

Chemische Ökologie

Eintauchen in die Sprache der Pilze

MAARIA ROSENKRANZ, JÖRG-PETER SCHNITZLER

ABTEILUNG FÜR EXPERIMENTELLE UMWELTSIMULATION, INSTITUT FÜR BIOCHEMISCHE PFLANZENPATHOLOGIE, HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN, NEUHERBERG

Fungi produce a wide variety of volatile organic compounds (VOCs), chemical cues with central roles in mediating interspecific interactions. Here we present a platform consisting of 14 cuvettes and 2 types of mass spectrometers, that allows for the first time automated, real-time analysis of various microbial VOCs. We used this platform to comprehensively analyze the VOCs of 43 fungal species. The further computational analyses reveal fundamental links between VOCs and ecological functions of fungi.

DOI: 10.1007/s12268-022-1705-x
© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Pilze sind Schlüsselkomponenten in terrestrischen Ökosystemen und nehmen wesentliche Funktionen in globalen biogeochemischen Kreisläufen ein [1]. Die vielfältigen Beziehungen, die sie zu Pflanzen, Mikroben und anderen Organismen eingehen, beeinflussen die ökologischen Funktionen von Pilzen [1, 2]. Um solche Beziehungen zu

initiieren und zu regulieren, nutzen Pilze verschiedene Metabolite, darunter flüchtige organische Verbindungen (*volatile organic compounds*, VOCs). VOCs sind Verbindungen auf Kohlenstoffbasis, die aufgrund ihrer Flüchtigkeit in der Lage sind, durch die Atmosphäre und im Boden zu diffundieren [3].

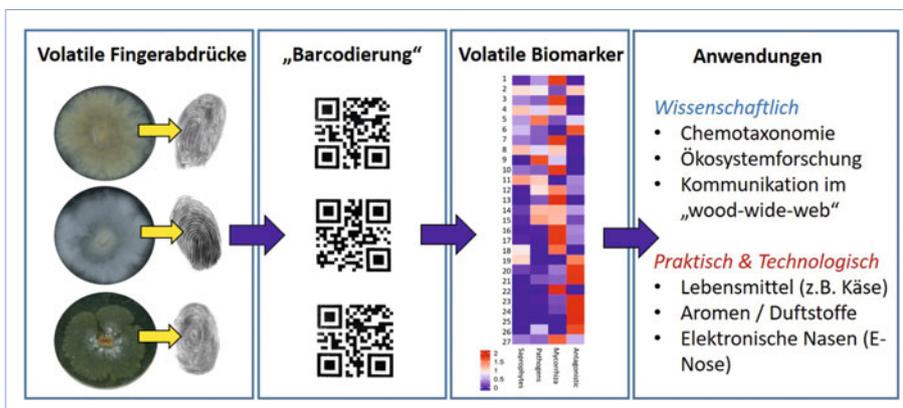


Abb. 1: Flüchtige Muster von Pilzen sind individuell wie Fingerabdrücke und können als Biomarker für Pilze verwendet werden. Reinkulturen von Pilzen emittieren charakteristische komplexe Muster an VOCs, die einzigartig sind. Die Muster und das Mischungsverhältnis der einzelnen Verbindungen können in einen Barcode/Fingerabdruck übersetzt werden. Unter Anwendung von maschinellem Lernen können daraus Biomarker identifiziert werden [5], die es ermöglichen, die Zugehörigkeit einer Art zu einer Nische oder Lebensform vorherzusagen. Die hier dargestellte Methode ist nicht auf Pilze beschränkt. Sie eröffnet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Grundlagenforschung, Lebensmittelherstellung und Überwachung wie auch im Gesundheitsbereich und der Innenraumüberwachung.

Pilze – eine unerforschte Quelle für flüchtige Metabolite

Pilzaromen sind zwar bekannte kulinarische Bestandteile vieler Speisen, doch der Wissenschaft wurde erst im letzten Jahrzehnt klar, welch riesige, unerforschte Quelle pilzliche VOCs darstellen [2]. Neben ihrer Verwendung bei der Artbestimmung, bei der Überwachung von Schimmelbelastung in Räumen, beim Kochen und in Lebensmitteln wie Käse sind Pilzaromen von entscheidender Bedeutung für die Biologie verschiedener Ökosysteme. Pilzliche VOCs können in anderen Arten Veränderungen in Wachstum, Fortpflanzung und Abwehr auslösen und darüber hinaus als Lockmittel für andere Organismen wirken [2, 3]. Aufgrund dieser kommunikationsähnlichen Eigenschaften werden VOCs manchmal auch als Sprache der Pilze bezeichnet.

