

Trichoderma sp. und deren Produktion bioaktiver Peptide (Peptaibiotika) in kommerziellen biologischen Pflanzenschutzpräparaten

C. Krause, J. Kirschbaum, H. Brückner

Institut für Ernährungswissenschaft, Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ), Justus-Liebig-Universität, Gießen

Der biologische Pflanzenschutz stellt eine attraktive Alternative zur der Abhängigkeit der Agrarwirtschaft gegenüber chemischen Pestiziden und Fungiziden dar. Für eine Vielzahl der Phytopathogene existieren natürliche Antagonisten, somit ist in diesen Fällen ist eine biologische Schädlingsbekämpfung möglich.

Schimmelpilze nehmen eine besondere Stellung im biologischen Pflanzenschutz ein. So weisen die so genannten BCA (Biological Control Agents) unterschiedliche antagonistische Wirkungen gegen phytopathogene Pilze, Unkräuter und Insekten auf. Unter den Schimmelpilzen stellt die Gattung *Trichoderma* den Hauptanteil der eingesetzten BCA dar. Dabei weisen u.a. *T. asperellum*, *T. stromaticum* und *T. inharmatum* Einsatzmöglichkeiten im biologischen Pflanzenschutz auf. Für den biologischen Pflanzenschutz mit *Trichoderma*-Stämmen sind bereits einige Produkte (z.B. Promot, Trichosan, Vitalin) kommerziell erhältlich.

Ein Erklärungsansatz für die Wirkung der *Trichoderma*-Stämme ist die Bildung von sekundären Metaboliten wie z.B. antibiotische Polypeptide, wobei eine Untergruppe der Peptidantibiotika die Peptaibiotika darstellen. Diese sind definiert als natürlich vorkommende Peptide, welche die nicht-proteinogene Aminosäure α -Methylalanin (Aib) enthalten und eine antibiotische Wirkung aufweisen. Da die Peptaibiotika eine Vielzahl von biologischen Wirkungen entfalten, liegt die Vermutung nahe, dass diese Eigenschaften zum Pflanzenschutzpotential der Schimmelpilze beitragen. Deshalb war die Zielsetzung dieses Projektes die Untersuchung auf die Produktion von Peptaibiotika der in der Biokontrolle aktiven *Trichoderma*-Stämme und der kommerziell erhältlichen Pflanzenschutz-Präparate.

Methode

Zum Screening der Stämme bzw. Präparate wurden die Pilze auf Kartoffel-Glucose-Agar bei 24°C angezogen. Nach 6–10 Tagen wurden die vollbewachsenen Nähragarplatten mit einem Dichlormethan-Methanol-Gemisch (1/1, v/v) extrahiert und die enthaltenen Peptaibiotika durch eine Aufreinigung mittels Festphasenextraktion über eine RP18-Sep-Pak-Kartusche isoliert [1]. Der eingeeengte methanolische Extrakt wird für das Screening mittels HPLC und HPLC-ESI-MS eingesetzt. Die Auftrennung der Peptaibiotika erfolgte mittels Gradientenelution auf einer Kromasil KR100 RP-8-Säule (150 mm × 4,6 mm i.d., 3,5 µm Korngröße (EKA Chemicals, Bohus, Schweden) bei einer Säulentemperatur von 35°C [1]. Eluent A bestand aus einem Acetonitril/Methanol/Wasser-Gemisch (32/32/36, v/v/v), Eluent B aus einem Acetonitril/Methanol/Wasser-Gemisch (1/1, v/v). Beide Eluenten wurden mit Trifluoressigsäure auf eine Endkonzentration von 0,1% angesäuert. Zur Aufnahme der Elutionsprofile diente die UV-Detektion bei 205 nm, während die Detektion der Peptaibiotika unter Berücksichtigung des Vorkommens der AS Aib und einer möglichen partiellen Sequenzaufklärung mittels HPLC/ESI-MS gelang.

Ergebnisse

Die 3 Trichoderma-Stämme und 3 kommerziellen Präparate wurden auf das Vorhandensein von Peptaibiotika untersucht. In den Massenspektren der einzelnen Peptaibiotika können anhand der Massendifferenzen der Signale einzelne AS zugeordnet und Sequenzen herausgefunden werden. Dabei kann die Marker-AS Aib bei einer Massendifferenz von $m/z = 85$ zugeordnet werden. Aus den Massenspektren, die mit dieser Screeningmethode erhalten wurden, konnten 7 Sequenzen des Pilzes *Trichoderma asperellum* partiell aufgeklärt werden. Ein Vergleich dieser partiellen Teilsequenzen mit bereits bekannten Peptaibiotika aus der „Peptaibol-Database“ [2] lässt auf bekannte oder neue Peptaibiotika schließen. Zum Beispiel entspricht der aufgeklärte Bereich der Hauptsequenz Nr. 7 von *Trichoderma asperellum* dem Peptaibiotikum Trichotoxin A50I, für welches bereits fungizide Wirkungen nachgewiesen wurden. Auch in den beiden ebenfalls untersuchten Trichoderma-Stämmen und in den untersuchten Pflanzenschutzpräparaten konnte Aib detektiert und Partialstrukturen aufgeklärt werden. Daraus kann man auf einen Zusammenhang zwischen den gebildeten Peptaibiotika und der biologischen Aktivität bezüglich des Wirkungsmechanismus der Schimmelpilze gegen phytopathogene Pilze folgern.

Literatur

1. Krause C, Kirschbaum J, Brückner H (2006) Amino Acids in press
2. Whitmore L, Chugh JK, Snook CF and Wallace BA (2003) J Peptide Sci 9: 663–665