen kann (*tr*-2-Hexenol: ROTH, Hexanol-1: FLUKA).

Ferner wurde überprüft, ob *tr*-2-Hexenal bei vorwiegender Einwirkung über die Gasphase anders von *B. cinerea* metabolisiert wird als nach direkter Applikation in die Nährlösung und somit überwiegender Wirkung über die wäßrige Phase. Dazu wurden Versuchsansätze hergestellt, in denen die Testsubstanz auf 2 × 2 cm große Filterpapierstückchen aufgegeben wurde, die zuvor mit autoclave tape an der Innenwand der Erlenmeyerkolben festgeklebt und mitsterilisiert worden war.

Eine möglicherweise erhöhte Verdunstungsrate von *tr*-2-Hexenal durch Wärmeentwicklung infolge der Stoffwechselaktivität der Pilze in den Transformationskulturen im Vergleich zu den Blindversuchen wurde in exemplarischen Parallelversuchsansätzen bei 25 °C, d.h. 3 °C über der Standardtemperatur von 22 °C, getestet (jeweils 1 und 10 Tage Inkubation nach Testsubstanz-Applikation).

Toxizität von *trans*-2-Hexenal und dessen Transformationsprodukten für *B. cinerea*

Die Toxizitätsprüfungen wurden an Agarplattenkulturen (2% Malzextrakt, 2% Agar) vorgenommen. Beimpft wurde mit Mycelstücken (\varnothing 0,5 cm) aus 7 Tage alten Vorkulturen. Die bei Zimmertemperatur flüssigen, leicht flüchtigen Verbindungen *trans*-2-Hexenal (FLUKA), *trans*-2-Hexenol (ROTH) und Hexanol-1 (FLUKA) wurden als Reinstsubstanzen mit einer Mikroliterspritze auf Rundfilter in den Petrischalendeckeln appliziert, wie zuvor beschrieben [13]. Die Schalen wurden einzeln versiegelt [13] und 5 Tage bei 22 °C im Dauer dunkeln kultiviert. Als Parameter für die antimykotische Aktivität der Testsubstanzen diente der radiale Oberflächenmycelzuwachs der Pilze.

Resultate und Diskussion

Metabolisierung von *trans*-2-Hexenal durch *B. cinerea*

Alle 5 *B. cinerea*-Isolate waren in der Lage *tr*-2-Hexenal zu metabolisieren, jedoch auf unterschiedliche Weise. Bc 1 und Bc 13 (beides reine Mycel-Kulturtypen, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Konidien bildeten) transformierten *tr*-2-Hexenal durch Reduktion der Aldehydgruppe zum

Tab. I. Transformation von *tr*-2-Hexenal durch 5 verschiedene *B.-cinerea*-Isolate 1 Tag nach Zusatz von *tr*-2-Hexenal (vgl. Material und Methoden). M = Mycel; S = Sporen; a = relative Flächeneinheiten der detektierten Gaschromatogramm-peaks.

<i>B.-cinerea</i> -Isolat	Kulturtyp	Myceltrockengewicht (g/8 Kulturen)	pH-Wert des ungepufferten Kulturmediums	Konzentration (rel. FE ^a /8 Kulturen)		
				Restmenge <i>tr</i> -2-Hexenal	Transformationsprodukte Hexanol-1	<i>tr</i> -2-Hexenol
Bc 1	M	0,1806	4,0	5162 ± 61	0	20736 ± 144
Bc 3	M + S	0,2160	3,7	5899 ± 76	11920 ± 92	0
Bc 9	M + S	0,1430	3,7	4736 ± 59	8896 ± 45	0
Bc 10	S	0,2151	3,4	5506 ± 72	6692 ± 22	0
Bc 13	M	0,2601	3,1	4758 ± 60	0	13634 ± 84

ungesättigten Alkohol *tr*-2-Hexenol (Tab. I). Diese Umsetzung erfolgte sehr schnell. Bereits innerhalb von 24 Stunden nach *tr*-2-Hexenal-Zusatz war die maximale Menge des Transformationsproduktes *tr*-2-Hexenol zu verzeichnen, die mit fortschreitender Kulturdauer abnahm (vergl. Tab. IIa). *tr*-2-Hexenol stellte das einzige Transformationsprodukt dar.

Bei Bc 10 (Kulturtyp mit intensiver Sporulation), Bc 3 und Bc 9 (Kulturmischtypen mit mäßiger My-

cel- und Sporenbildung) verlief die Metabolisierung von *tr*-2-Hexenal anders: hier konnte zu keinem Versuchszeitpunkt *tr*-2-Hexenol nachgewiesen werden, sondern ausschließlich Hexanol-1 (Tab. I), und zwar ebenfalls bereits 24 Stunden nach *tr*-2-Hexenal-Zusatz in maximaler Konzentration. Außer Hexanol-1 entstand kein weiteres Transformationsprodukt.