Herausforderung: chemische Kommunikation von Pilzen

Die ganzheitliche Erfassung von VOC-Profilen ist eine Voraussetzung, um die Mechanismen der durch pilzliche VOCs vermittelten Kommunikation aufzuklären. Bisher wurden jedoch nur wenige Pilzarten systematisch untersucht [2, 4]. Da wir in unserer Forschungsgruppe über die notwendige Ausrüstung und das Wissen verfügen, haben wir uns der Herausforderung gestellt, die flüchtigen Fingerabdrücke verschiedener Pilzarten zu entziffern (Abb. 1). Unser Ziel war es, ein Hochdurchsatz(HTP)-System zu entwickeln, das die Echtzeitanalyse einer großen Anzahl von pilzlichen (wie auch mikrobiellen) Proben gleichzeitig ermöglicht.

Automatisierte Plattform screen pilzliche und mikrobielle Düfte

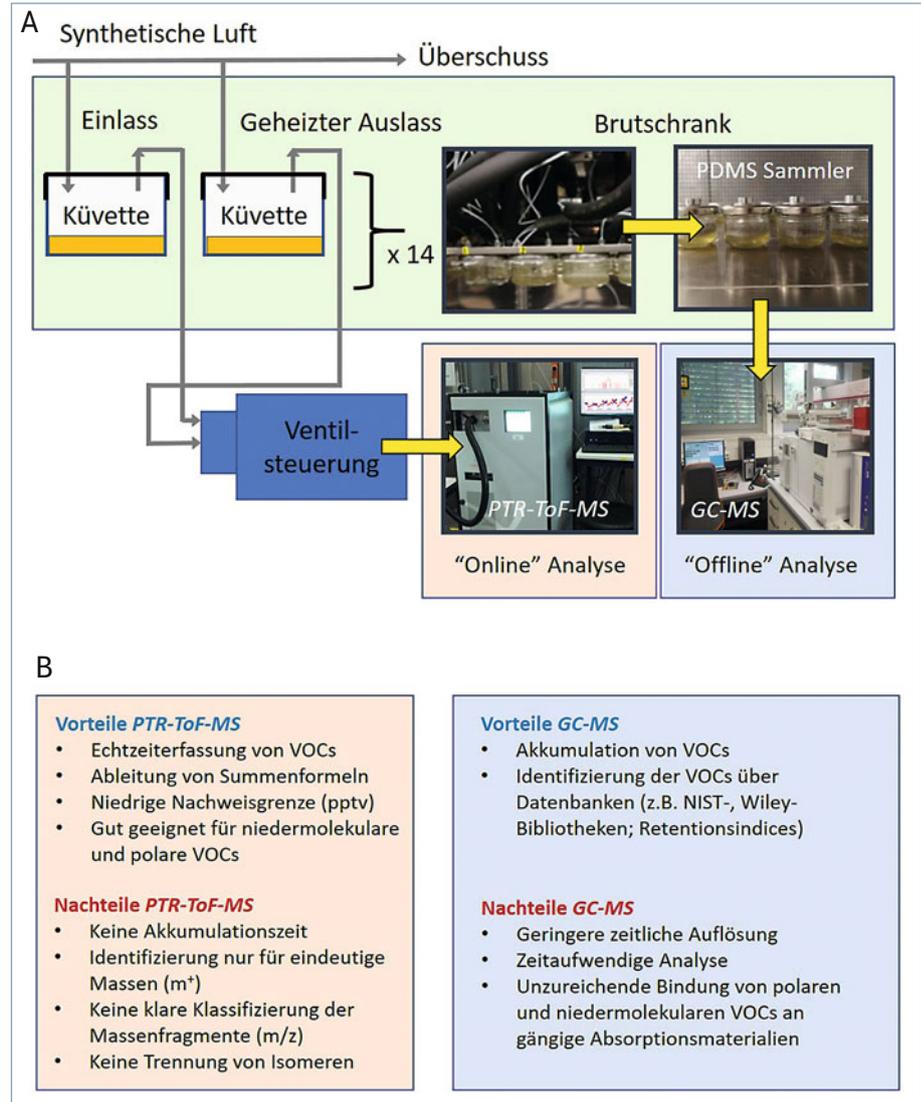
Die Arbeiten begannen mit dem Aufbau einer VOC-Screening-Plattform, die eine sequenzielle Echtzeitmessung von Proben ermöglicht. Die Plattform besteht aus einem automatisierten Küvetten-System und zwei Arten von Massenspektrometrie (Abb. 2). Die beiden massenspektrometrischen Methoden, Protonentransferreaktion-Flugzeit-Massenspektrometrie (PTR-ToF-MS) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wählten

