



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Pilzendophyten aus *Alpinia malaccensis* und *Curcuma*
sp.: Kultur, Sekundärstoffprofil und Bioaktivität

Verfasser/in

Celine Zahradnik

zur Erlangung des akademischen Grades

Magister/Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

an der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Universität Wien

Wien, 2010

Studienkennzahl (lt. Studienblatt): A438

Studienrichtung (lt. Studienblatt): Biologie

Betreuer/in: Ao.Univ.-Prof. Dr. Karin Valant-Vetschera

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zingiberaceae.....	2
1.1.1	Systematik & Verbreitung	2
1.1.2	<i>Alpinia malaccensis</i> Roxb.	3
1.1.3	<i>Curcuma</i> sp. L.	4
1.2	Endophyten.....	5
1.2.1	Interaktionen zwischen Pilzen und Pflanzen.....	5
1.2.2	Definition des Begriffes "Endophyt"	6
1.2.3	Evolutionärer Ursprung	6
1.2.4	Verbreitung	7
1.2.5	Einfluß von Endophyten auf die Wirtspflanze.....	8
1.2.6	Bisherige Kenntnisse über mit Ingwergewächsen assoziierten Endophyten.....	10
2	Material & Methoden.....	11
2.1	Isolierung & Extraktion von Endophyten.....	11
2.1.1	Pflanzenmaterial	11
2.1.2	Oberflächensterilisation des Pflanzenmaterials	14
2.1.3	Herstellung der verwendeten Nährmedien	15
2.1.4	Isolierung der Endophyten aus den Wirtspflanzen und Anlage von Kulturen	16
2.2	Charakterisierung der untersuchten Pilzstämmen	16
2.2.1	Molekularbiologische Charakterisierung	16
2.2.2	Morphologische Charakterisierung.....	18
2.2.3	Physiologische Charakterisierung	18
2.2.4	Phytochemische Charakterisierung.....	20
2.3	Untersuchung auf biologische Aktivität.....	23
2.3.1	Dünnschichtbioautographie	23
2.3.2	Non-choice Fraßversuche an <i>Spodoptera littoralis</i>	24
2.4	Liste der verwendeten Geräte, Chemikalien und Software	25
3	Mykotoxine.....	28
4	Ergebnisse.....	32
4.1	Molekularbiologische Charakterisierung.....	32
4.1.1	Pilz-Isolat EP1	33
4.1.2	Pilz-Isolat EP2	33
4.1.3	Pilz-Isolat EP3	34
4.1.4	Pilz-Isolat EP4	34
4.1.5	Pilz-Isolat EPC	35
4.2	Vergleich verschiedener Medien und Oberflächensterilisationsmethoden	35
4.3	Makro-, mikroskopische und physiologische Charakterisierung.....	36
4.3.1	Makro- und mikroskopische Charakterisierung	36
4.3.2	Physiologische Charakterisierung	38
4.4	Phytochemische Charakterisierung	40
4.4.1	<i>Alpinia malaccensis</i>	40
4.4.2	<i>Curcuma</i> sp.....	45
4.4.3	Dünnschichtchromatographie.....	46

4.5	Biotests	46
4.5.1	Dünnschichtbioautographie	46
4.5.2	Fraßversuche mit <i>Spodoptera</i>	47
4.5.3	Kompetitionstests	49
5	Diskussion	52
5.1	Beeinflussung der Diversität und Physiologie der Endophyten durch die Methodik.....	52
5.2	Das bioaktive Potential fungaler Sekundärstoffe und deren Rolle in der Wirtspflanze ...	54
5.3	Möglichkeiten und Hindernisse der Bestimmung von Endophyten auf makro-, mikroskopischer und molekularbiologischer Ebene.....	56
6	Literaturverzeichnis	59
7	Anhang.....	71
7.1	Tabellenverzeichnis.....	71
7.2	Abbildungsverzeichnis	72
7.3	Danksagung.....	73
7.4	Zusammenfassung	75
7.5	Abstract.....	76
7.6	Curriculum Vitae	77

1 Einleitung

De Bary führte 1866 erstmals den Begriff "Endophyt" ein und verstand darunter jeden Organismus, der innerhalb pflanzlichen Gewebes auftritt. 1986 definierte Carroll Endophyten als mutualistische Pilze, die die oberirdischen Teile von Pflanzen kolonisieren, ohne dabei krankhafte Symptome zu verursachen. Obwohl sich die Definition des Begriffs "Endophyt" bis zum heutigen Zeitpunkt jährlich änderte, ist die gebräuchlichste, daß es sich bei Endophyten um all jene Organismen handelt, die zu bestimmten Zeiten ihrer Lebensspanne internes Pflanzengewebe kolonisieren können, ohne bei der Wirtspflanze sichtbaren Schaden hervorzurufen (Petrini, 1991).

Vor allem die Entdeckung des endophytisch lebenden Pilzes *Taxomyces andreanae* 1993 (Stiere et al., 1993) rückte die Endophytenforschung in ein völlig neues Licht. Wie sich zeigte, war dieser Ascomycet in der Lage, das Diterpenoid Taxol zu produzieren, welches erstmals aus der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* isoliert wurde und sich als äußerst wirksam gegen verschiedene Arten von Tumoren erwies. Da die Bestände der in Nordamerika heimischen Pazifischen Eibe stark limitiert sind, erwies sich die Taxolgewinnung als schwierig und vor allem kostspielig (Wani et al., 1971). Die Entdeckung von *Taxomyces andreanae* als Taxol-produzierenden Endophyt war daher von großer Bedeutung für Wirtschaft und Humanmedizin, da die Gewinnung der Substanz erheblich vereinfacht werden konnte.

In den darauffolgenden Jahren begann die Suche nach bioaktiven bzw. antibiotisch wirksamen Metaboliten von Pilz-Endophyten und auch endophytischen Bakterien. In allen bisher untersuchten Pflanzen wurden Endophyten gefunden (Hyde & Soyong, 2008), und die Isolierung von bioaktiven Naturstoffen war nicht minder erfolgreich. Auch aus Pflanzen der Familie der Ingwergewächse versuchte man, ob ihrer wirtschaftlichen Bedeutung als Nahrungsmittel, Medizinal- und Zierpflanzen (Larsen, 2006), Endophyten und deren Sekundärstoffe zu isolieren. Taechowisan et al. (2008) konnten aus in Nakorn Pathom - Thailand, gesammelten Wurzeln von *Alpinia galanga* über 100 verschiedene Endophyten isolieren (Taechowisan & Lumyong, 2003; Taechowisan et al., 2005) isolieren. Obwohl die vorliegende Arbeit ausschließlich endophytische Pilze behandelt, soll

Streptomyces sp., ein Actinobakterium, erwähnt werden, welches starke antifungale und antibakterielle Wirkung zeigte. Kulturen dieses Bakteriums wurden extrahiert, und es konnten die Substanzen Kaempferol, Isocutellarin, Umbelliferon und Cichoriin isoliert werden, welche für die bioaktive Wirkung von *Streptomyces* sp. verantwortlich sind. Lumyong et al. (2004) isolierten 78 Pilze aus *Amomum siamense* und *Alpinia malaccensis*, unter anderem eine neue Art, *Gaeumannomyces amomi*, welche in der Lage war, das Wachstum von *Candida albicans* zu hemmen, sowie 3 neue *Pyricularia*-Spezies.

In der vorliegenden Arbeit wurden Endophyten von zwei verschiedenen Gattungen bzw. Arten der Zingiberaceae untersucht; *Alpinia malaccensis* (Rhizome) und *Curcuma* sp. (Wurzeln). Die isolierten Pilze sollen phytochemisch charakterisiert und mittels bioautographischer Pilz- und Insektentests auf ihre Bioaktivität untersucht werden. Des Weiteren sollte ausgeschlossen werden, daß den Pflanzen zugerechnete Sekundärstoffe tatsächlich von den sie kolonisierenden Pilzen produziert werden.

1.1 Zingiberaceae

Die Familie der Ingwergewächse umfasst 53 Gattungen und über 1200 Arten (Kress, 1990), mit Verbreitungsschwerpunkt in den tropischen und subtropischen Regionen Südostasiens und den Pazifischen Inseln. Die Formenfülle an Ingwergewächsen ist in Thailand am höchsten. Viele Arten dieser großen Familie werden wirtschaftlich genutzt, sowohl als Nahrungsmittel, Medizinalpflanzen, als auch als ornamentale Pflanzen (Larsen, 2006). Phytochemisch lassen sich die Zingiberaceae durch das Vorkommen von Curcuminoiden, Gingerolen, Phenylbutenoiden, Phenylpropenen, Sesquiterpenen, Diterpenen und Flavonoiden charakterisieren (Hegnauer, 1963; Pancharoen et al., 2000).

1.1.1 Systematik & Verbreitung

Die Ordnung Zingiberales wird aufgrund ihrer morphologischen Merkmale in zwei Gruppen geteilt: die "Banana group" mit fünf bis sechs Stamina, und die "Ginger group" mit einem Stamen. Der "Banana group" gehören die Familien *Musaceae* und

Strelitziaceae, während die "Ginger group" die Lowiaceae, Heliconiaceae, Costaceae, Marantaceae, Cannaceae und Zingiberaceae umfasst (Abb. 1). Die Familie der Ingwergewächse unterscheidet sich morphologisch von den übrigen Familien vor allem durch ihre distiche Blattstellung (Larsen, 2006). Neben der traditionellen morphologischen Analyse konnten die Verwandtschaftsbeziehungen der Familien innerhalb der Zingiberales auch durch anatomische, cytologische, chemotaxonomische, palynologische und in jüngerer Zeit auch molekularbiologische Analysen weitgehend aufgeklärt werden. Bei den Zingiberaceae handelt es sich um ausdauernde, rhizombildende Pflanzen mit einfachen, distichen Blättern, die terminale Infloreszenz sitzt entweder auf Blattspossen oder an den Seitensprossen; die Blüten sind filigran, kurzlebig und mitunter stark modifiziert (Sirirugsa, 1999). Die taxonomische Gliederung der Familie basiert auf phylogenetischen Studien (Kress et al., 2002), wonach sich eine Untergliederung in die vier Unterfamilien Alpinioideae, Tamijioideae, Zingiberoideae und Siphonochiloideae und insgesamt sechs Triben Alpinieae, Riedelieae, Tamijieae, Zingibereae, Globbeae und Siphonochileae ergibt.

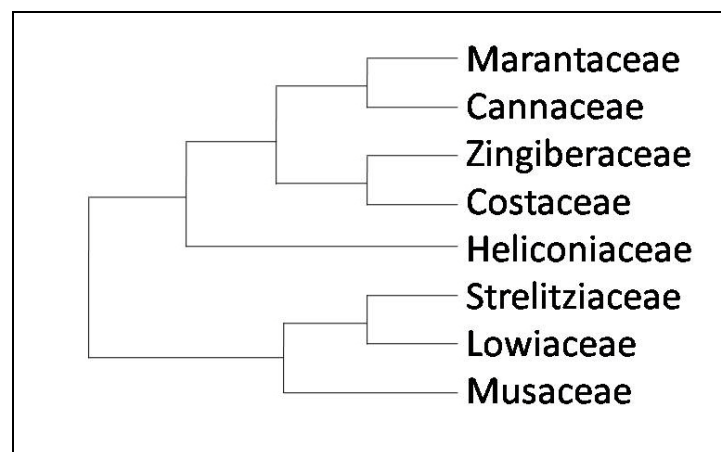


Abb. 1: Stammbaum der Zingiberales (Kress et al., 2001)

1.1.2 *Alpinia malaccensis* Roxb.

Die Gattung *Alpinia* Roxb. umfasst über 200 Arten und ist somit die artenreichste innerhalb der Zingiberaceae. Sie ist ein wesentlicher Bestandteil der krautigen Vegetation der humiden tropischen Wälder. Die in Thailand beheimateten Arten werden selten höher als drei Meter, auf den Fiji-Inseln hingegen können einige Arten sogar Höhen von

zehn Metern erreichen. Morphologisch wird die Gattung durch große Laubblätter, ein gut entwickeltes Rhizom und eine terminale Infloreszenz charakterisiert. Die Infloreszenz kann wenig- bis vielblütig sein, auch die Blütengröße variiert beträchtlich, sogar innerhalb einer Art wie etwa bei *Alpinia malaccensis*.

Chemisch wird *Alpinia* durch das Auftreten von Terpenoiden, Diarylheptanoiden, Phenylpropanoiden und Flavonoiden charakterisiert, wobei ein Großteil der terpenoiden Verbindungen auf die Mono- und Sesquiterpene entfällt. Auch Labdan-Diterpene werden produziert, die bei *Alpinia galanga* starke antifungale Wirkung zeigen (Pancharoen et al., 2000). Traditionell werden Rhizome von *Alpinia galanga* vor allem als Gewürz für Speisen verwendet. In Indien wird der Heißwasserextrakt bei Bronchitis und Diabetes getrunken, zerstoßen und vermengt mit Essig soll das Rhizom äußerliche Entzündungen lindern (Tuntiwachwuttikul et al, 2000). Wässrige und methanolische Extrakte hemmen die Säuresekretion im Magen, und dem ätherischen Öl konnte eine spasmolytische, antiphlogistische und antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden (Hänsel & Sticher, 2004; Sakai et al., 1989).

1.1.3 *Curcuma* sp. L.

Die Gattung *Curcuma* Linn. hat ihr hauptsächliches Verbreitungsgebiet in der kontinentalen Monsun-Region Asiens. Auch in Thailand ist sie häufig vertreten, die vielfach als Gewürz und Medizin genutzte Spezies *Curcuma longa* ist in Thailand zwar nicht heimisch, wird dort aber in großem Maßstab angebaut. Die großen Laubblätter sind elliptisch geformt, spitz zulaufend und verjüngen sich an der Blattbasis. Die Rhizome sind gut entwickelt und besitzen aufgrund des hohen Gehalts an Curcuminoiden eine typische Gelbfärbung. Die Wurzeln sind oft knollenartig verdickt. Die Infloreszenzen sind entweder terminal oder bilden laterale Blütenprosse. Der distale Teil der Infloreszenz besteht aus sterilen, auffallend gefärbten Hochblättern, die fertilen Blüten sind stets anders gefärbt. Die meisten Arten bilden ihre Infloreszenzen häufig zur selben Zeit wie die Blattsprosse aus. Die im Norden Thailands beheimateten Arten *Curcuma ecomata* und *Curcuma glans* hingegen bilden bereits in der Trockenzeit Blüten aus, bevor sich die Blattsprosse

entwickeln. *Curcuma alismatifolia* wird aufgrund der auffallend rosa gefärbten Hochblätter gerne als Zierpflanze verwendet (Larsen & Larsen, 2006).

1.2 Endophyten

1.2.1 Interaktionen zwischen Pilzen und Pflanzen

Die Interaktionen von Pilzen und Pflanzen sind außerordentlich vielseitig und komplex, und decken den gesamten Bereich von Pathogenen bis hin zu Symbionten ab. Es kann grob zwischen fungalen Pathogenen, den verschiedenen Formen der Mykorrhiza-Pilze und den endophytisch lebenden Pilzen unterschieden werden. Eine Vielzahl an biotrophen und nekrotrophen Pilzen kann eine ebenso große Zahl an Pflanzenkrankheiten hervorrufen. Sie leben auf Kosten ihrer Wirte und stellen somit ein großes Problem für die Landwirtschaft dar. So trat zum Beispiel 1842 der Kartoffelfäule-Erreger *Phytophthora infestans* seinen Siegeszug rund um die Welt an und löste sowohl in Nordamerika als auch wenige Jahre später in Europa große Hungersnöte aus (Fry et al., 1993). Dem gegenüber stehen die endotrophen und ektotrophen Mykorrhiza, die durch eine Oberflächenvergrößerung der Wurzelhaare ihrer Wirte Nährstoffe besser aufschließen und für die Pflanze bereitstellen können, und im Gegenzug Kohlenhydrate erhalten (Müller & Loeffler, 1992). Eine Sonderstellung zwischen Parasitismus und Symbiose nehmen hier die fungalen Endophyten ein. Sie bewirken bei ihren Wirtspflanzen häufig erhöhte Vitalität, produzieren verschiedene Substanzen zur chemischen Abwehr von Fraßfeinden und erhalten dafür Nährstoffe und einen sicheren Lebensraum (Bush et al., 1997). Nach Petrini (1991) sind die Grenzen zwischen negativer und positiver Interaktion aber nicht immer klar ersichtlich und werden zum Teil kontrovers diskutiert (Hyde & Soytong, 2008).

1.2.2 Definition des Begriffes "Endophyt"

Der Begriff "Endophyt" umfasst alle Organismen, die lebende innere Gewebe eines Wirtes besiedeln, und während einer gewissen Zeitspanne ihres Lebenszyklus oder ihr ganzes Leben hindurch keine Symptome verursachen (Petrini, 1991). Die Grenze in der Unterscheidung zwischen einem latenten Pathogen und einer mutualistischen Symbiose ist daher schmal (Tan et al., 2001) und hängt nicht zuletzt von verschiedenen Faktoren wie dem Zustand der Wirtspflanze, äußeren Bedingungen, der genetischen Kompatibilität zwischen Wirt und endophytischem Organismus sowie dem Verbreitungsmechanismus des Endophyten ab. Nach Redman et al. (1999) führt eine durch UV-Licht induzierte Mutagenese zu einer mutierten Form des pathogenen Pilzes *Colletotrichum magna*, welche den Wirt als Endophyt völlig symptomlos besiedelt. Photita et al. (2004) hingegen konnten zeigen, daß aus Blättern von *Musa* sp. isolierte Endophyten sehr wohl in der Lage waren, Krankheitssymptome zu verursachen. Das Auftreten von krankhaften Symptomen scheint in direktem Zusammenhang mit dem Zustand der Wirtspflanze zu stehen. Kommt es beim Wirt zu physiologischem Streß aufgrund ungünstiger Umweltbedingungen, kann sich so aus einem Endophyt ein Pathogen entwickeln, welches typische Anzeichen einer Krankheit hervorruft (Hyde et al., 2008). Daß endophytische Pilze die Pflanze hingegen auch vor Infektionen durch pathogene Pilze schützen, zeigt lediglich, wie komplex die Beziehungen zwischen Wirt und Symbiont sein können und erfordern weitere Untersuchungen (Arnold et al., 2003).

1.2.3 Evolutionärer Ursprung

Fossilfunde aus dem Ordovizium legen nahe, daß Pflanzen bereits vor 400 Millionen Jahren Symbiosen mit endophytischen Pilzen bildeten (Pirozynski et al., 1975). Untersuchungen an der fossilen Pflanze *Nothia aphylla* aus dem Unteren Devon bestätigen diese Annahme. Krings et al. (2006) konnten zeigen, daß von drei Pilzen, mit denen *Nothia* infiziert war, zumindest einer endophytischen Charakter besaß. Es wird angenommen, daß die explosionsartige Kolonisation des terrestrischen Raumes von Pflanzen im Silur nur durch Endophyten möglich war, mit deren Hilfe eine Adaptation an

die neuen Bedingungen wie Trockenheit und Nährstofflimitierung stattfinden konnte (Rodriguez et al., 2005). Weiters wird angenommen, daß sich viele Endophyten aus Insekten-parasitierenden Pilzen entwickelt haben, die zuerst in eine vom Stechrüssel eines Insekts verursachte Wunde eindringen und so die Pflanze kolonisieren konnten. Rodriguez et al. (2008) sind der Meinung, daß die Besiedelung von Pflanzen mit der Reduktion von lytischen Enzymen, einer zunehmenden Abhängigkeit von Nährstoffen des Wirtes und der Produktion von Sekundärmetaboliten wie z.B. Alkaloiden einher ging. Tsai et al. (1994) nehmen aufgrund der hohen Diversität an endophytischen Pilzen beim Rohrschwingel *Festuca arundinacea* an, daß es im Laufe der Evolution zu einer mehrfachen Hybridisierung von Endophyten verschiedener Arten kam. Schardl & Moon (2003) legen nahe, daß die Ursache für diese interspezifische Rekombination der Verlust der sexuellen Fortpflanzung sein könnte, um die genetische Variabilität zu erhalten.