Den Blindversuchen (*tr*-2-Hexenal in Biomalzlösung) zufolge lief die Umsetzung von *tr*-2-Hexenol zu

Tab. II. Kinetik zur Transformation von *tr*-2-Hexenal durch Bc 1 (a) und entsprechende Blindversuche (b).

a) *Transformationsversuche* (Biomalz-Nährlösung + Bc 1 + *tr*-2-Hexenal)

Zeit nach Zusatz von <i>tr</i> -2-Hexenal (Tage)	Myceltrockengewicht (g/8 Kulturen)	pH-Wert des ungepufferten Kulturmediums	Konzentration (rel. FE ^a /8 Kulturen)	Restmenge <i>tr</i> -2-Hexenal	Transformationsprodukte Hexanol-1	<i>tr</i> -2-Hexenol
0 (sofort nach Zusatz)	0,1632	4,25	280854 ± 366	0	0	
1	0,1806	4,0	5162 ± 61	0	20736 ± 144	
2	0,2271	3,3	4394 ± 63	0	10987 ± 107	
3	0,2947	3,4	3691 ± 65	0	2322 ± 76	
4	0,3028	3,6	3221 ± 73	0	139 ± 22	
7	0,3917	4,9	2899 ± 51	0	0	
10	0,3967	4,9	2632 ± 58	0	0	

b) *Blindversuche* (Biomalz-Nährlösung + *tr*-2-Hexenal)

Zeit nach Zusatz von <i>tr</i> -2-Hexenal (Tage)	pH-Wert des ungepufferten Kulturmediums	Konzentration (rel. FE ^a /8 Kulturen)	Restmenge <i>tr</i> -2-Hexenal	Hexanol-1	<i>tr</i> -2-Hexenol
0	5,4	280944 ± 381	0	0	
1	5,4	239522 ± 332	0	0	
2	5,4	41422 ± 205	0	0	
3	5,4	24479 ± 136	0	0	
4	5,4	17003 ± 121	0	0	
7	5,4	11551 ± 95	0	0	
10	5,4	7363 ± 79	0	0	

^a = relative Flächeneinheiten der detektierten Gaschromatogramm-peaks.

tr-2-Hexenol bzw. Hexanol-1 nicht ohne die Mitwirkung von *B. cinerea* ab.

Den Kontrollversuchen (*B. cinerea* in Biomalzlösung) entsprechend entstand auch kein *tr*-2-Hexenol bzw. Hexanol-1 durch die alleinige Syntheseleistung der Pilze, ohne Testsubstanz-Applikation.

Die Nährlösung (Biomalzlösung) wies gar keine flüchtigen C₆-Verbindungen auf.

Die in den Transformationsversuchen (*B. cinerea* in Biomalzlösung + *tr*-2-Hexenal) identifizierten Substanzen *tr*-2-Hexenol bzw. Hexanol-1 waren also durch die Stoffwechselaktivität der Pilze aus der Testsubstanz *tr*-2-Hexenal gebildet worden.

Dabei bestand nach den vorliegenden Untersuchungen an den 5 verschiedenen *B. cinerea*-Isolaten eine deutlich ausgeprägte positive Korrelation zwischen der Transformationsreaktion von *tr*-2-Hexenal zu *tr*-2-Hexenol und dem Kulturtyp der reinen Mycelbildner (Bc 1 und Bc 13) sowie zwischen der Umsetzung von *tr*-2-Hexenal zu Hexanol-1 und den sporulierenden Pilzisolaten (Bc 3, Bc 9 und Bc 10). Da jedes Isolat sowohl in den Kontrollkulturen als auch in den Transformationskulturen den unter den beschriebenen Bedingungen charakteristischen Kulturtyp besaß, konnten die entstandenen Transformationsprodukte nicht den Kulturtyp bestimmt haben, sondern in der vegetativen Entwicklungsphase der Pilze lag offensichtlich – wie für zahlreiche Beispiele bekannt – eine andere Stoffwechselleage vor als in der Sporulationsphase.

Während der Transformationsprozesse fand eine Abnahme der zugesetzten *tr*-2-Hexenal-Ausgangskonzentration statt (Tab. IIa), die zum einen auf den oben dargestellten Umsetzungsreaktionen beruhte. Da aber nicht in gleichem Maße wie die Verminderung der Testsubstanzmenge die Transformationsprodukte akkumuliert wurden, handelte es sich um keine vollständige Transformation. Vielmehr war die Testsubstanzabnahme außerdem auf Verdunstungsverluste zurückzuführen, wie aus einem Vergleich mit den Blindversuchen ersichtlich ist (Tab. IIb).

Darüber hinaus war wahrscheinlich zusätzlich eine Verstoffwechselung der Transformationsprodukte durch die Pilze erfolgt, denn die Testsubstanzabnahme in den Transformationskulturen verlief wesentlich schneller als durch Transformation und Verdunstungsverlust allein erklärbar.

Einen weiteren Hinweis auf eine erfolgte Verstoffwechselung lieferten die Versuchsserien, in denen

überprüft worden war, inwieweit *B. cinerea* separat zugesetztes *tr*-2-Hexenol bzw. Hexanol-1 umwandeln kann: nach Applikation dieser beiden Alkohole nahmen deren Ausgangskonzentrationen schneller als in den entsprechenden Blindversuchen ab, wobei keine neuen Umsetzungsprodukte entstanden.