wir, da sie sich gut ergänzen [5]. Zunächst werden die VOC-Emissionen mit dem PTR-ToF-MS gemessen. Dieses MS ermöglicht Echtzeitmessungen, um zeitliche Dynamiken mit sehr niedriger Nachweisgrenze zu erfassen. Das Online-MS erkennt besonders polare, niedermolekulare Verbindungen (**Abb. 2A**). Eine Ventilsteuerung (**Abb. 2A**) erlaubt das sequenzielle Vermessen der VOCs aus den Küvetten über einen beliebigen Zeitraum, im dargestellten Beispiel über 48 Stunden. Nach Abschluss der Online-Analysen werden die VOCs in der Gasphase der Küvetten mithilfe einer passiven Probennahmetechnik basierend auf den Adsorptionseigenschaften von Polydimethylsiloxan weiter gesammelt (**Abb. 2A**). Diese Proben werden dann durch GC-MS offline analysiert [5].

Der Vorteil von GC-MS gegenüber PTR-ToF-MS besteht darin, dass Isomere mit unterschiedlichen Massen über das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt werden können (**Abb. 2B**). Über den Vergleich von Molekülmassen und Fragmentmustern mit Spektrenbibliotheken können Verbindungen wie Sesquiterpene identifiziert werden, die eine hohe Isomerenvielfalt aufweisen. Bei der nicht zielgerichteten PTR-ToF-MS-Methode hingegen besteht die große Herausforderung vor allem in der Identifizierung der detektierten Massen [4, 5]. Hierbei helfen Veröffentlichungen sowie die mVOC-Datenbank [6], um Summenformeln zu bestimmen und bestimmte VOCs anhand ihrer charakteristischen m/z zu identifizieren.

Auswahl der Pilzarten

Um umfassende und valide Aussagen zu pilzlichen VOC-Mustern treffen zu können, haben wir repräsentative Pilzarten aus den drei Stämmen Ascomycota, Basidiomycota und Zygomycota ausgewählt. Wir achteten auch darauf, verschiedene ökologische Nischen (wie Nahrungsbeziehungen, Lebensstil, Substratnutzung und Wirtsarten) mit unserer Auswahl an Pilzen abzudecken [4]. Unsere Pilzauswahl umfasste solche Arten wie die Pflanzensymbionten Porphyrwulstling und Zweifarbigler Lacktrichterling, die Pflanzenpathogene Sparriger Schüppling und Schwarzschilder sowie verschiedene zersetzende Pilze, wie *Penicillium*-Arten. Frühere Studien zeigten, dass die VOC-Emission von Pilzen von verschiedenen Umweltbedingungen abhängt, wie dem Entwicklungsstadium und der Nährstoffverfügbarkeit [3, 5]. Um diese Einflüsse im vorliegenden Ver-



▲ **Abb. 2:** Systematische Analyse von VOC-Mustern von Pilzen. **A**, Schema eines Mehrfachküvetten-systems gekoppelt mit Online- und Offline-Massenspektrometrie (Protonentransferreaktion-Flugzeit-Massenspektrometer (PTR-ToF-MS) und Gaschromatographie-Massenspektrometer (GC-MS)) [5]. Die Fotos zeigen den Aufbau der Anlage im Brutschrank, Kulturgefäße mit Polydimethylsiloxan-Passivsammlern (PDMS), die über Magnete an der Innenseite der Deckel angebracht sind, und Fotos der beiden Massenspektrometer. Zur Online-Messung von VOCs wird das Küvetten-system mit synthetischer, VOC-freier Luft durchströmt. Die VOCs jeder Küvette werden sequenziell durch PTR-ToF-MS gemessen. Die Luft am Auslass wird erwärmt, um Kondensation in den Leitungen zu vermeiden. Nach den Online-Messungen werden die VOCs in PDMS gesammelt und mit dem GC-MS offline gemessen. **B**, Vor- und Nachteile der beiden Messsysteme.

gleich zu minimieren, kultivierten wir die 43 ausgewählten Pilzspezies in einem für alle geeigneten Pilzmedium und führten die VOC-Messungen unter konstanten und kontrollierten Umweltbedingungen durch. Insgesamt konnten wir mithilfe der beiden massenspektrometrischen Methoden 224 verschiedene VOCs aus elf Stoffgruppen nachweisen (**Abb. 3**). Mit 90 Verbindungen stellen die Terpenoide die größte Stoffgruppe dar, gefolgt von Carbonylen und Benzoiden mit jeweils 40 bzw. 25 VOCs.