1.2.4 Verbreitung

In den letzten 20 Jahren konnte gezeigt werden, daß Endophyten "allgegenwärtig" sind. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden sie in jeder untersuchten Pflanze gefunden, das Spektrum reicht von marinen Algen (Teuscher, 2005) über Flechten (Li et al., 2007), Bryophyta (Davey et al., 2006) bis hin zu den Gefäßpflanzen (Franceschini et al., 2005). Ebenso breit gefächert wie ihr Wirts-Spektrum ist ihre geographische Verbreitung. So konnten selbst in *Dryas octopetala*, der Weißen Silberwurz, welche in der arktischen Region und den Alpen Europas heimisch ist, Endophyten nachgewiesen werden (Fisher et al., 1995; zitiert nach Toofanee & Rafic, 2002). Dennoch wird aber angenommen, daß die Biodiversität von endophytischen Pilzen in den Tropen besonders hoch ist (Arnold et al., 2000). So vielfältig wie die von Endophyten besiedelten Lebensräume sind auch die Taxa, von denen eine endophytische Lebensweise bekannt ist. Diese Taxa befinden sich jedoch hauptsächlich in der Abteilung der Ascomycota, wesentlich seltener hingegen unter den Basidiomycota (Saikkonen et al., 1998; zitiert nach Ernst, 2005). Die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Produktion von Alkaloiden gut untersuchte und sehr häufige Gattung *Neotyphodium* aus der Familie der Clavicipitaceae gehört ebenfalls zur Abteilung der Ascomycota (Sugawara et al., 2006). Das ubiquitäre Auftreten von Endophyten wird zusätzlich noch durch die Tatsache unterstrichen, daß sie in beinahe jedem Gewebetyp

und allen Pflanzenorganen gefunden werden. So konnten Endophyten zum Beispiel aus Blättern (Photita et al., 2004), Wurzeln (Taechowisan et al., 2008), Petiolen (Rungjidadamai et al., 2008) und vielen Geweben und Organen isoliert werden.

1.2.5 Einfluß von Endophyten auf die Wirtspflanze

Wie in Kapitel 1.2.1 bereits erwähnt, ist unklar, ob es sich bei fungalen Endophyten immer um Symbionten handelt. Um die Auswirkungen und Effekte von endophytischen Pilzen auf ihre Wirtspflanzen besser verstehen zu können, werden diese aufgrund funktioneller Unterschiede in zwei Gruppen zusammengefaßt: jene, die der Familie der Clavicipitaceae und jene, die anderen Familien angehören. Die sogenannten "clavicipitaceous endophytes" oder "C-endophytes" infizieren fast ausschließlich Gräser. Dagegen kolonisieren die "non-clavicipitaceous endophytes" oder "NC-endophytes" neben Algen, Moosen, Farnen und Gymnospermen alle anderen Angiospermen (Rodriguez et al., 2009).

"C-Endophyten" sind vor allem für die Symbiosen der Gräser wie *Festuca* und *Lolium* typisch. Untersuchungen begannen, als 1977 die Korrelation zwischen der Symbiose von Gräsern mit Pilzen und verschiedenen Weidekrankheiten erkannt wurde (Zabalgoatzea, 2008). Auf großen Weideflächen Neuseelands und den USA, welche sich hauptsächlich aus *Festuca arundinacea* und *Lolium perenne* zusammensetzen, konnten immer wieder Toxikosen bei Weidetieren beobachtet werden. Bacon et al. (1977) konnten zeigen, daß jene Pflanzen, welche bei den Tieren Vergiftungserscheinungen hervorriefen, Endophyten enthielten und eine Reihe von toxischen Alkaloiden produzierten, welche in endophytenfreien Pflanzen nicht nachgewiesen werden konnten. Bei diesen Pilzen handelte es sich um Vertreter der Gattung *Epichloë* bzw. *Neotyphodium*. Vor allem die isolierten Substanzen Ergovalin und Lolitrem B wirken auf Vertebraten bzw. Säugetiere stark toxisch (Bush et al., 1997). Zwei andere Inhaltstoffe, N-Formyllolin und Peramin wirken ausschließlich auf Insekten, wobei letzteres als sogenanntes "feeding deterrent", also fraßabschreckend wirkt (Riedell et al., 1991). Mittlerweile kann Saatgut der betreffenden Pflanzen bereits als "endophyte-enhanced" gekauft werden (Funk & White, 1997). Da sich diese endophytischen Pilze neben der horizontalen Transmission über

Sporen auch über vertikale Transmission (über die Samen der Pflanze) verbreiten, ist es einfach, solche Pilz-Gras-Symbiosen kommerziell zu produzieren. Dabei ist der erwünschte Effekt meist jener, daß kein Ergovalin und Lolitrem B, sondern nur Peramin und N-Formyllolin produziert werden. Somit können Säugetiere unbehelligt weiden, aber die Gräser werden nicht von herbivoren Insekten dezimiert (Latch & Christensen, 1997). Abgesehen von ihren Auswirkungen auf herbivore Tiere lassen sich noch andere positive Effekte dieser Lebensgemeinschaften nachweisen. Man nimmt an, daß manche Endophyten die Bildung von Wurzelhaaren stimulieren, wodurch die Pflanzen Wasserreserven im Boden besser erreichen und außerdem mehr Nährstoffe aufnehmen können, woraus eine gesteigerte Biomasseproduktion resultiert (Malinowski & Belesky, 2000).

Die Rolle der "NC-Endophyten" für ihre Wirtspflanzen ist wesentlich schwieriger zu interpretieren. Diese symbiontischen Assoziationen können zwischen einer Vielzahl von Pilz- und Pflanzenarten bestehen. Wie auch bei den "C-Endophyten" kann es zu einer Steigerung des Wachstums bzw. der Biomasseproduktion kommen. Ebenfalls wird von einer erhöhten Toleranz gegenüber Trocken- und Schwermetallstreß, hoher Salinität und hohem pH-Wert gesprochen. Diese positiven Effekte sind allerdings nicht die Regel, die Auswirkungen können sich auch als neutral oder sogar negativ äußern (Rodriguez et al., 2009). Einer der wohl interessantesten Aspekte dieser funktionellen Gruppe ist die Rolle dieser endophytischen Pilze bei der Pathogenabwehr. Es kann sowohl zur Abwehr von Nematoden als auch von pflanzenpathogenen Pilze kommen, seltener hingegen, wenn auch existent, sind Interaktionen mit Bakterien und Viren. Häufig ist allerdings unklar, wie diese Abwehrreaktionen stattfinden. Bekannt ist, daß viele Pilz-Endophyten antibiotisch wirksame Substanzen produzieren, die das Wachstum von Pathogenen hemmen und möglicherweise sogar in den induzierten Verteidigungsmechanismus der Pflanze eingreifen. Verantwortlich für diese gesteigerte Resistenz könnten sowohl schlichter Konkurrenzkampf um Platz und Ressourcen als auch das Auftreten von Mycoparasiten sein (Zabalgoitia, 2008). Ob diese Erkenntnisse in Zukunft landwirtschaftlich zur Kontrolle von Pflanzenkrankheiten und zur Steigerung der Vitalität von Nutzpflanzen eingesetzt werden können, kann derzeit nicht beurteilt werden und erfordert jedenfalls umfassende weitere Untersuchungen.

1.2.6 Bisherige Kenntnisse über mit Ingwergewächsen assoziierten Endophyten

Da vor allem die Gattungen *Zingiber*, *Alpinia* und *Curcuma* in vielen Teilen der Welt als Medizinalpflanzen genutzt werden, stellen Zingiberaceae eine interessante Quelle für die Isolierung von Endophyten und deren Inhaltsstoffen dar. Die isolierten Substanzen sind häufig bioaktiv und zeigen oft sogar antitumorale Wirkung, wie dies z.B. bei *Curcuma amada*, *Curcuma angustifolia* und *Curcuma aromatica* der Fall ist (Banu et al., 2009).

Aus den Wurzeln von *Zingiber officinale* und *Alpinia galanga* konnte der bakterielle Endophyt *Streptomyces aureofaciens* isoliert werden, welcher das Wachstums von *Candida albicans* und den phytopathogenen Pilzen *Colletotrichum musae* und *Fusarium oxysporum* hemmt (Taechowisan et al., 2003). Dafür verantwortlich sind in erster Linie die aus dem Bakterium isolierten Inhaltsstoffe Kaempferol, Isocutellarin, Umbelliferon und Cichoriin, die vorher bereits auf Pflanzen isoliert wurden, so zum Beispiel Kaempferol aus *Kaempferia galanga*. Kaempferol und Isocutellarin weisen starke Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* auf (Taechowisan et al., 2008).

Bussaban et al. (2001) konnten zeigen, daß große Unterschiede in der Diversität der Pilz-Endophyten bei *Amomum siamense* je nach Sammelplatz auftreten, während sich der Sammelzeitpunkt mit unterschiedlichen Niederschlagsmengen in dem jeweiligen Gebiet nicht darauf auswirkte. Neben zwei neuen Ascomyceten, *Gaeumannomyces amomi* und *Leiosphaerella amomi*, konnten auch vier neue Arten der Gattung *Pyricularia* isoliert werden, von denen zwei ebenso in *Alpinia malaccensis* auftraten. Unklar ist, inwieweit bei *Pyricularia* Wirts-Spezifität vorliegt, da bestimmte Endophyten bei anderen Pflanzen sehr wohl Krankheitssymptome hervorrufen, nicht aber bei *Amomum* und *Alpinia* (Bussaban et al., 2003).

2 Material & Methoden

2.1 Isolierung & Extraktion von Endophyten

2.1.1 Pflanzenmaterial

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Pflanzen bzw. deren Organe wurden im Rahmen einer phytochemischen Exkursion im Februar 2006 in Thailand auf verschiedenen Märkten gekauft und anschließend im Botanischen Garten der Universität Wien (HBV) kultiviert. Die Bestimmung der Pflanzenteile erfolgte aufgrund morphologischer Merkmale; Herbarbelege wurden angelegt und sind im Herbarium der Universität Wien (WU) hinterlegt (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Untersuchte Pflanzen: Es sind Herkunft, untersuchtes Pflanzenorgan sowie Garten- und Herbarnummer angegeben.

Art	Herkunft	Pflanzenorgan	Garten-, Herbarnummer
<i>Curcuma</i> sp.	Thailand, Nakhon Si Thammarat	Wurzel	ZIN060028, WU0044120
<i>Alpinia malaccensis</i>	Thailand, Chiang Mai, Chiang Dao	Rhizom	ZIN070008, WU0044241



Abb. 2: Herbarbeleg von *Curcuma* sp., ZIN060028

Abb. 3: Herbarbeleg von *Alpinia malaccensis*, ZIN070008

2.1.2 Oberflächensterilisation des Pflanzenmaterials

Die zu untersuchenden Gewebeteile wurden zuerst mit Leitungswasser gewaschen und anschließend in bestimmter Reihenfolge in Chemikalien getaucht (siehe Tab. 2), welche äußerlich anhaftende Mikroorganismen abtöten sollen, ohne zu tief ins Gewebe einzudringen und dort fungale Endophyten zu zerstören. Um die effektivste Oberflächensterilisationsmethode zu ermitteln bzw. Unterschiede in der Diversität der isolierten Endophyten je nach Methode festzustellen, wurden die Pflanzenproben vier verschiedenen Behandlungen unterzogen (Clark et al., 1983, verändert; Luginbühl & Müller, 1980; Petrini & Dreyfuss, 1981; Kreisel & Schauer, 1987; zitiert nach Schulz et al., 1993). Um die Effektivität der Oberflächensterilisation zu überprüfen, wurde der "Vitality-Test" nach Petrini (1984) durchgeführt, bei dem die oberflächensterilisierten Pflanzenteile mit ihrer Oberfläche auf Malzagar-Medien aufgedrückt werden. Befinden sich dort noch epiphytische Pilze oder Mikroorganismen, ergibt dies wenige Tage später einen positiven "Vitality-Test".

Tab. 2: Methoden zur Oberflächensterilisation: Sämtliche Methoden wurden zeitgleich mit Teilen desselben Gewebestücks durchgeführt. Evaluiert wurde nach der Anzahl der isolierten Endophyten.

Methode	Lösung	Konzentration	Zeit in Lösung
OS I	NaOCl	30%	5 min.
OS II	EtOH	96%	1 min.
	NaOCl	30%	5 min.
	EtOH	96%	30 sec.
OS III	EtOH	96%	30 sec.
	steriles H ₂ O		30 sec.
	NaOCl	25%	5 min.
	EtOH	96%	30 sec.
	4x steriles H ₂ O		1 - 2 min.
OS IV	Formaldehyd	37%	3 min.

2.1.3 Herstellung der verwendeten Nährmedien

Es wurden ein Malzagar-Medium (Leuchtmann, 1984; verändert) und ein nährstoffarmes Flüssigmedium ohne Agar hergestellt und beimpft. Das Agar-Medium wurde außerdem in einem Versuchsansatz mit Streptomycin und/oder Rose Bengal, versetzt (siehe Tab. 3), um Kontaminationen durch Bakterien auszuschließen. Da auch das antibiotikumfreie Medium M I in der Kontrolle nicht kontaminiert war und nach Davies et al. (1964) Streptomycin zu Lesefehlern während der Polypeptid-Synthese führen kann, wurde im späteren Verlauf der Arbeit auf die Zugabe von Streptomycin und Rose Bengal zu den Nährmedien verzichtet. Nach einigen ersten Versuchsansätzen wurde auf die Medien M II-M IV verzichtet und ausschließlich mit M I weitergearbeitet. Sämtliche Medien wurden mit entionisiertem Wasser hergestellt und unter Standardbedingungen autoklaviert.

Tab. 3: Bestandteile der Nährmedien: Bei den Methoden M I bis M IV handelt es sich um Malzagarmedien mit verschiedenen antibiotischen Zusätzen, bei M V um ein nährstoffarmes Flüssigmedium.

Methode M I									
Inhaltsstoffe Menge	Agar 10 g	Malz 10 g	Pepton 2 g	Hefe 2 g	Glucose- Monohydrat 4 g				
Methode M II									
Bestandteile Menge	Agar 10 g	Malz 1 0g	Pepton 2 g	Hefe 2 g	Glucose- Monohydrat 4 g	Streptomycin 1 g			
Methode M III									
Bestandteile Menge	Agar 10 g	Malz 10 g	Pepton 2 g	Hefe 2 g	Glucose- Monohydrat 4 g	Rose Bengal 6 mL			
Methode M IV									
Bestandteile Menge	Agar 10 g	Malz 10 g	Pepton 2 g	Hefe 2 g	Glucose- Monohydrat 4 g	Streptomycin 1 g	Rose Bengal 6 mL		
Methode M V									
Bestandteile Menge	Glucose- Monohyd rat 15 g	KH ₂ PO ₄ 50 g	(NH ₄)HPO ₄ 25 g	CaCl ₂ 5 g	NaCl 25 g	MgSO ₄ 15 g	ZnSO ₄ 3 g	Basofer 50 µL	Biotin 10 mg

2.1.4 Isolierung der Endophyten aus den Wirtspflanzen und Anlage von Kulturen

Die oberflächensterilisierten Pflanzengewebeteile wurden unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell geschält, in kleine Teile geschnitten, auf vorbereitete Petrischalen appliziert, verschlossen und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Kontrolle wurden Petrischalen mit dem gleichen Nährmedium ohne Gewebestückchen aufgestellt, um sicherzustellen, daß es sich bei den heranwachsenden Pilzkulturen nicht um Kontaminationen durch Pilzsporen aus der Raumluft handelte. Nach ein bis zwei Tagen konnte bereits erstes Pilzwachstum beobachtet werden. Die Kontrollplatten hingegen waren frei von jeglichen Kontaminationen oder Verunreinigungen. Nach 7 Tagen wurden die Pilzkulturen auf je 50 Platten mit demselben Nährmedium überimpft und so die einzelnen Stämme voneinander getrennt.

2.2 Charakterisierung der untersuchten Pilzstämmе

2.2.1 Molekularbiologische Charakterisierung

2.2.1.1 Extraktion der DNA & Detektion

Für die Extraktion der DNA wurde Myzel mit einem sterilen Spatel von den Pilz-Kulturen abgekratzt und in Eppendorf-Gefäße überführt. Aufgrund der Verwendung des kommerziellen Extraktions-Kits "Invitak Plant DNA Extraction" wurden weiteren Schritte nach Herstellerprotokoll durchgeführt, unter zusätzlicher Beigabe von fünf Glasperlen und zwei Spatelspitzen Quarzsand. Um die Zellwände aufzubrechen, erfolgte für 20 min. eine Behandlung in der Kugelmühle bei 30 Hz. Die Proben wurden über Nacht bei 55°C und 800rpm in einem Thermomixer inkubiert und anschließend eine Minute lang zentrifugiert. Der in 1,5mL-Röhrchen überführte Überstand wurde mit dem selben Volumen an Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) aufgefüllt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min., mit anschließender Überführung der oberen Phase in ein weiteres 1,5mL-Röhrchen. Eine Ausfällung der DNA wurde durch die Zugabe von einem

Teil 3M Natriumacetat und zwei Teilen Isopropanol erreicht. Eine Zentrifugation des Niederschlags erfolgte nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene DNA-Pellet zweimal mit 100µL 70% Ethanol gewaschen und nochmals 10 min. zentrifugiert. Dem Lufttrocknen des Pellets bei 55°C folgte eine Lösung in 50mL Tris-HCl (pH = 7,5) bei 55°C und 1000rpm im Thermomixer. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei einer Umdrehung von 13.000 rpm. Zur Reinigung des Extraktions-Produktes wurde der kommerzielle Kit "Invisorb® Spin PCrapid Kit" verwendet und nach Herstellerprotokoll verfahren. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei -20°C.

DNA-Extrakte und PCR-Produkte wurden zur Überprüfung von Ausbeute und Auftrennung einer Gelelektrophorese mit 1% Agarose-Gel und GelRed™ unterzogen (0,5x TAE Puffer, 90 V, 25 min.). Als Größenstandard wurde GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder verwendet.

2.2.1.2 Amplifikation der DNA & Sequenzierung

Die pilzspezifischen Primer ITS1/ITS4 wurden zur Amplifikation der Pilz-DNA mittels PCR verwendet. Für die Amplifikation der DNA-Extrakte wurden 1 x Taq Puffer + (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 200 mM jeder dNTP, 0.8 µg/µL BSA, 1% DMSO, 0.5 µL jeder Primers und 1 µL jeder extrahierten Probe verwendet. Nach dem ersten Denaturierungsschritt (95°C, 120 sec.) wurden 40 Reaktionszyklen nach dem folgenden Profil durchlaufen: 95°C für 30 sec., 54°C für 30 sec. 72°C für 90 sec. Die abschließende Elongation erfolgte bei 72°C für 10 Minuten und anschließender Kühlung auf 4°C.