Über eine Verstoffwechselung können aber erst zukünftige Markierungsexperimente mit Radioisotopen endgültig Aufschluß geben.

Eine möglicherweise erhöhte Verdunstungsrate der Testsubstanz *tr*-2-Hexenal durch eine geringfügige Erwärmung der Transformationskulturen im Vergleich zu den Blindversuchen infolge der Stoffwechselaktivität der Pilze konnte in den Temperaturversuchen (vergl. Material und Methoden) ausgeschlossen werden.

Nach Einwirkung von *tr*-2-Hexenal über die Gasphase waren im Vergleich zur direkten Applikation in die Nährösung keine prinzipiellen Unterschiede hinsichtlich des oben dargestellten *tr*-2-Hexenal-Metabolismus festzustellen, ebensowenig bei Verwendung ungepufferter bzw. auf pH 4,0 eingestellter Nährösung.

Toxizität von *trans*-2-Hexenal und dessen Transformationsprodukten für *B. cinerea*

Die vergleichenden Untersuchungen zur Toxizität von *tr*-2-Hexenal und den von *B. cinerea* daraus gebildeten Transformationsprodukten *tr*-2-Hexenol bzw. Hexanol-1 ergaben, daß die Transformation für die Pilze in jedem Fall Entgiftungsreaktionen darstellten. Denn *tr*-2-Hexenol und Hexanol-1 besaßen eine signifikant schwächere Hemmwirkung gegenüber *B. cinerea* als *tr*-2-Hexenal (Tab. III), dessen hohe Effektivität auf der reaktionsfähigen Doppelbindung in Konjugation zur Aldehydfunktion beruht.

Die geringste Toxizität wies bemerkenswerterweise jeweils das von den verschiedenen *B. cinerea*-Isolaten aus *tr*-2-Hexenal gebildete Transformationsprodukt auf. Die einzelnen Isolate wählten somit den für ihr eigenes Überleben am vorteilhaftesten Stoffwechselweg der Transformation.

Danksagung

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Unterstützung durch Sachbeihilfen.

Tab. III. Oberflächenmycelwachstum von *B. cinerea* nach gasförmiger Einwirkung von *tr*-2-Hexenal, Hexanol-1 und *tr*-2-Hexenol.

<i>B. cinerea</i> -Isolat	Oberflächenmycelwachstum (%) bezogen auf die Kontrolle = 100%)			
	<i>tr</i> -2-Hexenal 0,5 µl/Schale	Hexanol-1 5 µl/Schale	<i>tr</i> -2-Hexenol 5 µl/Schale	<i>tr</i> -2-Hexenol 5 µl/Schale
Bc 1	23,74 ± 1,34	0	76,76 ± 2,64	85,47 ± 3,62
Bc 3	76,31 ± 2,52	0	71,38 ± 1,20	59,43 ± 1,76
Bc 9	22,12 ± 2,21	0	44,25 ± 1,72	0
Bc 10	79,22 ± 1,21	0	57,65 ± 1,63	55,59 ± 1,70
Bc 13	90,50 ± 1,50	0	45,01 ± 1,22	81,14 ± 1,09

— = das von dem jeweiligen *B. cinerea*-Isolat aus *tr*-2-Hexenal gebildete Transformationsprodukt (vgl. Resultate I).

- [1] F. Drawert, W. Heimann, R. Emberger, and R. Tressl, Ann. Chem. **694**, 200 (1966).
- [2] E. F. Elstner, Biologie in unserer Zeit **8**, 82 (1978).
- [3] J. G. Gonzales, P. Coggon, and G. W. Sanderson, Journ. Food Sci. **37**, 797 (1972).
- [4] A. Hatanaka and T. Harada, Phytochemistry **12**, 2341 (1973).
- [5] A. Hatanaka, T. Kajiwara, and J. Sekiya, Phytochemistry **15**, 1125 (1976).
- [6] R. T. Major, D. D. Collins, P. Marchini, and H. W. Schnabel, Phytochemistry **11**, 607 (1972).
- [7] R. T. Major and M. Thomas, Phytochemistry **11**, 611 (1972).
- [8] I. Urbasch, Z. Naturforsch. **39c**, 1003 (1984).
- [9] H. Schildknecht und G. Rauch, Z. Naturforsch. **16b**, 422 (1961).
- [10] H. Schildknecht, Ang. Chem. **93**, 164 (1981).
- [11] R. T. Major, P. Marchini, and T. Sproston, J. Biol. Chem. **235**, 3298 (1960).
- [12] J. Moede, Diss. Hamburg (1985).
- [13] I. Urbasch, Diss. Hamburg (1982).
- [14] F.-K. Marcus, Diss. Hamburg (1978).
- [15] C. Vellnagel, Diss. Hamburg (1983).
- [16] E. Sprecher, Dtsch. Apoth. Ztg. **103**, 213 (1963).
- [17] I. Urbasch, Planta Med. **6**, 492 (1985).