VOCs – die Sprache der Pilze

Um ökologische und funktionsbasierte Muster aus den Emissionsprofilen abzuleiten, mussten wir multivariante statistische Verfahren anwenden. Es zeigte sich, dass die Lebensweise von Pilzen und die Nahrungsbeziehungen durch ihre VOC-Muster charakterisiert werden können [4]. Die Berechnung der phänotypischen Integration ergab, dass Pilze – ähnlich wie Pflanzen – spezifische VOC-Muster emittieren, die als *chemical communication displays* (CCDs) bezeichnet werden. Somit können je nach Ernährungsart

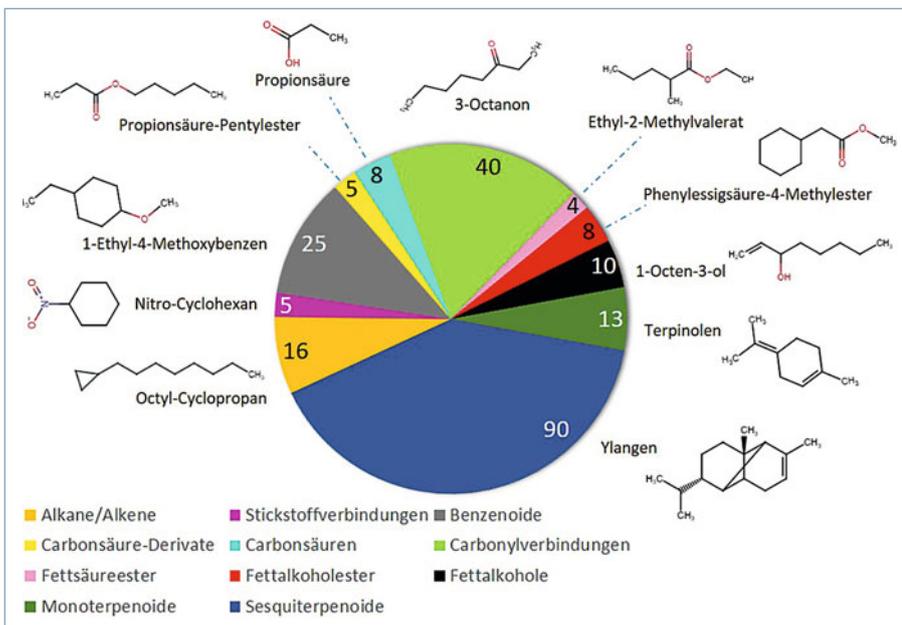


Abb. 3: Überblick über die strukturelle Vielfalt an VOCs, die im Rahmen unserer Studie [4] mithilfe der beiden massenspektrometrischen Verfahren gemessen wurden. Je Stoffgruppe ist die Struktur eines typischen VOCs abgebildet. Die Zahlen in den Tortenstücken geben die Anzahl der VOCs in der jeweiligen Stoffgruppe an. Die Gesamtliste umfasst 224 Verbindungen und ist über den Link <https://osf.io/bva2q/> (Tabellen 2 und 3) einsehbar.

entweder einzelne VOCs oder komplexere Muster eine wichtige Rolle bei Interaktionen spielen [4]. In einer solchen „Sprache“ bildet ein VOC einen Buchstaben im universellen flüchtigen „Alphabet“, aus dem einzelne Pilze „Wörter“ – die CCDs – bilden, die für ihre Kommunikation mit anderen Organismen verwendet werden können. Diese Kommunikation im Boden wird manchmal als „unterirdisches drahtloses Internet“ bezeichnet [7]. Das kabelgebundene Internet wäre in diesem Fall das Netzwerk aus Mycorrhizahyphen.