Die Sequenzierung der ribosomalen DNA beruht auf der Didesoxykettenabbruchmethode, bei der durch den Einbau der im Nukleotidgemisch vorhandenen Didesoxynukleotide ein zufälliger Abbruch der Elongation der DNA-Strang-Synthese erfolgt. Die daraus hervorgehenden Produkte sind unterschiedlich groß und binden an einen für jede Base spezifischen Fluoreszenzfarbstoff. Die Produkte können so nach elektrophoretischer Auftrennung in einer Gelmatrix durch die Anregung eines Lasers detektiert werden. Der Reaktionsansatz des Cycle Sequencing Master Mix bestand aus

8 µL PCR-Produkt, 1 µL Big Dye und 1 µL Primer. Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden von einem automatischen Sequenzierungssystem analysiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software SeqMan assembled und für die BLAST-Suche in der NCBI-Genbank eingesetzt.

2.2.2 Morphologische Charakterisierung

Die makroskopische Beurteilung erfolgte optisch durch Betrachtung folgender Merkmale: Farbe der Kulturen, Verfärbungen des Agars, die Oberflächenbeschaffenheit der Thalli, Wachstumsgeschwindigkeit und Kulturverhalten. Das für die mikroskopische Bestimmung wichtigste Merkmal ist das Vorhandensein von Sporen und Konidienträgern, andernfalls ist eine Bestimmung nicht möglich. Waren nur Hyphen vorhanden, wurde versucht, die Pilz-Kultur durch Bestrahlen mit langwelligem UV-Licht (256 nm) zum Sporulieren anzuregen. Für die weitere Bestimmung wurden mikroskopische Präparate mit Thallus-Stückchen des Pilzes unter Verwendung von Wasser als Einschlussmittel angefertigt. Eine bessere Kontrastwirkung konnte durch die Zugabe eines Tropfens Baumwollblau (Lactophenol und Anilinblau) erreicht werden. Das weitere Herausarbeiten charakteristischer Merkmale erfolgt mit einem Bestimmungsschlüssel, wobei eine Bestimmung auf Gattungsniveau, seltener auf Artniveau möglich ist (Petrini & Petrini, 2010).

2.2.3 Physiologische Charakterisierung

2.2.3.1 Competitionstests

Die Durchsetzungsfähigkeit bzw. Dominanz der Pilzkulturen wurde mittels Competitionstests festgestellt (Yuen et al., 1999). Dabei wurden alle isolierten Endophyten gegeneinander als auch gegen *Cladosporium sphaerospermum* verglichen. Zur Durchführung dieser Tests wurden je zwei Myzelstücke mit einem Durchmesser von 5 mm auf einer Agarplatte mit 8,5 cm Durchmesser in einem Abstand von 4 cm platziert

und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch optische Beurteilung der Koloniemorphologie. Interaktionen wie das Überwachsen eines Pilzes, Wuchshemmung, die Ausbildung von Hemmhöfen etc. wurden in Interaktionstypen eingeteilt. Auf Basis dieser Interaktionstypen wurde Punkte für jeden Pilz vergeben, die Punktesumme eines jeden Pilzes ergibt den Antagonismusindex (Yuen et al, 1999; Ernst 2005; modifiziert).

Tab. 4: Interaktionstypen zur Erstellung eines Punktesystems: Die Beurteilung der Koloniemorphologie erfolgte optisch. Nach Einordnung jedes Pilzes in einen Interaktionstyp werden Punkte zur Erstellung eines Antagonismusindex vergeben.

Interaktion	Punkte für Pilz	Punkte für Kompetitor	Typ
Pilz überwächst Kompetitor	6	0	A
Pilz hemmt und umwächst Kompetitor	5	1	B
Pilz hemmt Kompetitor	4	2	C
Pilz und Kompetitor sind gehemmt	3	3	D ₁
Pilz und Kompetitor wachsen ineinander	3	3	D ₂

2.2.3.2 Temperaturoptimum

Um ein Temperaturoptimum für die Pilz-Isolate zu bestimmen, wurde die Wuchsgeschwindigkeit jedes Pilzes in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Die isolierten Endophyten als auch *Cladosporium sphaerospermum* als Kontrollgruppe wurden jeweils auf zwei Agarplatten inokuliert und bei 4°C, 10°C, 25°C und 37°C unter Lichtausschluss drei Wochen gelagert. Die Auswertung erfolgte nach 7, 14 und 21 Tagen, indem die Wuchsstrecke ausgemessen und die durchschnittliche Wuchsgeschwindigkeit in mm pro Tag berechnet wurde.

2.2.3.3 Wuchsverhalten bei Zugabe des Pflanzenextraktes

Um das Wuchsverhalten der Pilze bei Zugabe des Pflanzenextraktes zu untersuchen, wurden je 10 mg der Pflanzenextrakte von *Alpinia malaccensis* und *Curcuma* sp. in die

Medien eingearbeitet. Dazu wurden die Methanol-Extrakte zur Trockene gebracht, in Aceton aufgenommen und auf die Agarplatten appliziert. Um ein vollständiges Verdunsten des Lösungsmittels zu gewährleisten, wurden die Endophyten und *Cladosporium sphaerospermum* erst nach 24 Stunden inokuliert. Über drei Wochen hinweg wurde wöchentlich jeweils eine Kultur jedes Pilzes entnommen und die Wuchsstrecke und die Masse des Ethylacetat-Extraktes berechnet. Als Kontrollgruppe dienten dieselben Pilzkulturen auf normalen Agar-Medien ohne Pflanzenextrakt.

2.2.4 Phytochemische Charakterisierung

2.2.4.1 Extraktion der Pilz-Kulturen und Pflanzen

Nach zwei bis vier Wochen wurden sämtliche Platten der einzelnen Pilzstämme vereinigt, mit 1000 mL Ethylacetat übergossen, mit einem Pürrierstab zerkleinert und über Nacht stehen gelassen. Der Extrakt wurde anschließend filtriert, der Rückstand des Myzels und des Nährmedium verworfen. Der Ethylacetat-Extrakt wurde am Rotavapor trocken rotiert, in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und im Schütteltrichter dreimal mit 30 mL destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Die Wasser-Phase enthielt dieselben Inhaltsstoffe wie die Dichlormethan-Phase, aber in wesentlich geringerer Konzentration und wurde daher nicht weiter verwendet, sondern bei -20°C gelagert. Die Dichlormethan-Phase wurde abermals einrotiert, mit Methanol auf eine Konzentration von 10 mg/mL eingestellt und bis zur weiteren Bearbeitung ebenfalls bei -20°C aufbewahrt. Von denselben Pflanzen und Pflanzenteilen, aus denen die Endophyten isoliert worden waren, wurden Extrakte nach derselben Methode hergestellt wie unter 2.3.1 beschrieben.

2.2.4.2 Analytische Methoden

2.2.4.2.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Eine Auftrennung der Extrakte erfolgte über die HPLC. Mit dem UV-Diodenarraydetektor der HPLC werden die UV-VIS-Spektren aufgenommen und mit der internen UV-Spektrenbibliothek mit bereits bekannten Substanzen verglichen.

Gerät: Agilent 1100 Series mit UV-Diodenarraydetektor

Säule: Agilent Hypersil® BDS-C 4.6 x 250 mm, 18.5 µm

Laufmittel: Gemisch aus wässrigem Puffer (o-Phosphorsäure 0.015 mol und Tetrabutylammoniumhydroxid 0.0015 mol, pH = 3, nach Reisch et al., 1990; verändert) und MeOH (Gradient-grade), Flow 1 mL/min, siehe Tab. 5

Probe: Gesamtextrakt in Konzentration von 10 mg/mL MeOH, über Merck Kieselgel RP-8 (Korngröße 25-40µm) filtriert, Einspritzvolumen 10 µL

Tab. 5: Laufmittelgradient für HPLC

Zeit [min.]	MeOH [Vol.%]
0	20
3	20
25	100
35	100

2.2.4.2.2 Dünnschichtchromatographie

Verwendet wurden folgende Dünnschichtplatten: ALUGRAM/SIL G/UV 254 (0.20 mm Schichtdicke, Kieselgel 60, Machery-Nagel GmbH & CO.KG). Als Laufmittel wurde ein Gemisch von Diethylether, Petrolether und Methanol im Verhältnis 60:40:1 verwendet. Für die Detektion der Inhaltsstoffe mit chromophoren Gruppen wurde die Dünnschichtplatte anschließend unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm

(fluoreszenzlöschende Eigenschaft der Substanz) und 366 nm (Eigenfluoreszenz der Substanz) analysiert und photographiert. Abschließend wurde die Platte mit Anisaldehyd (85 mL Methanol, 10 mL Eisessig, 8 mL Schwefelsäure, 0.5 mL Anisaldehyd) (Krebs et al., 1967) besprüht und erhitzt, um auch Substanzen ohne chromophore Gruppen zu detektieren. Der R_f -Wert wurde als Quotient der Wanderungsstrecke des Analyten und des Laufmittels ermittelt.

2.2.4.3 Präparative Methoden

2.2.4.3.1 Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur Nachreinigung und weiteren Trennung von Substanzgemischen wurde die präparative Dünnschichtchromatographie (TLC Silica gel 60 F254 glassplates 20 x 20 cm) angewendet. Die Banden der einzelnen Komponenten wurden ausgekratzt, das Kieselgel abgenutscht. Die erhaltenen Reinstoffe wurden auf eine Konzentration von 1 mg/mL Methanol eingestellt. Um die Reinheit der Substanzen zu überprüfen, erfolgten weitere HPLC-Messungen und Dünnschichtchromatographien. Als Laufmittelgemisch wurde dasselbe Gemisch, wie unter 2.2.4.2.2 beschrieben, verwendet.

2.2.4.3.2 Säulenchromatographie

Mit einer Kieselgelsäulenchromatographie (Länge 70 cm, Durchmesser 20 mm, 60 g Kieselgel 60, Korngröße 0,2-0,5 mm) wurde eine erste Auftrennung der Extrakte durch Elution mit steigenden Polaritäten der Lösungsmittel (siehe Tab. 6) erreicht. Dabei wurden jeweils 50 mL-Fractionen geschnitten und diese anschließend am Rotavapor bei 30-40°C eingengt, gewogen und auf eine Konzentration von 5 mg/mL eingestellt. Außerdem wurde für jede Fraktion eine HPLC-Messung sowie eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

Mit Sephadex LH-20 wurden Stoffgemische nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie sowie der Adsorption aufgetrennt, Eluent war reines Methanol.

Tab. 6: Laufmittel für Säulenchromatographie: Begonnen wird mit dem sehr unpolaren Petrolether, dem langsam steigende Mengen Ethylacetat beigemischt werden. Gegen Ende wird mit dem sehr polaren Methanol eluiert.

Petrolether (PE) [mL]	Ethylacetat (EtOAc) [mL]	Methanol (MeOH) [mL]	Fractionen
100	-	-	I/1, I/2
90	10	-	II/1, II/2
80	20	-	III/1, III/2
70	30	-	IV/1, IV/2
60	40	-	V/1, V/2
50	50	-	VI/1, VI/2
40	60	-	VII/1, VII/2
30	70	-	VIII/1, VIII/2
20	80	-	IX/1, IX/2
10	90	-	X/1, X/2
-	100	-	XI/1, XI/2
-	-	100	XII/1, XII/2

2.3 Untersuchung auf biologische Aktivität

Um die antifungale und insektizide Wirkung der Gesamtextrakte und Reinstoffe zu untersuchen, wurden eine Dünnschichtbioautographie mit Pilzsporen von *Cladosporium sphaerospermum* und Fraßversuche mit *Spodoptera littoralis*, der Ägyptischen Baumwolleneule, durchgeführt.

2.3.1 Dünnschichtbioautographie

Die zu testenden Substanzen und Substanzgemische wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und nach dem Verdampfen des organischen Lösungsmittels mit einer Pilzsporensuspension des Pilzes *Cladosporium sphaerospermum* Penz. (Penzig, 1882) besprüht. Zur Sporengewinnung wurde das sporulierende Myzel von

Cladosporium sphaerospermum mit 0,9% NaCl-Lösung überschichtet und über steriler Glasswolle filtriert. Die Lagerung des in Malz-Bouillon aufgenommenen Filtrats erfolgte bis zur weiteren Verwendung in Cryo-Röhrchen bei -80°C. Aufgrund der Ausbildung dunkler und daher gut sichtbarer Sporen sowie der hohen Empfindlichkeit gegenüber vielen Sekundärstoffen handelt es sich dabei um einen effektiven Testorganismus. Um das Auskeimen der Sporen zu gewährleisten, wurde die Platte unter Lichtausschluss bei 90% Luftfeuchtigkeit ca. 3 Tage gelagert. Danach war die Platte mit einem dunkelgrauen Pilzrasen bewachsen. Antifungale Substanzen waren an den vom Pilz nicht bewachsenen Hemmhöfen zu erkennen (Engelmeier, 1997; Engelmeier, 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Substanzen wurden vor dem Auftragen auf die Dünnschicht-Platte auf die selbe Konzentration (10 mg/mL) eingestellt, um die Ergebnisse entsprechend vergleichen zu können. Zusätzlich wurde eine normale Dünnschichtchromatographie mit denselben Substanzen und demselben Laufmittel als Kontrolle mit Anisaldehyd detektiert. In beiden Fällen wurde ein Diethylether-Petrolether-Methanol-Gemisch im Verhältnis 60:40:1 als Laufmittel verwendet.

2.3.2 Non-choice Fraßversuche an *Spodoptera littoralis*

Um die Toxizität der Extrakte und Reinstoffe zu untersuchen, wurden "Non-choice" Fraßversuche an Larven von *Spodoptera littoralis*, der Ägyptischen Baumwolleneule, durchgeführt. Die Raupen von *Spodoptera littoralis* werden unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet und mit Kunstfutter ernährt. Für die Versuchsdurchführung werden die zu testenden Substanzen in gefriergetrocknetes Nahrungspulver pipettiert, mit Aceton überschichtet und geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Testsubstanzen im Futter zu gewährleisten. Als Kontrollgruppe wird das Nahrungspulver nur mit Aceton überschichtet, aber es werden keine anderen Substanzen zugegeben. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird das Nahrungspulver mit Gentamycin, Agar und Wasser vermengt; die verfestigten Futterstücke werden anschließend in die Versuchsbehälter überführt. Auf jedes Futterstück werden 20 Raupen transferiert, die Petrischalen werden mit einem Baumwolltuch verschlossen und unter Lichtausschluss in einem Brutschrank bei 26°C und einer Luftfeuchtigkeit von 90% 5 Tage gelagert. Für die

Auswertung werden die relative Überlebensrate und die relative Wachstumsrate bestimmt, wodurch sowohl toxische als auch wachstumshemmende Wirkungen erfasst werden können (Brem, 2002).

2.4 Liste der verwendeten Geräte, Chemikalien und Software

Tab. 7: Bestandteile der Nährmedien M I - M V

Bestandteile für Nährmedien	Artikel-Nr.	Hersteller
Agar-Agar	05040	Fluka Analytical AG
Malzextrakt für Mikrob.	5F004114	AppliChem GmbH
Pepton aus Sojamehl	1.07212.0500	Merck KGaA
D-Glucose-Monohydrat p.a.	488180	Loba Feinchemie AG
Hefeextrakt	70161	Fluka Analytical AG
Streptomycin	S2522	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rose Bengal	330000	Sigma-Aldrich
Basofer	-	Apotheke
Biotin	B7014	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat	1048729025	Merck KGaA
Ammoniumdihydrogenphosphat	1011260500	Merck KGaA
Calciumchlorid	C1016-500G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid	1064040500	Merck KGaA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1725729025	Merck KGaA
Zinksulfat-Heptahydrat	1088830500	Merck KGaA

Tab. 8: Lösungsmittel & Chemikalien für phytochemische Analysen

Lösungsmittel & Chemikalien	Artikelnummer	Hersteller
Methanol p.a. (MeOH)	W68421	Fisher Scientific AG
Diethylether p.a. (Et ₂ O)	3942.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Petrolether p.a. (PE)	T173.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dichlormethan (CH ₂ Cl ₂)	1.060.502.500	Merck KGaA
o-Phosphorsäure (o-H ₃ PO ₄)	6366.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tetrabutylammoniumhydroxid	86854	Fluka Analytical AG
Aceton p.a. (C ₃ H ₆ O)	9372.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhypochlorit	-	Lebensmittelhandel
Ethanol (EtOH)	NC9602322	Fisher Scientific AG
Schwefelsäure	5273.4	Carl Roth GmbH & Co. KG
Essigsäure	W64254	Fisher Scientific AG
Anisaldehyd	7201.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Formaldehyd	4979.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Baumwollblau	C.I. 42780	Carl Roth GmbH & Co. KG

Tab. 9: Kunstfutter für *Spodoptera*-Larven für Fraßversuche

Kunstfutter für Spodoptera	Artikelnummer	Hersteller
Ascorbinsäure	3525.3	Carl Roth GmbH & Co. KG
Nipagin	H-2128	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Mittelbohnen, weiß	-	Lebensmittelhandel
Hefe	-	Lebensmittelhandel

Tab. 10: Geräte & Chemikalien für molekularbiologische Untersuchung

DNA-Sequenzierung	Artikelnummer	Hersteller
Kugelmühle	MM301	Retsch GmbH
PCR-Maschine	-	Biometra BmbH
Extraction Kit	10371002	Invitek GmbH
Thermomixer	5350 000.013	Eppendorf AG
Zentrifuge	5415D	Eppendorf AG
Purification Kit	10202004	Invitek GmbH
DNA-Größenstandard	SM0311	Fermentas GmbH
Taq-Polymerase	EP0404	Fermentas GmbH

Tab. 11: Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	KELOmat Haushaltsgeräte
Reinraumbank	Ehret GmbH & CO. KG
Magnetrührer	Framo Gerätetechnik
Rotationsverdampfer	Büchi Laboratoriums-Technik AG
Trockenschrank	WTB Binder Labortechnik AG
Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co. KG
UV-Lampe	Camag Laboratory
Waage	Mettler-Toledo GmbH
Analysen-Waage	Mettler-Toledo GmbH
Reinstwassersystem	Millipore GmbH
HPLC	Agilent Technologies GmbH

Tab. 12: Sonstiges

Sonstiges	Hersteller
Analytische Dünnschichtplatte	Machery-Nagel GmbH & Co. KG
Präparative Dünnschichtplatte	Merck KGaA
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel Gläser GmbH & Co.KG
Deckgläser 18x18mm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Petrischalen 8,5cm	Greiner Bio-One GmbH
Kieselgel	Merck KGaA
Sephadex	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

3 Mykotoxine

Von Pilzen produzierte, sekundäre Stoffwechselprodukte mit toxischer Wirkung werden zumeist als Mykotoxine bezeichnet und sind im Zusammenhang mit endophytischen Pilzen zumindest teilweise für die häufig entstehende Toleranz gegenüber biotischen Streßfaktoren der Pflanze verantwortlich (Zabalgoitia, 2008). Heute sind über 700 Mykotoxine bekannt, die von ca. 300 Pilzarten synthetisiert werden. Die enzymatische Spezifität von Sekundärmetaboliten in Pilzen ist gering, dennoch entsteht die enorme Vielfalt an Mykotoxinen nur über einige wenige grundlegende Biosynthesewege (Betina, 1989). Eine Abgrenzung der Mykotoxine von Antibiotika ist nicht möglich, Beahdy (1974) schlägt daher eine Zusammenfassung der Begriffe "Mykotoxin" und "Antibiotikum" vor, da Mykotoxine ebenso wie Antibiotika Sekundärmetaboliten sind und viele Mykotoxine antibiotische Wirkung haben. Voraussetzung für die Bildung dieser Substanzen ist der Abschluß der Wachstumsphase. Es muß somit ausreichend Biomasse gebildet werden und der Pilz muß auf einem für ihn geeigneten Substrat wachsen. Die chemische Struktur von Mykotoxinen ist stark divers. Zu finden sind einfache Pyrone, Anthrachinone, Lactone, Makrozyklen bis zu zyklischen Polypeptiden. Fast alle von Pilzen produzierten Toxine sind sowohl hitze- als auch säurestabil, können aber durch Laugen, starke Oxidationsmittel und UV-Licht inaktiviert werden (Roth et al., 1990). Zu den bekanntesten Mykotoxinen zählen das Penicillin (Abb. 4), welches von *Penicillium notatum* produziert und 1929 von Alexander Fleming entdeckt wurde, weiters Aflatoxin (Abb. 4), ein hochtoxisches Mykotoxin, welches vor allem von *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* produziert wird und häufig in kontaminierten Lebensmitteln zu finden ist, sowie die vom sogenannten Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* produzierten Ergotalkaloide, welche vor allem früher häufig über Getreide aufgenommen wurden und Auslöser der "Krankheit" Ergotismus sind (Müller & Löffler, 1992). Ergotalkaloide (Abb. 4) finden sich besonders häufig in Symbiosen von Endophyten mit Gräsern (siehe 1.2.5). In der vorliegenden Arbeit konnten aufgrund fehlender Referenzsubstanzen bedauerlicherweise keine Mykotoxine oder bioaktiven Stoffwechselprodukte isoliert werden, dennoch sollen zumindest einige bekannte Mykotoxine, die prinzipiell von den isolierten Pilzen synthetisiert werden können, und ihre Wirkungen erwähnt werden.

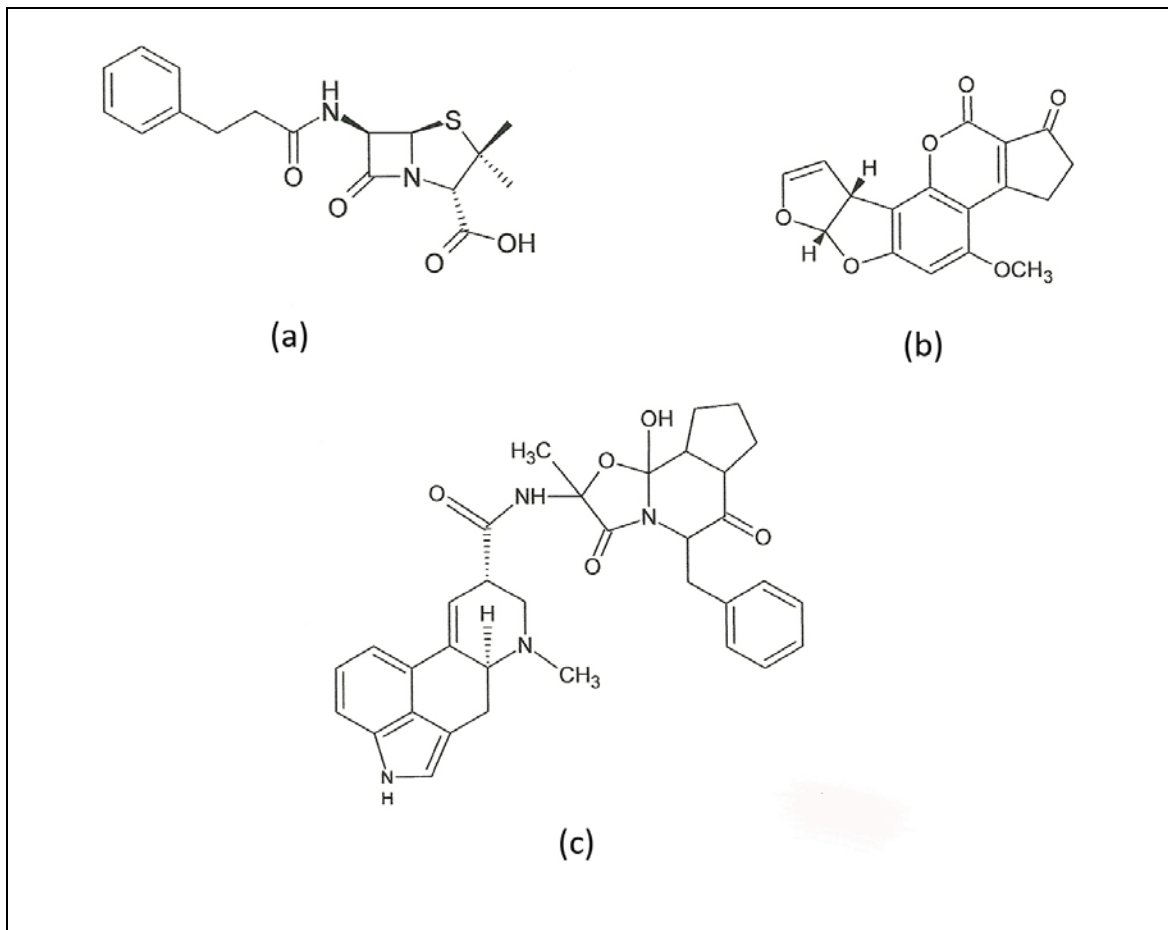


Abb. 4: Bekannte Mykotoxine: (a) Penicillin G (Strynadka et al, 1992); (b) Aflatoxin B₁ (Roth et al., 1990); (c) Ergotamin (Roth et al., 1990).

Wagener et al. (1980) konnten aus *Penicillium commune* Roquefortin C (Abb. 5) isolieren, außerdem konnte die Produktion von Penitrem A (Abb. 5) in *Penicillium commune* nachgewiesen werden. Beide Mykotoxine wirken neurotoxisch, führen also zu Muskelkrämpfen, wobei die Reizübertragung beeinträchtigt wird, wie dies in Versuchen an Eintagsküken nachgewiesen werden konnte. Ebenso wird Ochratoxin A (Abb. 5) produziert, welches aufgrund seiner akkumulativen Wirkung dauerhaft Leber- und Nierengewebe schädigt sowie die Bildung von Tumoren begünstigt. Dieses Mykotoxin tritt häufig in Getreideprodukten und getrockneten Früchten auf (Hoffmeister et al., 2006; Puntaric et al., 2001). Ein weiteres Mykotoxin aus *Penicillium commune*, die Cyclopiazonsäure (Abb. 5), wirkt hingegen antitumoral, wie Nicoletti et al. (2008) und Lugauskas et al. (2005) nachweisen konnten.

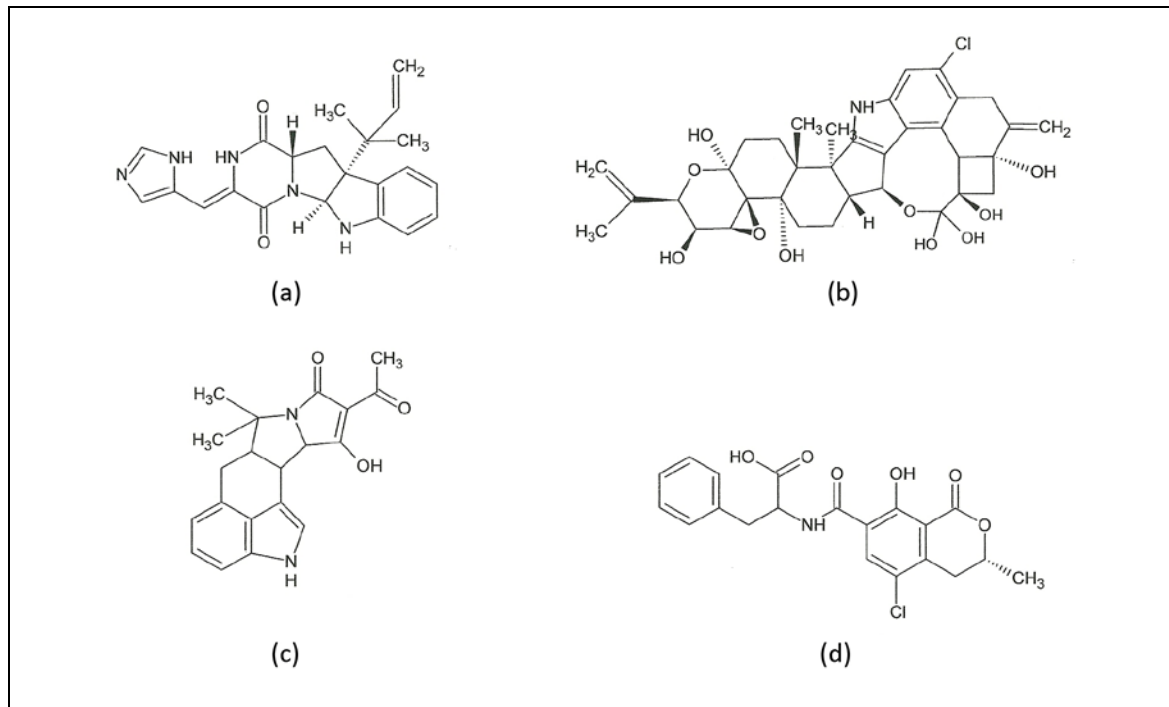


Abb. 5: Bekannte Mykotoxine von *Penicillium commune*: (a) Ochratoxin A (Roth et al., 1990); (b) Roquefortin C (Betina, 1989); (c) Cyclopiazonsäure (Betina, 1989); (d) Penitrem A (Betina, 1989).

Von *Neosartorya fischeri* produzierte Mykotoxine sind die Fumitremorgine A, B und C (Abb. 6), sowie Verruculogen (Abb. 6), welche zur Gruppe der Tremorgene zählen (Horie & Yamazaki, 1981; Nielsen et al., 1988). Steffan et al. (2009) konnten nachweisen, daß die Dioxygenase FmtOx1 den Umbau von Fumitremorgin B zu Verruculogen katalysiert. Nach Cho et al. (1994) führt Verruculogen ähnlich wie Fumitremorgin zu einer Störung der Präsynapsen und zu einer Hemmung der Aufnahme von γ -Aminobuttersäure, was zu Störungen des Zentralnervensystems bzw. der Koordination von Bewegungsabläufen führt.

Dulaney und Grey (1962) konnten aus mehreren *Penicillium*-Spezies, darunter auch *Penicillium turbatum*, das Mykotoxin Hadacidin (Abb. 7) isolieren, welches die Fähigkeit zur Hemmung des Wachstums menschlicher Adenokarzinome besitzt (Kaczka et al., 1962); später konnte von Ladino et al. (1989) die antiproliferative Wirkung auf Nierenzellen nachgewiesen werden. *Penicillium purpurogenum* produziert vor allem Rubratoxin B (Abb. 7) aus der Gruppe der Rubratoxine (Betina, 1989). Diese Substanz wirkt hauptsächlich hepatotoxisch, und es besteht Verdacht auf Carcinogenese (Roth et al., 1990). Symptome einer Rubratoxin-Vergiftung, auch "Rubratoxikose" genannt, sind weiters Läsionen der Niere sowie Blutungen in diversen Organen (Abbott, 2002).

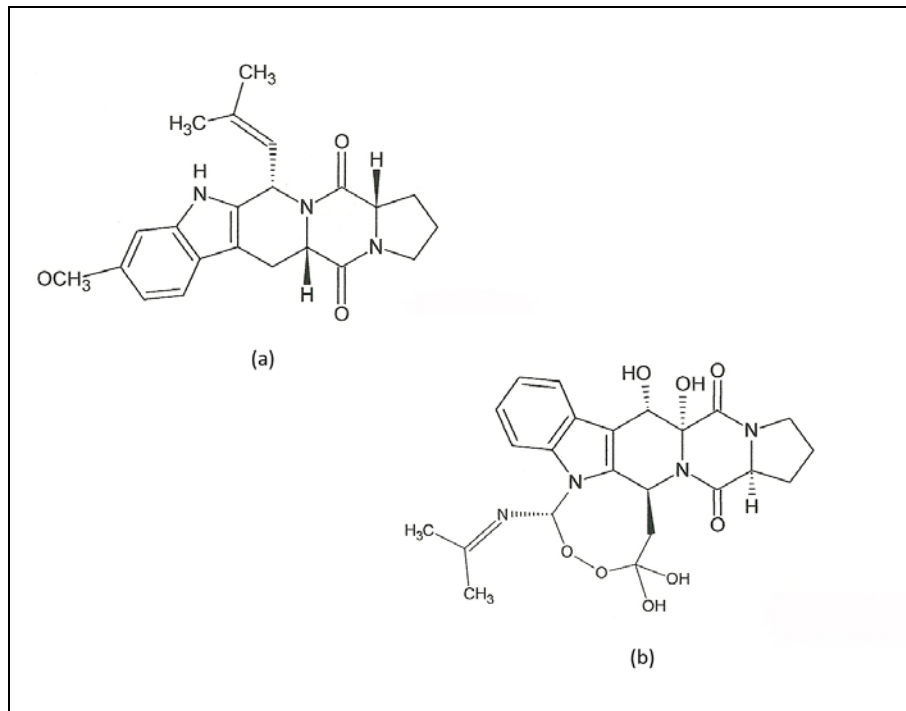


Abb. 6: Bekannte Mykotoxine von *Neosartorya fischeri*: (a) Fumitremorgin C; (b) Verruculogen (Horie & Yamazaki, 1981; Nielsen et al., 1988; Steffan et al., 2009).

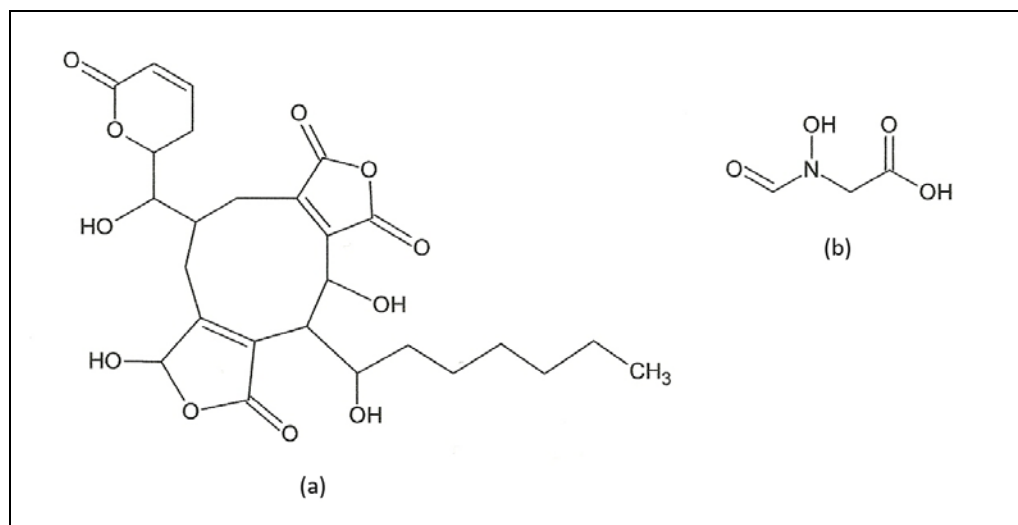


Abb. 7: Mykotoxine von *Penicillium turbatum* und *Penicillium purpurogenum*: (a) Rubratoxin B (Betina, 1989; Roth et al., 1990); (b) Hadacidin (Kaczka et al., 1962, Nicoletti et al., 2008).

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden nach Ermittlung effektiver Methoden zur Oberflächensterilisation von Pflanzengeweben und zur Kultivierung von Pilz-Isolaten insgesamt fünf Endophyten isoliert und kultiviert. Die Pilzkulturen konnten durch lichtmikroskopische Untersuchungen und DNA-Sequenzierung auf die Gattung, zum Teil auch auf die Art, bestimmt werden. Die CH₂Cl₂-Extrakte der einzelnen Pilz-Isolate wurden mittels HPLC-UV-Detektion und Dünnschichtchromatographie sowohl untereinander als auch mit den Inhaltsstoffprofilen der Rhizome und Wurzeln von *Alpinia malaccensis* und *Curcuma* sp., welche als Quellen für die Isolation der Endophyten dienten, verglichen. Die Durchführung von Fraßversuchen mit Larven von *Spodoptera littoralis* und Dünnschichtbioautographien mit *Cladosporium sphaerospermum* sollten Auskunft über das bioaktive Potential der isolierten Endophyten geben. Zur physiologischen Charakterisierung wurden mit den Isolaten Kompetitionstests durchgeführt, um ihre Dominanz und Konkurrenzfähigkeit in Anwesenheit eines anderen Pilzes zu beobachten. Weiters wurde untersucht, ob die Anwesenheit der Pflanzenextrakte in den Kulturmedien sowie unterschiedliche Inkubationstemperaturen das Wuchsverhalten der Endophyten beeinflussen.

4.1 Molekularbiologische Charakterisierung

Mit den DNA-Sequenzen der Pilz-Isolate wurde eine Blast-Suche in der NCBI-Genbank (National Center for Biotechnology Information) durchgeführt. Angegeben sind jeweils die ersten zehn Accession-Nummern mit dem höchsten Score-Wert und der höchsten Übereinstimmung mit der Sequenz des Isolats. Bis auf EP3, welcher der Gattung *Neosartorya* Malloch & Cain angehört, handelt es sich bei allen anderen Isolaten um Vertreter der Gattung *Penicillium* Link.

4.1.1 Pilz-Isolat EP1

Tab. 13: Blast-Suche für EP1: Da dieser Pilz ursprünglich Isolat EP2 entnommen wurde und die DNA-Sequenzen bis auf zwei Basen identisch sind, kann davon ausgegangen werden, daß es sich nicht wie anfänglich angenommen um eine Kontamination, sondern wie bei Isolat EP2 um *Penicillium commune* handelt.

Accession	Description	Max. score	Max. ident
GU566211.1	<i>Penicillium</i> sp.	1009	98%
AM901807.1	Uncultured ascomycete	1009	98%
EU030337.1	<i>Penicillium commune</i>	1003	98%
DQ132814.1	<i>Penicillium commune</i>	1002	98%
GQ120969.1	<i>Penicillium</i> sp.	1000	98%
GQ458026.1	<i>Penicillium commune</i>	998	98%
X82361.1	<i>Penicillium crustosum</i>	998	98%
EU497946.1	<i>Penicillium camemberti</i>	994	98%
AF455527.1	<i>Penicillium commune</i>	994	98%
AF455418.1	<i>Penicillium commune</i>	994	98%

4.1.2 Pilz-Isolat EP2

Tab. 14: Blast-Suche für EP2: Die Sequenz des Isolats stimmt bis auf fünf Basen mit *Penicillium commune* (DQ132814.1) überein und ergibt eine maximale Sequenz-Identität von 99%. Die Identifizierung des Pilzes als *Penicillium commune* kann daher als gesichert angenommen werden.