Im Reich der Pilze noch viele VOCs vermutet

Um Biomarker für die ökologische Funktionen zu identifizieren, entwickelten wir verschiedene maschinelle Lernalgorithmen. Hierbei kamen drei Modelle zum Einsatz, um potenzielle Verzerrungen effektiv zu vermeiden. Jedes Modell ergab schließlich eine Liste von VOCs, die einer Teilmenge der Variablen (Prädiktoren) entsprechen. Die endgültigen Modelle trainierten wir dann mit dieser Teilmenge, um die Signifikanz der endgültigen Prädiktoren zu bestimmen und die Genauigkeit für das Modell zu ermitteln. Um potenzielle falsch-positive Biomarker zu minimieren, wählten wir nur VOCs aus, die in allen drei Modellen als Biomarker identifiziert wurden. Mit dieser Analyse konnten wir zeigen, dass bestimmte VOC-Muster die

Lebensweise der Pilze, die Substratnutzung und sogar die Art des Wirts – Baum oder krautige Pflanze – vorhersagen können [4].

Mit unseren Ergebnissen kratzen wir jedoch nur an der Oberfläche der enormen Vielfalt an pilzlichen und anderen mikrobiellen VOCs (**Abb. 3**). Das aufgebaute Messsystem und die ersten Datensätze dienen als Voraussetzung, um einen noch tieferen Einblick in die Welt der Pilzgerüche zu gewinnen (**Abb. 1**). Zukünftig sollen VOC-Studien in biochemische, genetische und ökologische Ansätze integriert werden, um neue Einblicke in die auf VOCs basierenden Interaktionen von Pilzen und auch in die Evolution von Pilzen zu gewinnen. Unsere Plattform bietet einen Eckpfeiler, auf dem wir aufbauen können, um die interspezifische chemische Kommunikation zu verstehen, aber eventuell auch um neue wirtschaftlich und gesellschaftlich wichtige chemische Verbindungen zu identifizieren.

Danksagung

Wir danken allen Ko-Autor:innen des Originalartikels. ■

Literatur

- [1] Frac M, Hannula SE, Belka M, Jedryczka M (2018) Fungal biodiversity and their role in soil health. *Front Microbiol* 9: 707
- [2] Werner S, Polle A, Brinkmann N (2016) Belowground communication: impacts of volatile organic compounds

(VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Appl Microbiol Biot* 100: 8651–8665

- [3] Weisskopf L, Schulz S, Garbeva P (2021) Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nat Rev Microbiol* 19: 391–404
- [4] Guo Y, Jud W, Weigl F et al. (2021) Volatile organic compound patterns predict fungal trophic mode and lifestyle. *Commun Biol* 4: 673
- [5] Guo Y, Jud W, Ghirardo A et al. (2020) Sniffing fungi – phenotyping of volatile chemical diversity in *Trichoderma* species. *New Phytol* 227: 244–259
- [6] Lemfack MC, Gohlke BO, Toguem SMT et al. (2018) mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res* 46: D1261–D1265
- [7] Sharifi R, Ryu CM (2021) Social networking in crop plants: wired and wireless cross-plant communications. *Plant Cell Environ* 44: 1095–1110

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Maaria Rosenkranz
 Abteilung für Experimentelle Umweltsimulation
 Institut für Biochemische Pflanzenpathologie
 Helmholtz Zentrum München
 Ingolstädter Landstraße 1
 D-85764 Neuherberg
 maaria.rosenkranz@helmholtz-muenchen.de
 www.helmholtz-munich.de/eus/index.html

AUTORINNEN UND AUTOREN



Maaria Rosenkranz

1998–2003 Studium der Umweltwissenschaft, Universität Kuopio, Finnland. 2004–2008 Promotion in Pflanzlicher Molekularbiologie, Universität Freiburg/Breisgau. 2008–2010 Postdoc, Universität Würzburg. Seit 2010 Wissenschaftlerin, Helmholtz Zentrum München.

Jörg-Peter Schnitzler

1982–1992 Studium der Biologie & Promotion, Universität Tübingen. 2003 Habilitation in Baumphysiologie. 2007 Apl. Prof. Universität Freiburg. 1992–1994 Postdoc, Gesellschaft für Strahlenforschung (jetzt Helmholtz Zentrum München). 1994–2010 AG-Leiter, Fraunhofer Institut für Atmosphärische Umweltforschung (jetzt KIT), Garmisch-Partenkirchen. Seit 2010 Abteilungsleiter, Helmholtz Zentrum München.