Accession	Description	Max. score	Max. ident
GU566211.1	<i>Penicillium</i> sp.	1026	98%
AM901807.1	Uncultured ascomycete	1026	98%
EU030337.1	<i>Penicillium commune</i>	1016	98%
GQ458026.1	<i>Penicillium commune</i>	1014	98%
DQ132814.1	<i>Penicillium commune</i>	1014	99%
GQ120969.1	<i>Penicillium</i> sp.	1013	98%
GQ458039.1	<i>Penicillium camemberti</i>	1009	98%
GQ458020.1	<i>Penicillium camemberti</i>	1009	98%
AF236103.1	<i>Penicillium commune</i>	1009	98%
X82361.1	<i>Penicillium crustosum</i>	1009	98%

4.1.3 Pilz-Isolat EP3

Tab. 15: Blast-Suche für EP3: Es handelt sich dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit um *Neosartorya fischeri*, wie die ersten drei Suchergebnisse der Blast-Suche zeigen. Die ebenfalls hohe Übereinstimmung mit *Aspergillus fumigatus* beruht auf der Tatsache, daß es sich dabei um die anamorphe Form von *Neosartorya fischeri* handelt.

Accession	Description	Max. score	Max. ident
AF455541.1	<i>Neosartorya fischeri</i>	1020	97%
AF455538.1	<i>Neosartorya fischeri</i>	1020	97%
AB369900.1	<i>Neosartorya fischeri</i>	1014	97%
FJ878682.1	<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	1009	97%
U18355.1	<i>Neosartorya fischeri</i>	1005	97%
FJ624264.1	<i>Neosartorya fischeri</i>	1000	97%
GU566242.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	987	96%
AY373894.1	<i>Neosartorya fischeri</i>	987	97%
GU566217.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	981	96%
GQ461909.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	979	96%

4.1.4 Pilz-Isolat EP4

Tab. 16: Blast-Suche für EP4: Aufgrund der hohen Übereinstimmung von 99% mit *Penicillium turbatum* kann die Identifizierung des Isolats als *Penicillium turbatum* als gesichert betrachtet werden.

Accession	Description	Max. score	Max. ident
AY213679.1	<i>Penicillium turbatum</i>	1051	99%
EF434072.1	<i>Uncultured fungus clone</i>	1048	99%
AF034454.1	<i>Penicillium turbatum</i>	1038	99%
AF033481.1	<i>Eupenicillium baarnense</i>	1038	99%
AJ004820.1	<i>Penicillium</i> sp.	1024	98%
DQ681326.1	<i>Penicillium camemberti</i>	1022	98%
DQ681327.1	<i>Penicillium camemberti</i>	1020	98%
DQ339570.1	<i>Penicillium dipodomyicola</i>	1020	98%
DQ339557.1	<i>Penicillium griseofulvum</i>	1020	98%
DQ339553.1	<i>Penicillium griseofulvum</i>	1020	98%

4.1.5 Pilz-Isolat EPC

Tab. 17: Blast-Suche für EPC: Die höchste Übereinstimmung hat das Isolat mit *Penicillium purpurogenum*. Ob es sich dabei möglicherweise um die unbekannte anamorphe Form des teleomorphen *Penicillium purpurogenum* handelt, erfordert weitere Untersuchungen.

Accession	Description	Max. score	Max. ident
EU427301.1	<i>Penicillium purpurogenum</i>	1781	95%
DQ123635.1	<i>Penicillium</i> sp.	1772	94%
DQ308554.1	<i>Penicillium diversum</i>	1762	94%
DQ308553.1	<i>Penicillium diversum</i>	1762	94%
EF200083.1	<i>Penicillium</i> sp.	1748	94%
EF200075.1	<i>Penicillium</i> sp.	1724	94%
EF200092.1	<i>Penicillium</i> sp.	1711	94%
FJ430753.1	<i>Penicillium</i> sp.	1637	93%
AF510496.1	<i>Penicillium verruculosum</i>	1615	92%
FJ430754.1	<i>Penicillium</i> sp.	1591	92%

4.2 Vergleich verschiedener Medien und Oberflächensterilisationsmethoden

Der Vergleich der beiden Kulturmedien ergab, daß das nährstoffarme Flüssigmedium M V (siehe Tab. 18) für die Kultivierung der isolierten Endophyten ungeeignet war. Von den fünf getesteten Pilz-Isolaten konnte nur *Neosartorya fischeri* (EP3) geringfügig auf dem Flüssigmedium wachsen, die restlichen Isolate konnten hingegen ausschließlich auf Malzagar-Medien wachsen. Isolat EP3 wurde auf jeweils 2 L Malzagar- und Flüssigmedium inokuliert und nach 10 Tagen extrahiert. Für das Agarmedium ergab sich ein Gesamtextrakt von 777,3 mg; für das Flüssigmedium hingegen nur 94,7 mg (siehe Tab. 18). Da die Methode MI, das Malzagarmedium, wesentlich effektiver als das nährstoffarme Flüssigmedium M V ist, wurde letzteres verworfen und weitere Versuche nur mehr mit M I durchgeführt. Ein Vergleich der verschiedenen Oberflächensterilisationsmethoden (Tab. 2) zeigte, daß Methode OS III aufgrund der Anzahl der isolierten Endophyten und dem Ausbleiben von Kontaminationen durch Hefen oder Bakterien die effektivste war. Der parallel durchgeführte "Vitality-Test" (siehe 2.1.2) verlief ebenfalls negativ.

Tab. 18: Vergleich der Kulturmedien: Verglichen wurde die Menge des jeweiligen Gesamtextraktes in mg. Für M I betrug die Ausbeute an Gesamtextrakt ein Vielfaches der mit Methode M V erreichten Ausbeute.

Methode	Gesamtextrakt [mg]
M I	777,3mg
M V	94,7mg

4.3 Makro-, mikroskopische und physiologische Charakterisierung

4.3.1 Makro- und mikroskopische Charakterisierung

Die makroskopischen Merkmale der isolierten Endophyten waren stark divers. *Penicillium commune* (EP1) als asexuelles Stadium von *Penicillium commune* (EP2) bildete weiße, watteartige Thalli, welche stark in die Höhe wuchsen; EP2 hingegen beigefarbene bis grüne, deren Oberfläche anfänglich samtig, später aufgrund der starken Sporenbildung staubig erschien. *Neosartorya fischeri* (EP3) bildete ebenfalls Kulturen von weißer Farbe und watteartiger Konsistenz, wobei sich im Verlauf aber cremefarbene bis hellrosa Sporen entwickelten. Die Thalli von *Penicillium turbatum* (EP4) erschienen samtig, wuchsen flach auf dem Medium und waren ebenso wie die gebildeten Sporen von weißer Farbe. *Penicillium purpurogenum* (EPC) war von filamentöser Konsistenz und weißer bis grauer Farbe, zu den Rändern hin jedoch beige bis rotbraun. Verfärbungen des Agars wurden nur bei Isolat EPC festgestellt, wo sich der Agar bis zu 3 mm vom Thallus entfernt rötlich-braun verfärbte (siehe Tab. 19).

Bedauerlicherweise war es nicht möglich, die Arten der Isolate mikroskopisch zu bestimmen. Die mikroskopische Identifizierung von Pilzen ist schwierig und hängt vor allem davon ab, ob Sporen und Konidienträger vorhanden sind. Erschwerend kommt hinzu, daß von vielen Arten nur das teleomorphe (sexuelle Fruktifikationsform) oder das anamorphe (asexuelle Fruktifikationsform) Stadium bekannt sind. Versuche, *Penicillium commune* (EP1) und *Penicillium purpurogenum* (EPC) durch Bestrahlen mit UV-Licht zum Sporulieren anzuregen, blieben erfolglos. Die restlichen Isolate bildeten zwar Sporen,

jedoch konnten keine Konidienträger beobachtet werden. Die Kulturen konnten daher nur molekularbiologisch charakterisiert werden.

Tab. 19: Isolierte Endophyten

Bezeichnung	Morphologie	Art	Isoliert aus
EP1		<i>Penicillium commune</i>	<i>Alpinia malaccensis</i>
EP2		<i>Penicillium commune</i>	<i>Alpinia malaccensis</i>
EP3		<i>Neosartorya fischeri</i>	<i>Alpinia malaccensis</i>
EP4		<i>Penicillium turbatum</i>	<i>Alpinia malaccensis</i>
EPC		<i>Penicillium purpurogenum</i>	<i>Curcuma sp.</i>

4.3.2 Physiologische Charakterisierung

4.3.2.1 Einfluss verschiedener Pflanzenextrakte auf die Wuchsgeschwindigkeit

Auffällig in Abb. 8 ist, daß vor allem bei *Penicillium commune* (EP2) und *Penicillium purpurogenum* (EPC) Unterschiede in der Wuchsgeschwindigkeit je nach verwendetem Medium auftraten. So wächst *P. commune* (EP2), ein aus dem Rhizom von *Alpinia malaccensis* isolierter Endophyt, auf dem *Alpinia*-Extrakt-Medium nicht nur besser als auf dem *Curcuma*-Extrakt-Medium, sondern sogar besser als in der Kontrolle. Ein ähnliches Ergebnis liegt bei *P. purpurogenum* (EPC) vor. Zwar wächst dieser Pilz auf der extraktfreien Kontrollplatte geringfügig schneller als auf dem Medium mit *Curcuma*-Extrakt, der aus den Wurzeln von *Curcuma* sp. isolierte Endophyt ist aber mit einer täglichen Wachstumsgeschwindigkeit von 0,075 mm kaum imstande, auf dem *Alpinia*-Extrakt-Medium zu wachsen. Der *Curcuma*-Extrakt scheint das Wachstum von *P. commune* (EP1), *Neosartorya fischeri* (EP3) und *Cladosporium sphaerospermum* im Vergleich zur Kontrolle zwar mehr zu hemmen als der *Alpinia*-Extrakt, dennoch ist auffällig, daß die Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den verschiedenen Medien und der Kontrolle bei *N. fischeri* (EP3) äußerst gering sind.

Tab. 20: Wuchsgeschwindigkeit bei Zugabe der Pflanzenextrakte: Die Isolate wurden auf zuvor mit dem jeweiligen Pflanzenextrakt modifizierte Agarmedien inokuliert. Nach 12 Tagen wurde die Wachstumsgeschwindigkeit in mm/Tag errechnet.

	<i>Curcuma</i> -Extrakt	<i>Alpinia</i> -Extrakt	Kontrolle
Isolat	Wuchsgeschwindigkeit [mm/Tag]		
<i>P. commune</i> (EP1)	2,8	3,75	7,5
<i>P. commune</i> (EP2)	0,6	4,5	2,75
<i>N. fischeri</i> (EP3)	6,1	6,6	7
<i>P. purpurogenum</i> (EPC)	1,5	0,075	2,1
<i>C. sphaerospermum</i>	1,5	1,9	3,2

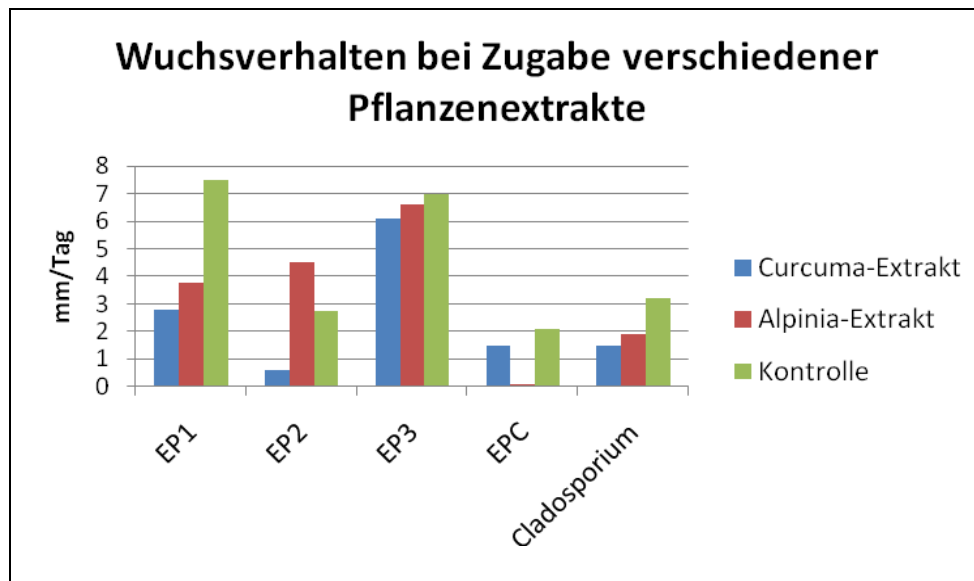


Abb. 8: Unterschiede in Wuchsverhalten bzw. Wachstumsgeschwindigkeit bei Zugabe spezifischer Pflanzenextrakte: *P. commune* (EP2) wächst auf dem *Alpinia*-Extrakt-Medium schneller als auf dem *Curcuma*-Extrakt-Medium und sogar schneller als auf dem extraktfreien Kontroll-Medium.

4.3.2.2 Temperaturoptimum

Um ein Temperaturoptimum für die Isolate sowie für *Cladosporium sphaerospermum* zu ermitteln, wurde die Wuchsgeschwindigkeit in mm pro Tag bei Inkubation bei 15°C, 22°C und 37°C ermittelt. Abb. 9 zeigt, daß nur *Neosartorya fischeri* (EP3) bei einer Temperatur von 37°C ebenso schnell wächst wie bei Raumtemperatur (22°C). Alle anderen Pilze bevorzugen 22°C, mit Ausnahme von *Penicillium commune* (EP2), der bei 15°C schneller wächst.

Tab. 21: Temperaturoptimum: Die Kulturen wurden bei 15°C, 22°C und 37°C inkubiert, nach 12 Tagen wurde die Wachstumsgeschwindigkeit in mm/Tag errechnet.

Temperatur	15°C	22°C	37°C
Isolat	Wuchsgeschwindigkeit [mm/Tag]		
<i>P. commune</i> (EP1)	4,3	7,5	0
<i>P. commune</i> (EP2)	3,2	2,75	1
<i>N. fischeri</i> (EP3)	1,1	7	7
<i>P. purpurogenum</i> (EPC)	1,1	2,1	0,8
<i>C. sphaerospermum</i>	1,9	3,2	0,25

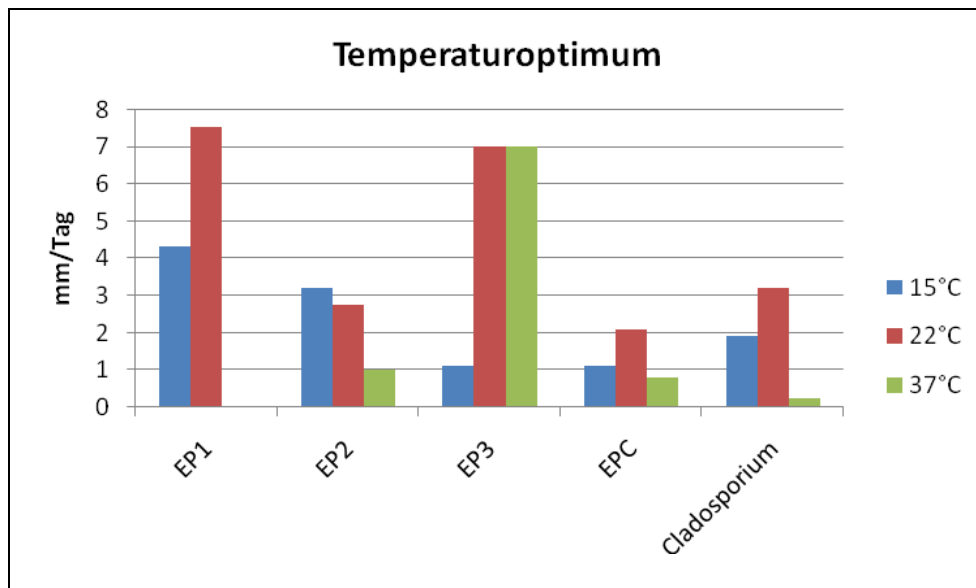


Abb. 9: Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit nach Inkubationstemperatur: *N. fischeri* (EP3) ist als einziges Isolat in der Lage, bei 37°C ebenso schnell zu wachsen wie bei 22°C.

4.4 Phytochemische Charakterisierung

Alle hier untersuchten Endophyten stammen aus Pflanzenorganen von *Alpinia malaccensis* und *Curcuma* sp. (Tab. 1). Die Pilz-Extrakte zeigen vollkommen unterschiedliche Inhaltsstoffmuster. Dies trifft auch auf *Penicillium commune* (EP1) und *Penicillium commune* (EP2) zu, die durch die Sequenzierung der DNA auf dieselbe Art bestimmt werden konnten. *P. commune* (EP1) entstand im Laufe der Kultivierung aus *P. commune* (EP2), ist genetisch mit *P. commune* (EP2) ident, produziert aber keine Sporen. Keine der Verbindungen aus den Pilz-Extrakten konnte in den Inhaltsstoffprofilen der Pflanzen, aus denen die Pilze ursprünglich isoliert worden waren, nachgewiesen werden.

4.4.1 *Alpinia malaccensis*

Abb. 10 zeigt das HPLC-Profil des Ethylacetat-Extraktes des Rhizoms von *Alpinia malaccensis*. In einer parallel durchgeführten Diplomarbeit von Christian Gilli konnten die Substanzen 5,6-Dehydrokawain, Pinostrobin-Chalkon, Pinostrobin und Nicolaoidesin C aus dem Rhizom von *Alpinia malaccensis* isoliert werden (Gilli, in Vorbereitung). Um

auszuschließen, daß Substanzen aus den Pilzextrakten in messbarer Menge im Pflanzen-Extrakt enthalten sind, wurden Pilz- und Pflanzen-Extrakt direkt miteinander verglichen.

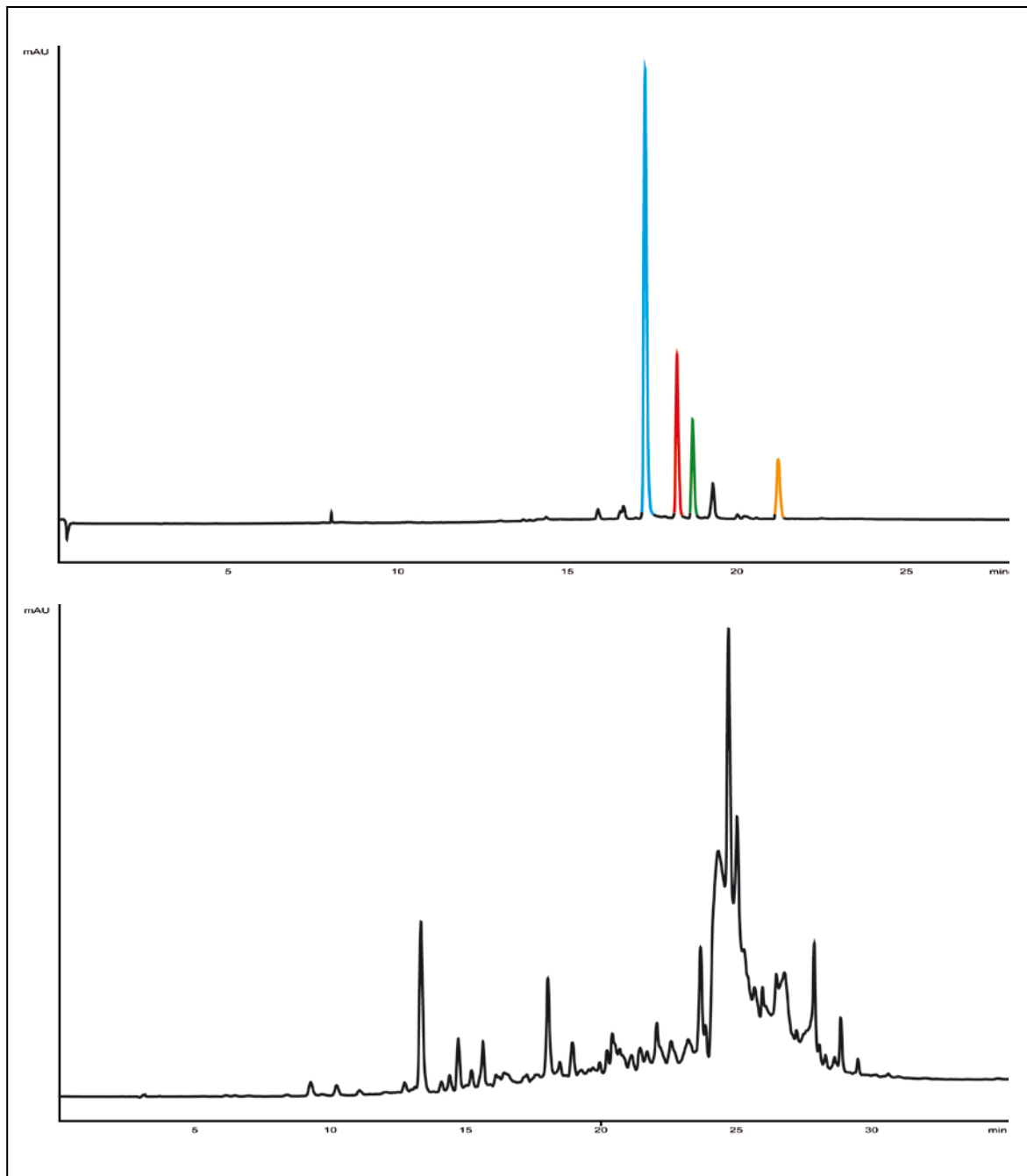


Abb. 10: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von *Alpinia malaccensis* (oben) und *Penicillium commune* (EP1) (unten): ■ - 5,6-Dehydrokawain; ■ - Pinostrobin-Chalkon; ■ - Pinostrobin; ■ - Nicolaoidesin. Aufgrund der geringen Menge des Pilzextraktes war eine weitere chromatographische Auftrennung nicht möglich, es sind jedoch eindeutig keine Übereinstimmungen des Pflanzen- und Pilzextraktes zu erkennen.

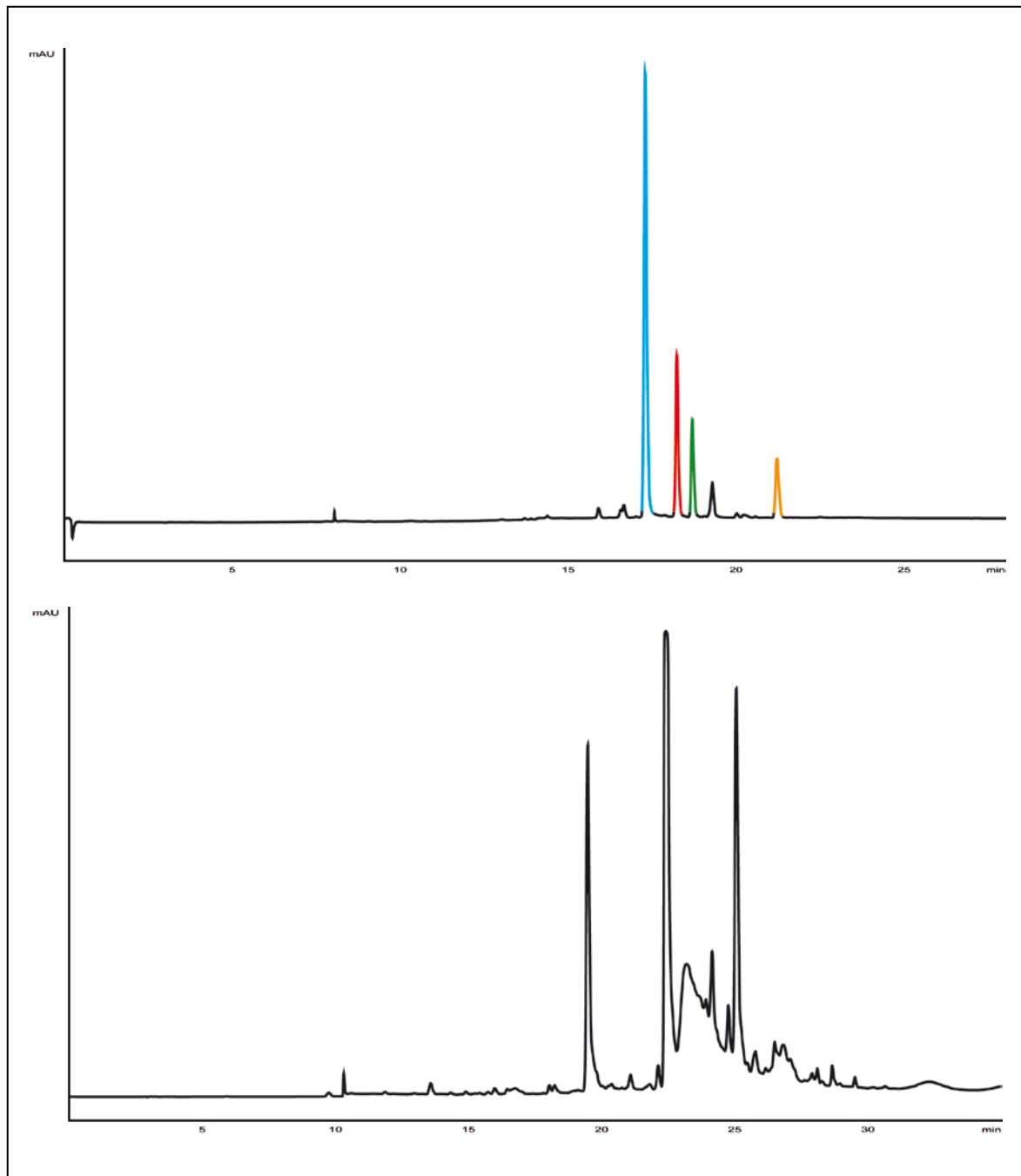


Abb. 11: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von *Alpinia malaccensis* (oben) und *Penicillium commune* (EP2) (unten): *P. commune* (EP2) weist sowohl keinerlei Übereinstimmungen mit dem Extrakt von *Alpinia malaccensis*, als auch mit dem Pilzextrakt von *P. commune* (EP1) auf.

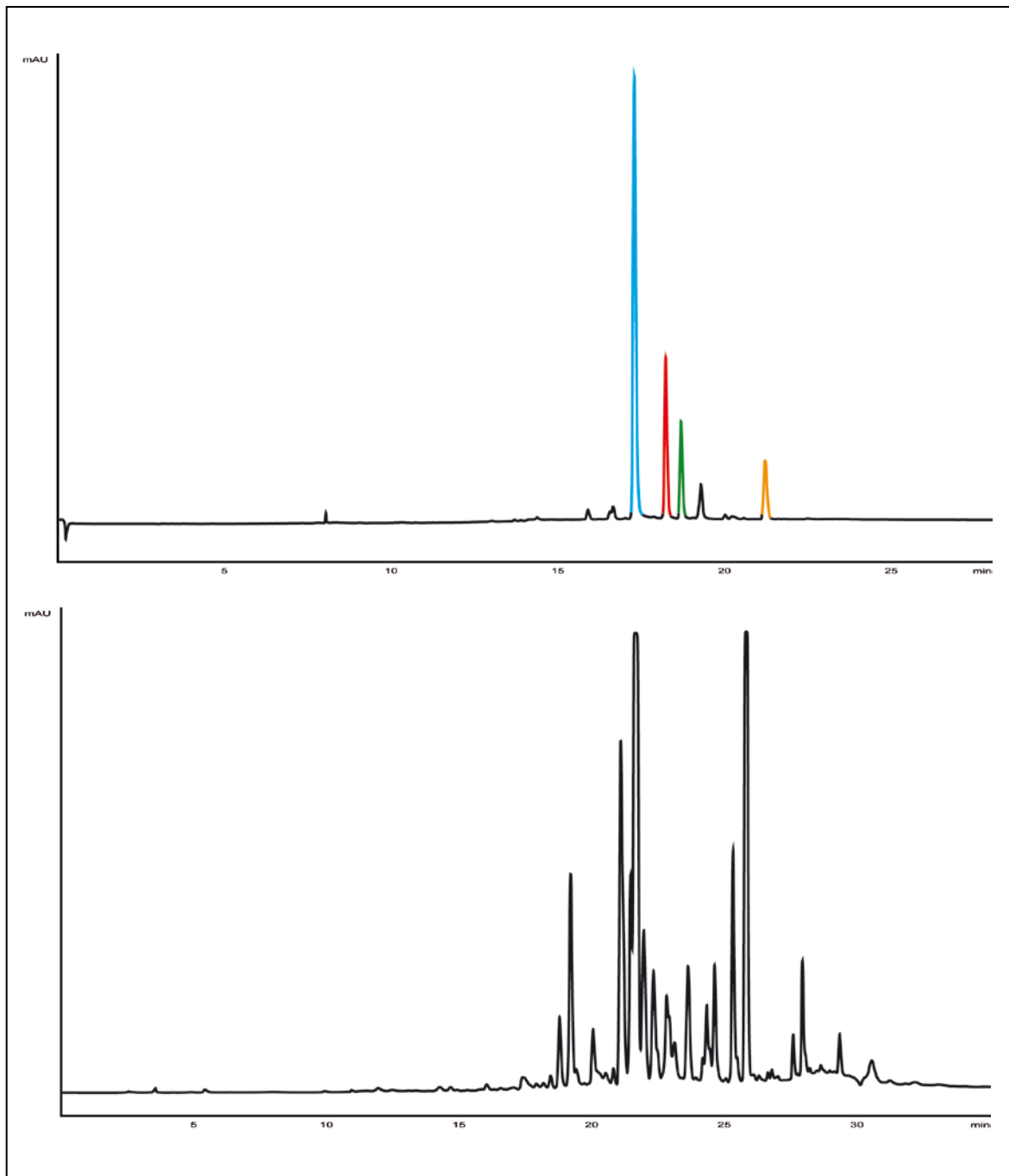


Abb. 12: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von *Alpinia malaccensis* (oben) und *Neosartorya fischeri* (EP3) (unten): Es sind keine Übereinstimmungen zwischen dem Pilzextrakt und dem Pflanzenextrakt im Inhaltsstoffprofil zu erkennen.

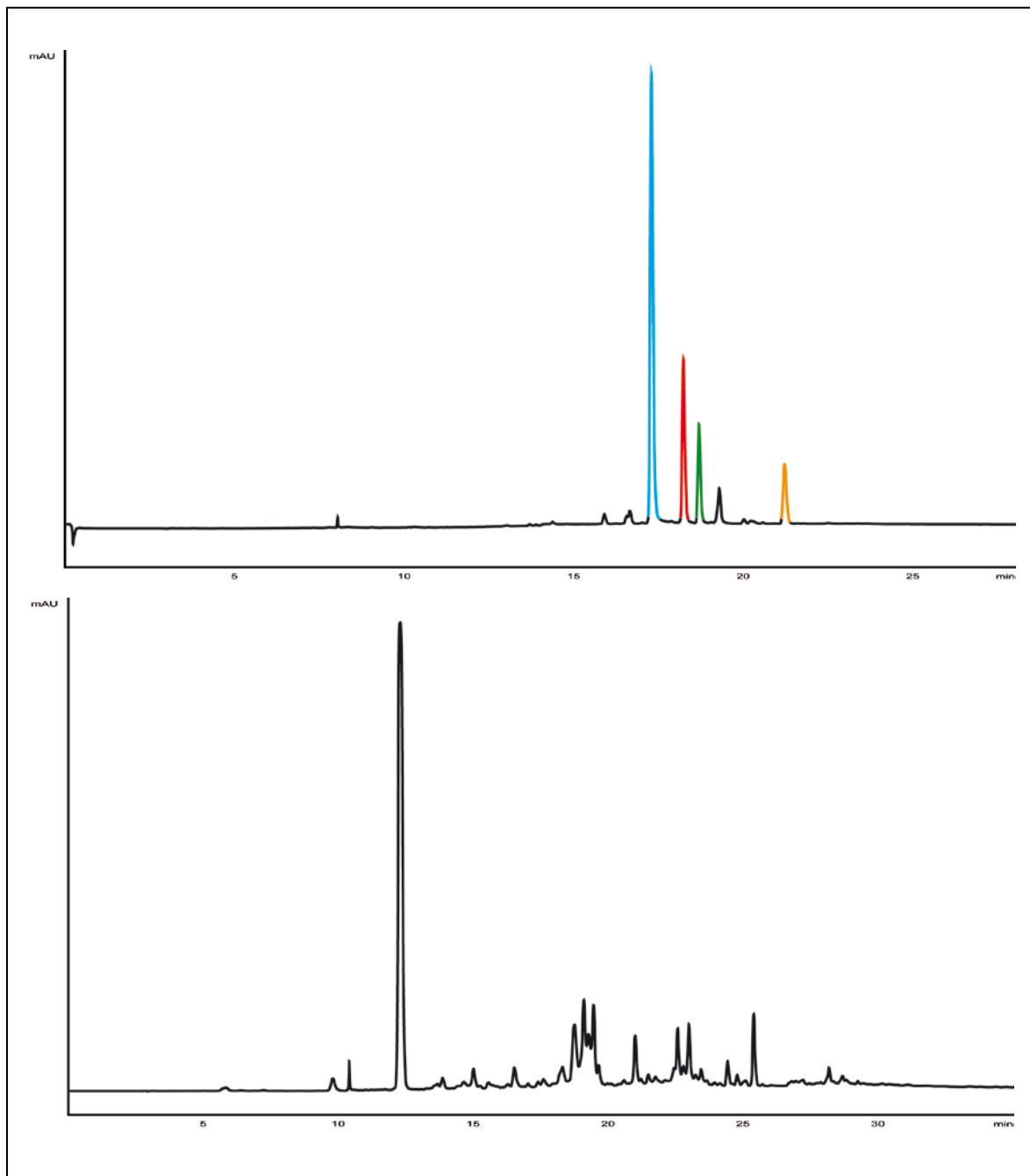


Abb. 13: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von *Alpinia malaccensis* (oben) und *Penicillium turbatum* (EP4) (unten): Zwischen dem Gesamtextrakt von *Alpinia malaccensis* und dem Pilzextrakt sind keinerlei Übereinstimmungen festzustellen.

4.4.2 Curcuma sp.

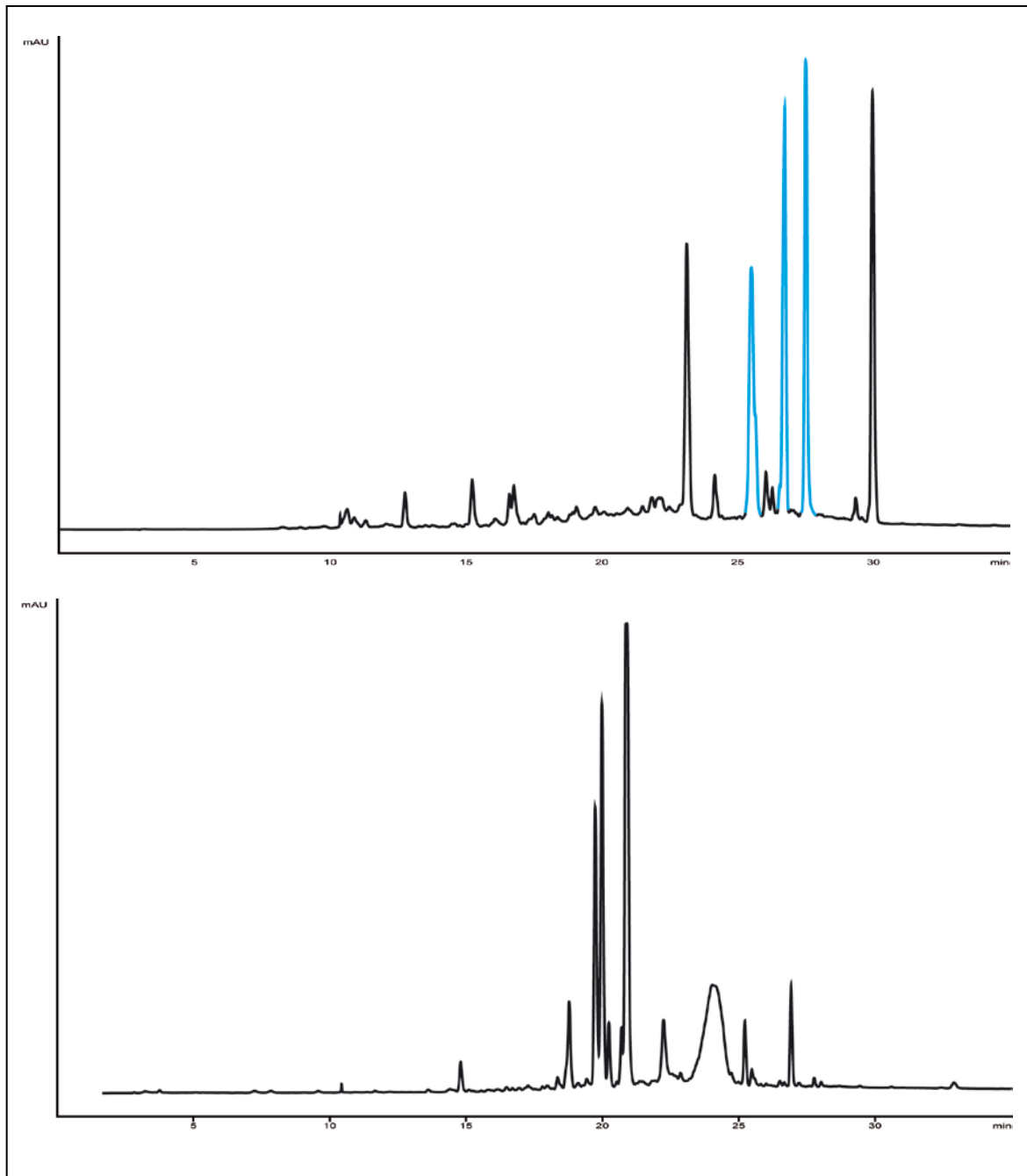


Abb. 14: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von *Curcuma sp.* (oben) und *Penicillium purpurogenum* (EPC) (unten): ■ - nicht näher identifizierte Sesquiterpene. Zwischen dem Gesamtextrakt von *Curcuma sp.* und dem Pilzextrakt sind keinerlei Übereinstimmungen zu erkennen.

4.4.3 Dünnschichtchromatographie

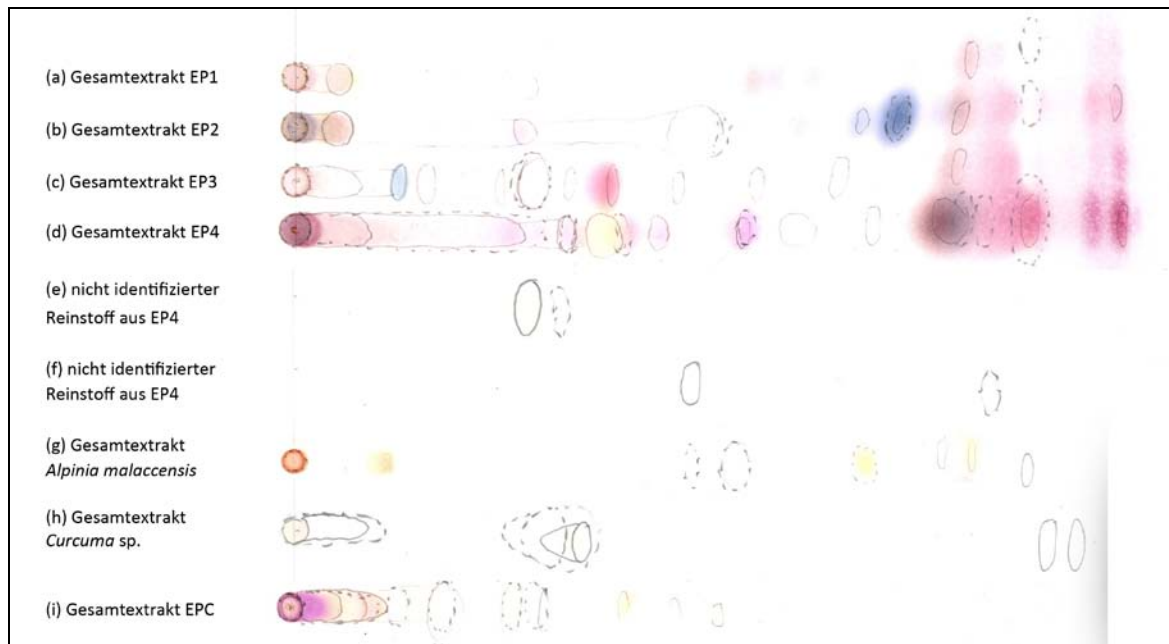


Abb. 15: Dünnschichtchromatographie der Pilz- und Pflanzenextrakte: Laufmittelgemisch Diethylether: Petrolether:Methanol = 60:40:1.

4.5 Biotests

4.5.1 Dünnschichtbioautographie

Um die antifungale Wirkung der isolierten Pilze zu evaluieren, wurden sowohl deren Gesamtextrakte als auch die Pflanzenextrakte von *Alpinia malaccensis* und *Curcuma* sp. sowie zwei nicht identifizierte Reinstoffe von *Penicillium turbatum* (EP4) gegen *Cladosporium sphaerospermum* getestet. Wie Abb. 16 zeigt, sind die deutlichsten Hemmhöfe bei dem nicht näher identifizierten Reinstoff 1 von *P. turbatum* (EP4) sowie bei dem Gesamt-Extrakt von *Curcuma* sp. zu finden, dessen antifungale Wirkung bekannt ist. Weitere schwache Hemmhöfe sind bei dem Gesamtextrakt des Endophyten *P. purpurogenum* (EPC) zu finden. Kaum antifungale Wirkung zeigen die Gesamtextrakte der Pilze *P. commune* (EP1) und *P. commune* (EP2). Keinerlei antifungale Wirkung zeigten die Extrakte von *N. fischeri* (EP3) und *P. turbatum* (EP4).

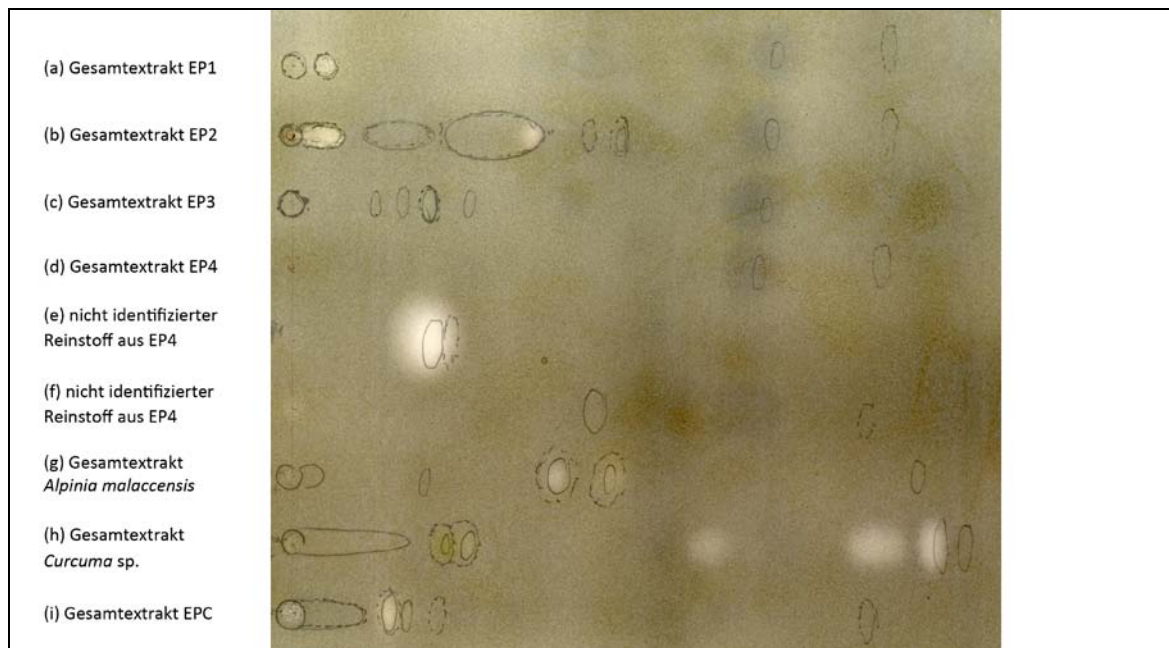


Abb. 16: Dünnschichtbioautographie mit *Cladosporium sphaerospermum*: Die stärkste antifungale Wirkung zeigt ein aufgrund zu geringer Ausbeute nicht identifizierter Reinstoff von *P. turbatum* (EP4) (e) sowie der Gesamtextrakt der Wurzel von *Curcuma* sp. (h). Eher schwache Wirkung zeigen die Pilze *P. commune* (EP1) (a), *P. commune* (EP2) (b) und *P. purpurogenum* (EPC) (i) sowie der Gesamtextrakt des Rhizoms von *Alpinia malaccensis* (g). Laufmittelmisch Diethylether:Petrolether:Methanol = 60:40:1.

4.5.2 Fraßversuche mit *Spodoptera*

Aufgrund der einmaligen Durchführung der Fraßversuche handelt es sich bei den Ergebnissen nur um eine Schätzung. Dennoch gibt es Hinweise, daß die Verfütterung sämtlicher Pilz-Extrakte eine mehr oder weniger starke Wachstumshemmung zur Folge hat, die vor allem bei *P. commune* (EP2) über 90% beträgt (Tab. 22). *N. fischeri* (EP3) und *P. purpurogenum* (EPC) zeigen eine starke Wachstumshemmung, führen aber bei den *Spodoptera*-Larven nicht zum Tod. Weiters zeigen *P. commune* (EP1), *P. commune* (EP2) und *P. turbatum* (EP4) toxische Wirkung und führen nach 7 Tagen bei bis zu 66,7% der Larven zum Tod. Der Pflanzenextrakt von *Curcuma* sp. führt ebenfalls zu einer Wachstumshemmung und hat in der höheren Konzentration von 2 mg/g eine toxische Wirkung, was eine Todesrate von 20% zur Folge hat. Der Pflanzenextrakt von *Alpinia malaccensis* zeigt nur in der höheren Konzentration eine wachstumshemmende Wirkung.

Tab. 22: Auswertung der Fraßversuche an *Spodoptera littoralis*: Getestet wurden jeweils zwei Konzentrationen (1mg/g und 2,5mg/g). Die Wachstumshemmung nach 7 Tagen bezieht sich auf das relative Gewicht der Kontroll-Raupen.

Probe - Konzentration	Wachstumshemmung nach 7 Tagen in %	Letalität nach 7 Tagen in %
<i>P. commune</i> (EP1) - 1mg/g	24,8	66,7
<i>P. commune</i> (EP1) - 2,5mg/g	16,4	46,7
<i>P. commune</i> (EP2) - 1mg/g	9,3	66,7
<i>P. commune</i> (EP2) - 2,5mg/g	8,6	53,3
<i>N. fischeri</i> (EP3) - 1mg/g	51,8	0,0
<i>N. fischeri</i> (EP3) - 2,5mg/g	29,6	0,0
<i>P. turbatum</i> (EP4) - 1mg/g	42,5	33,3
<i>P. turbatum</i> (EP4) - 2,5mg/g	94,3	0,0
<i>P. purpureogenum</i> (EPC) - 1mg/g	73,3	0,0
<i>P. purpureogenum</i> (EPC) - 2,5mg/g	38,1	6,7
<i>Curcuma</i> - 1mg/g	48,5	0,0
<i>Curcuma</i> - 2,5mg/g	25,0	20,0
<i>Alpinia malaccensis</i> - 1mg/g	114,8	0,0
<i>Alpinia malaccensis</i> - 2,5mg/g	54,5	6,7
Kontrolle 1 - 1mg/g	128,4	0,0
Kontrolle 2 - 2,5mg/g	85,8	0,0
Kontrolle 3 - 1mg/g	95,2	0,0
Kontrolle 4 - 2,5mg/g	90,6	0,0

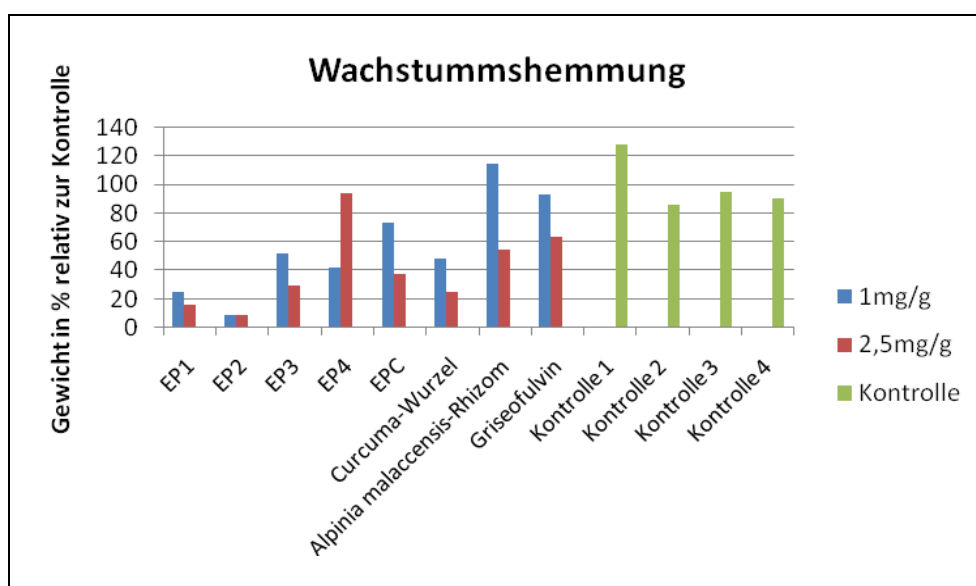


Abb. 17: Wachstumshemmung von *Spodoptera*-Larven in %: Das Diagramm zeigt das relative Gewicht im Vergleich zur Kontrolle. Mit einer Ausnahme bei *P. turbatum* (EP4) hat in allen Fällen die höhere Konzentration eine höhere Wachstumshemmung zur Folge.

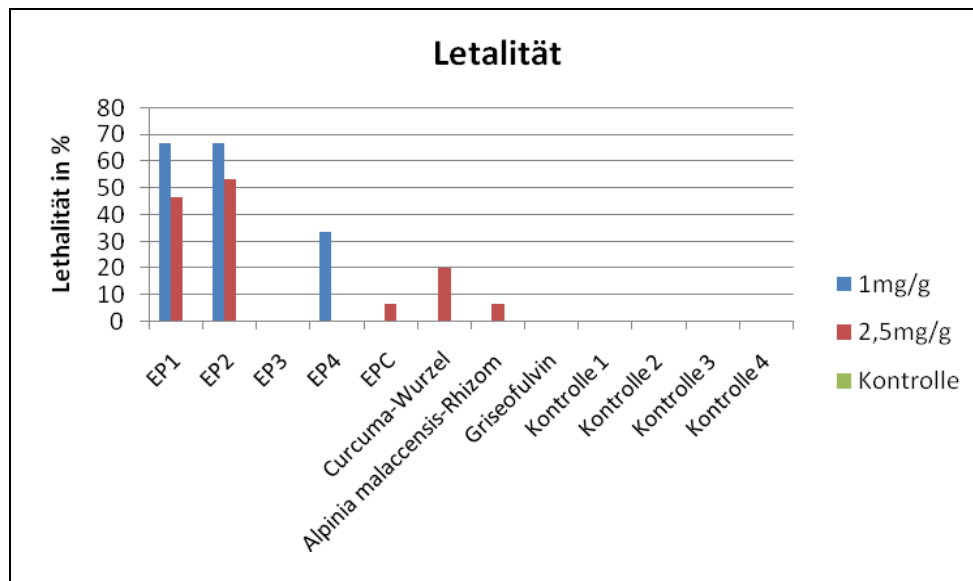


Abb. 18: Letalität von *Spodoptera*-Larven in %: Gezeigt wird die Sterblichkeitsrate der *Spodoptera*-Larven im Vergleich zur Kontrolle. *P. commune* (EP1), *P. commune* (EP2) und *P. turbatum* (EP4) zeigen starke toxische Wirkung in der geringeren Konzentration.

4.5.3 Konkurrenztests

Um etwaige Wechselwirkungen der Pilze sowohl untereinander als auch mit *Cladosporium sphaerospermum* als Kontrollgruppe zu untersuchen, wurden Konkurrenztests durchgeführt, die Aufschluß über die Dominanz bzw. Durchsetzungsfähigkeit der Isolate geben sollte. Beurteilt wurden zum Beispiel Interaktionen wie das Überwachsen eines Isolats durch ein anderes, das Auftreten einer Wuchshemmung und die Ausbildung von Hemmhöfen. Jeder Art von Interaktion wird eine Punktezahl zugewiesen, die Punktesumme ergibt den Antagonismusindex (2.2.3.1) für jeden Pilz.

Wie Abb. 19 zeigt, erreicht *P. commune* (EP2) den höchsten Antagonismusindex mit einer Punktesumme von 18. Als weniger konkurrenzfähig zeigen sich *P. commune* (EP1) und *N. fischeri* (EP3) mit einer jeweiligen Punktesumme von 13. *P. purpurogenum* (EPC) erreicht nur einen Wert von 7, während *C. sphaerospermum* mit 9 knapp darüber liegt. Abb. 20 zeigt die Interaktionen der einzelnen Isolate, nach denen der Antagonismusindex errechnet wurde.

Tab. 23: Errechnete Antagonismusindices.

Pilz	Antagonismusindex
<i>P. commune</i> (EP1)	13
<i>P. commune</i> (EP2)	18
<i>N. fischeri</i> (EP3)	13
<i>P. purpurogenum</i> (EPC)	7
<i>C. sphaerospermum</i>	9

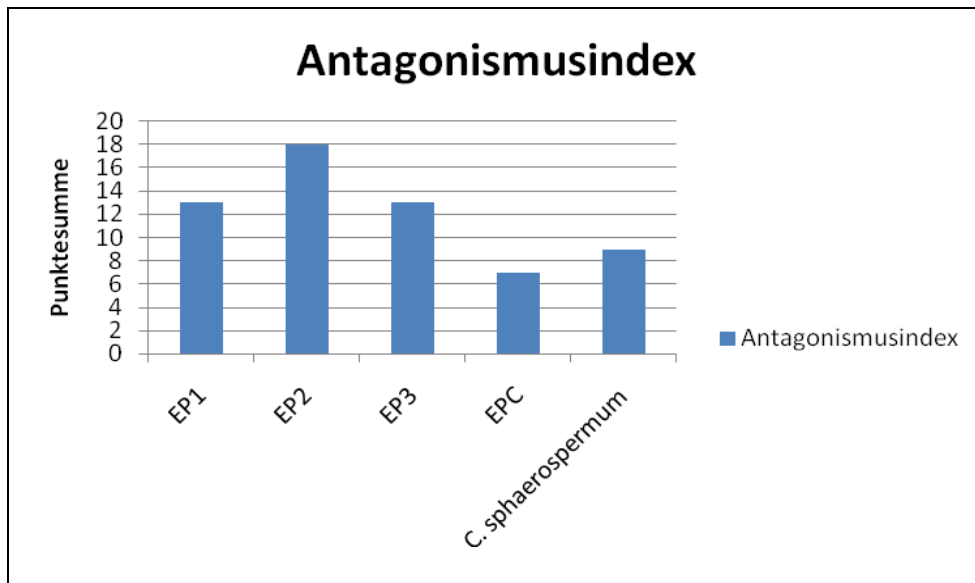


Abb. 19: Antagonismusindex: Den höchsten Antagonismusindex erreicht *P. commune* (EP2), *P. commune* (EP1) und *N. fischeri* (EP3) besitzen den selben Wert von 13, *P. purpurogenum* (EPC) erreicht nur 7. *C. sphaerospermum* liegt mit einer Punktesumme von 9 nur knapp über *P. purpurogenum* (EPC).

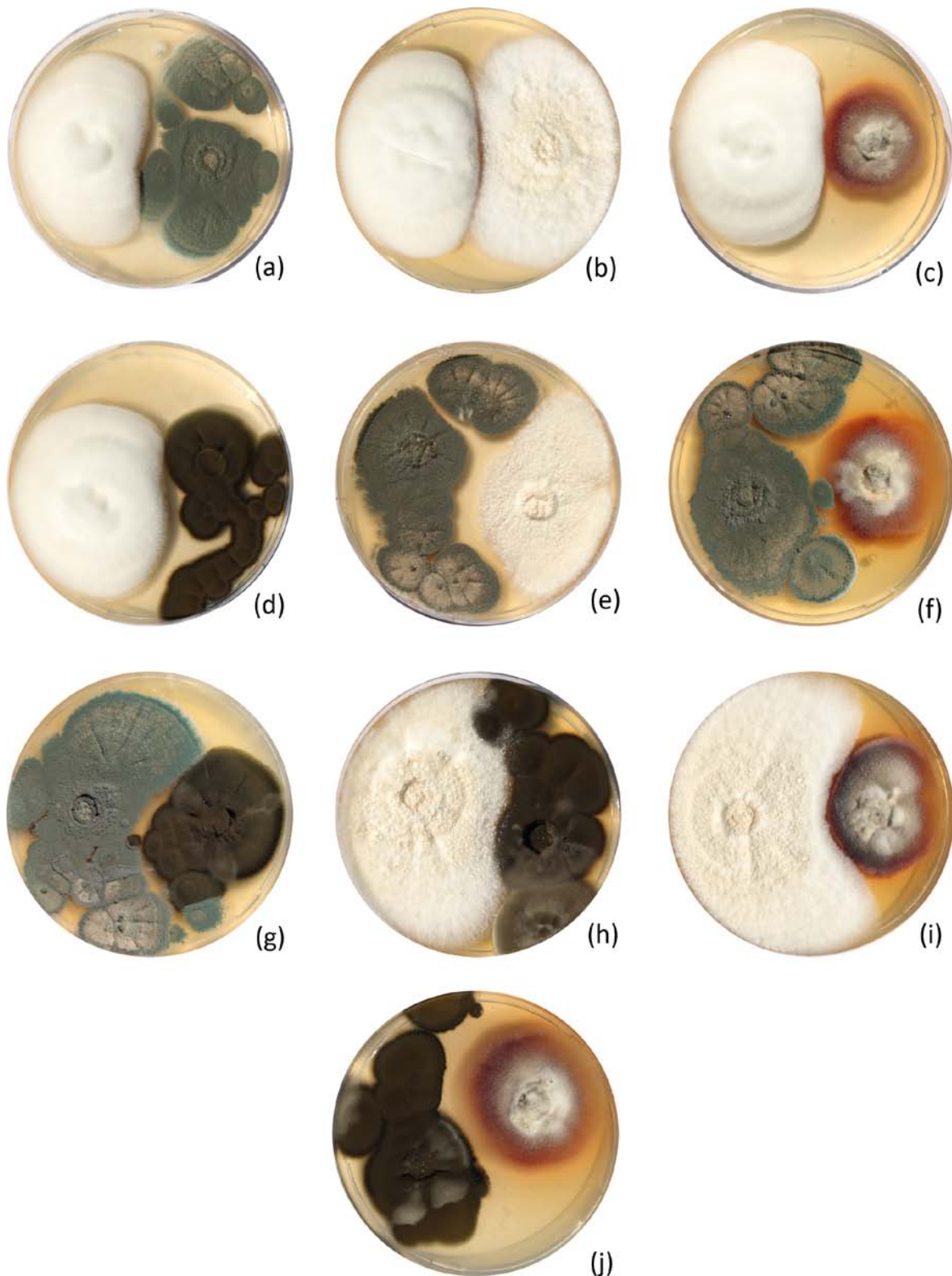


Abb. 20: Kompetitionstests: (a) *P. commune* (EP1)/*P. commune* (EP2); (b) *P. commune* (EP1)/*N. fischeri* (EP3); (c) *P. commune* (EP1)/*P. purpurogenum* (EPC); (d) *P. commune* (EP1)/*C. sphaerospermum*; (e) *P. commune* (EP2)/*N. fischeri* (EP3); (f) *P. commune* (EP2)/*P. purpurogenum* (EPC); (g) *P. commune* (EP2)/*C. sphaerospermum*; (h) *N. fischeri* (EP3)/*C. sphaerospermum*; (i) *N. fischeri* (EP3)/*P. purpurogenum* (EPC); (j) *C. sphaerospermum*/ *P. purpurogenum* (EPC). Für die jeweilige Interaktion werden nach Tab. 4 Punkte vergeben, die daraus errechnete Punktesumme ergibt den Antagonismusindex.

5 Diskussion

Endophytische Pilze sind nach derzeitigem Wissensstand in allen bisher untersuchten Pflanzenarten vertreten. Sie können sowohl als Pathogene als auch als Symbionten vorliegen und produzieren eine Vielzahl an Natur- bzw. Sekundärstoffen mit bioaktivem Potential. In der vorliegenden Arbeit wurden Endophyten aus *Alpinia malaccensis* und *Curcuma* sp. isoliert und phytochemisch, physiologisch und molekularbiologisch charakterisiert. Weiters wurden Biotests zur Evaluierung potentieller antifungaler und insektizider Wirkungen durchgeführt.

5.1 Beeinflussung der Diversität und Physiologie der Endophyten durch die Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden nach Schulz et al. (1998) vier verschiedene Methoden zur Oberflächensterilisation getestet sowie der "Vitality Test" nach Petrini (1984) durchgeführt, um Kontaminationen durch epiphytische Pilze auszuschließen. Das beste Ergebnis wurde durch die Anwendung der Methode OS III erreicht, da der "Vitality Test" negativ verlief und die höchste Anzahl an Endophyten isoliert werden konnte (siehe 4.2). Bei sämtlichen darauffolgenden Isolationsversuchen wurde daher ausschließlich Methode OS III angewendet. Des Weiteren wurden vier Kulturmedien auf Malzagar-Basis sowie ein nährstoffarmes Flüssigmedium getestet. Vor allem das nährstoffarme Flüssigmedium M V erwies sich als nicht effektiv, da das Wachstum der Isolate stark gehemmt war und so zu einer geringen Ausbeute an Gesamtextrakt führte (siehe Tab. 18). Im weiteren Verlauf wurden außerdem die Medien M II - MIV, welche Antibiotika zur Suppression von Bakterienwachstum enthielten, weggelassen und ausschließlich M I zur weiteren Kultivierung verwendet, da die Kulturen auch ohne antibiotische Zusatzstoffe nicht kontaminiert waren.

Die oben genannten Ergebnisse zeigen, daß die angewendeten Methoden die Diversität der isolierten Endophyten und deren Wuchsverhalten stark beeinflussen können, worauf auch Hyde & Soytong (2008) hinweisen. Da manche Pilze auf bestimmte

Chemikalien empfindlicher reagieren als andere, erfolgt schon bei der Oberflächensterilisation eine Art Selektion, die nur die Isolierung weniger empfindlicher Endophyten erlaubt. Zusätzlich muß die Dauer der Sterilisation an das zu sterilisierende Pflanzenorgan angepasst werden. Wird zum Beispiel Blattgewebe sterilisiert, muß die Behandlungsdauer erheblich verkürzt werden, da sonst nicht nur Epiphyten, sondern auch Endophyten abgetötet werden (Hyde & Soytong, 2008).

Ein ähnliches Problem stellt die Verwendung verschiedenerer Kulturmedien dar. Nicht alle Pilze können auf künstlichen Medien unter Laborbedingungen wachsen (Duong et al., 2006). Außerdem ist ihr Wuchsverhalten häufig sehr unterschiedlich, was dazu führt, daß eher dominante, schnell wachsende Pilze isoliert werden, langsamer wachsende hingegen nicht (Guo et al., 2001). Daß die Zusammensetzung der Nährmedien das Wachstum stark beeinflussen kann, zeigt Abb. 8. Der aus *Curcuma* isolierte Pilz *Penicillium purpurogenum* (EPC) wächst auf dem mit *Curcuma*-Extrakt versetzten Medium mit einer Wuchsgeschwindigkeit von 1,5 mm pro Tag beinahe so schnell wie in der Kontrolle, während er auf dem *Alpinia*-Extrakt-Medium praktisch überhaupt nicht wachsen kann. Ein ähnliches Ergebnis lieferte *Penicillium commune* (EP2), welcher auf dem *Alpinia*-Extrakt-Medium sogar schneller als in der Kontrolle wuchs, äußerst langsam hingegen auf dem *Curcuma*-Extrakt-Medium. Häufig bedürfen Pilze eines speziellen Mediums. So müssen beispielsweise zur Isolierung des pathogenen Pilzes *Ceratocystis* Holzstücke des Mangobaums *Mangifera indica* zwischen Karottenscheiben inkubiert werden, um die entsprechenden Pilzisolat zu erhalten (Moller & De Vay, 1986; van Wyk et al., 2007). Ob dies auf eine gewisse Wirtsspezifität zurückzuführen ist, wird derzeit diskutiert (Hyde & Soytong, 2008). Diese Hypothese ist aber aufgrund der Annahme, daß sich Endophyten im Lauf der Evolution (siehe 1.2.3) gemeinsam mit ihren Wirtspflanzen entwickelt haben (Taylor & Taylor, 2000), wahrscheinlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß über die Zusammensetzung und Diversität von Endophyten-Populationen keinerlei Aussage getroffen werden kann, da die derzeitige Methodik allenfalls punktuelle Momentaufnahmen ermöglicht; ein System kann aber noch nicht erfasst werden (Hyde & Soytong, 2008).

5.2 Das bioaktive Potential fungaler Sekundärstoffe und deren Rolle in der Wirtspflanze

Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.4.1 zeigen, gibt es keinerlei Übereinstimmungen der Inhaltsstoffprofile der Pflanzen und der daraus isolierten Endophyten. Die bekannten Inhaltsstoffe von *Alpinia malaccensis* - 5,6-Dehydrokawain, Pinostrobin-Chalkon, Pinostrobin und Nicolaoidesin - sind weder in den aus *Alpinia* isolierten Pilzextrakten von *P. commune* (EP1), *P. commune* (EP2), *N. fischeri* (EP3) und *P. turbatum* (EP4) zu finden, noch in dem aus *Curcuma* isolierten *P. purpureogenum* (EPC). Vice versa ist keines der nicht näher identifizierten Sesquiterpene des *Curcuma*-Extraktes im Pilzextrakt von *P. purpureogenum* (EPC) zu finden; auch in den Pilzextrakten der aus *Alpinia* isolierten Endophyten *P. commune* (EP1), *P. commune* (EP2), *N. fischeri* (EP3) und *P. turbatum* (EP4) sind keine Übereinstimmungen mit dem Inhaltsstoffprofil des *Curcuma*-Extraktes zu erkennen. Die Auswertung der Dünnschichtbioautographie (siehe Abb. 16) ergab, daß alle untersuchten Pilz-Extrakte moderate antifungale Wirkung besitzen. Auch eine wachstumshemmende und toxische Wirkung auf *Spodoptera*-Larven war in einigen Fällen nachweisbar (siehe Abb. 17 und Abb. 18); eine Wiederholung des Versuchs fand jedoch nicht statt, weshalb die Ergebnisse nur einen oberflächlichen Einblick in die mögliche insektizide Wirkung der Pilz-Extrakte gewähren.

Über das bioaktive Potential endophytischer Pilze sind in den letzten 10 Jahren zahlreiche Arbeiten erschienen (Filip et al., 2003; Wiyakrutta et al., 2004; Strobel et al., 2005; Tejesvi et al., 2006; Ding et al., 2007; Guo et al., 2008; Huang et al., 2008; Banu & Kumar, 2009; Busi et al., 2009). Ihre Wirkungen sind äußerst vielfältig und führen in der Wirtspflanze zu erhöhter Resistenz gegen mikrobielle Pathogene, Herbivoren und sogar zu einer erhöhten Toleranz gegenüber abiotischen Faktoren wie hoher Bodentemperatur, erhöhtem pH-Wert, Schwermetallstreß und hoher Salinität (Waller et al., 2005; Zabalgogezcoa, 2008). Weniger bekannt sind hingegen die Mechanismen *in planta*, die zu dieser Toleranz gegenüber biotischem und abiotischem Streß führen. Es wird angenommen, daß die Wirkung endophytischer Pilze gegenüber pflanzenpathogenen Pilzen durch eine Produktion antifungaler Sekundärstoffe oder Substanzen, welche die Induktion chemischer Verteidigungsstrategien seitens der Pflanze hervorrufen, zustande

kommt (Zabalgogea, 2008). Bei mit Endophyten inokulierten Kakaopflanzen *Theobroma cacao* L. dürfte ein solcher Mechanismus jedoch nicht in Frage kommen, da eine Reduzierung des Befalls durch *Phytophthora* sp. nur auf den tatsächlich inokulierten Blättern festzustellen war, nicht aber auf anderen endophytenfreien Blättern derselben Pflanze. Somit kann es sich in diesem Fall nicht um eine systemische Resistenz handeln (Arnold et al., 2003). Möglicherweise kommt es durch die Infektion mit Endophyten auch zu einer Veränderung der Biochemie der Pflanze, wie Versuche an der Gerste *Hordeum vulgare* L. gezeigt haben, bei welcher die Antwort auf eine Infektion mit Pathogenen den Zelltod einleitet (Waller et al., 2005). Ein ähnlicher Mechanismus scheint der Resistenz von *Musa* sp. gegen den Nematoden *Radopholus similis* Cobb, Thorne zugrunde zu liegen, wo auch nicht mit Endophyten inokulierte Teile der Pflanze eine Resistenz entwickeln, was auf eine systemische Resistenz hinweist (Vu et al., 2006; zum Felde et al., 2006). Gleichzeitig sind Ergotalkaloide von *Neotyphodium* in diversen Gräsern für die protektive Wirkung gegen Nematoden verantwortlich (Kimmons et al., 1990). Des Weiteren wird angenommen, daß manche Endophyten Mykoparasiten sind, wie zum Beispiel der aus *Dactylis glomerata* L. isolierte Pilz *Acremonium strictum* W. Gams, welcher den pathogenen Pilz *Helminthosporium solani* Durieu & Mont. parasitiert (Rivera Varas et al., 2007). Denkbar ist jedoch auch die schlichte Konkurrenz um Platz und Ressourcen, die zwischen Endophyten und neu in die Pflanze eindringenden Pilzen herrscht (Zabalgogea, 2008).

Wie auch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Competitionstests (Abb. 20) zeigen, sind die Interaktionen zwischen Pilzen äußerst divers, von Art zu Art verschieden und können die Koloniemorphologie erheblich beeinflussen (Yuen et al., 1999; Ernst, 2005). Durch die Vergabe von Punkten je nach Interaktionstypen kann für jedes Isolat ein Antagonismusindex errechnet und so Dominanz und Konkurrenzfähigkeit beurteilt werden. Die in Tab. 23 und Abb. 19 angeführten Ergebnisse zeigen, daß *P. commune* (EP2) am durchsetzungsfähigsten ist, während *P. purpurogenum* (EPC) und *C. sphaerospermum* durch ihre jeweiligen Kompetitoren in ihrem Wachstum gehemmt sind. Dagegen ist das Wachstum gehemmt, wenn sie direkt gegeneinander getestet werden. Die Interaktionen zwischen Pilzen sind sehr unterschiedlich und hängen von allen beteiligten Arten ab. Es wird außerdem angenommen, daß sich in Konkurrenzsituationen

auch ihr Inhaltsstoffprofil ändert, da manche Mykotoxine erst durch die Anwesenheit anderer, möglicherweise pathogener Pilze produziert werden. Das könnte wiederum die Ursache dafür sein, weshalb zwischen dem Inhaltsstoffprofil von Pflanzen und Pilzen in der vorliegenden Arbeit keinerlei Übereinstimmungen bestehen. Ho et al. (2003) und Gao et al. (2010) weisen darauf hin, daß Endophyten durchaus eine Rolle als Phytoalexin-Produzenten zugesprochen werden kann. Daraus resultiert allerdings auch die Notwendigkeit der Klärung der Frage, ob mit Endophyten inokulierte Nutzpflanzen aufgrund der Produktion von Mykotoxinen eine Gefahr für den Menschen darstellen könnten, da die Bildung toxischer Substanzen meist nur für die symbiotischen Beziehungen zwischen endophytischen Pilzen und Gräsern beschrieben ist (siehe 1.2.5). Obwohl unzählige Arbeiten auf die potentielle Nutzbarkeit von Endophyten als Quelle neuer Naturstoffe oder als biologische Kontrolle in der Schädlingsbekämpfung hinweisen (Arnold et al., 2003; El-Morsy, 2004; Li et al., 2007; Niere et al., 1999; Strobel et al., 2005; Tan et al., 2001), muß ein Großteil der biochemischen Mechanismen zur Ausbildung von Resistenzen und der Pathogenabwehr durch Endophyten noch verstanden werden (Zabalgogea, 2008; Gao et al., 2010).

5.3 Möglichkeiten und Hindernisse der Bestimmung von Endophyten auf makro-, mikroskopischer und molekularbiologischer Ebene

In Kapitel 2.2.2 wird auf die Notwendigkeit der Bestimmung makroskopischer Merkmale wie der Farbe der Kulturen, ihrer Kulturmorphologie, der Oberflächenbeschaffenheit der Thalli, ihrer Wachstumsgeschwindigkeit sowie etwaigen Verfärbungen des Agars hingewiesen. Zwar ermöglicht dies keine genaue Bestimmung, kann aber im Zweifelsfall, wenn eine Bestimmung durch mikroskopische oder molekularbiologische Methoden nicht eindeutig ist, die nötigen Information liefern, um eine Kultur einer bestimmten Art zuzuordnen (Petrini & Petrini, 2010). Mit mikroskopischen Methoden läßt sich in vielen Fällen die Gattung bestimmen, unter der Voraussetzung, daß Fortpflanzungsstrukturen vorhanden und unter dem Mikroskop sichtbar sind. Handelt es sich jedoch um ein steriles Myzel oder um eine Kultur, die nicht zur Sporenbildung angeregt werden kann, ist eine mikroskopisch Charakterisierung nicht

möglich, wie dies bei *P. commune* (EP1) und *P. purpurogenum* (EPC) der Fall (4.3.1) war. Die DNA-Sequenzanalyse ist in solchen Fällen eine effektive Methode, um sterile Kulturen oder auch solche, denen durch mikroskopische Methoden keine Art zuzuordnen ist, näher zu charakterisieren (Arnold et al., 2000; Guo et al., 2000). Dabei werden die erhaltenen DNA-Sequenzen mit der NCBI-Gendatenbank (National Center for Biotechnology Information) verglichen. Wie jedoch Hyde & Soytong (2008) und Seena et al. (2008) kritisieren, ist der heutige Wissensstand über Fehler in der DNA-Extraktion sowie das Klonieren und Sequenzieren unvollständig. Auch ein Mangel an Pilz-DNA-Sequenzen in den Datenbanken stellt ein Problem dar, da zu wenige Informationen für eine sichere Evaluierung der Übereinstimmungen von Arten, Gattungen und manchmal sogar Familien zur Verfügung stehen. Daher sollten auch molekularbiologische Ergebnisse immer unter Vorbehalt betrachtet werden. Auch nach Hebert et al. (2002) ist die Methode des DNA-Barcodings vor allem durch die phänotypische Plastizität von Pilzen, die ineffektive Behandlung kryptischer Taxa sowie die ungenaue Identifizierung pleiomorpher Organismen aufgrund der Unkenntnis ihrer Lebenszyklen limitiert.

Zusätzlich wird eine Bestimmung durch das sogenannte "Holomorph-Konzept" erschwert. Pilze sind häufig pleiomorphisch, das heißt, sie können in unterschiedlichen morphologischen Formen vorliegen. Man unterscheidet dabei zwischen Pilzen mit asexueller Fruktifikationsform, welche als Anamorph, und Pilzen mit sexueller Fruktifikationsform, welche als Teleomorph bezeichnet werden. Anamorph und Teleomorph besitzen unterschiedliche Namen, gemeinsam werden sie als Holomorph zusammengefaßt (Petrini & Petrini, 2010). Für jedes Teleomorph gibt es allerdings mehrere Anamorphe, welche dann als Synanamorphe bezeichnet werden, wie dies von Shenoy et al. (2007) für das Teleomorph *Orbilia auricolor* beschrieben wurde. Es wird außerdem angenommen, daß ein Fünftel aller bekannten Pilze, die ohne sexuelle Fruktifikationsform vorliegen, erst einem Teleomorph zugeordnet werden müssen (Reynolds et al., 1993). Ob es sich bei den in dieser Arbeit behandelten Isolaten EP1 und EP2, welche mittels DNA-Sequencing als *Penicillium commune* Thom 1910 identifiziert wurden (siehe Tab. 13 und Tab. 14), um Synanamorphe handelt, ist unklar und kann ohne weitere phylogenetische Untersuchungen nicht beurteilt werden. Der starke Unterschied im Temperaturoptimum von *P. commune* (EP1) und *P. commune* (EP2) (Abb. 9) deutet

jedoch darauf hin, daß es sich dabei um ein pleiomorphisches Phänomen handeln könnte, da dies häufig bei Pilzen unterschiedlicher Habitate auftritt und Isolat EP1 22°C bevorzugt, während Isolat EP2 15°C bevorzugt (Burnett, 2003). Unabhängig davon soll erwähnt werden, daß *P. commune* bereits häufig als Endophyt isoliert werden konnte, so zum Beispiel aus *Pinus sylvestris* L. (Kowalczyk et al., 2004). Isolat EP3 konnte als *Neosartorya fischeri* (Wehmer) Malloch & Cain 1972 (siehe Tab. 15) identifiziert werden, es handelt sich dabei um das Teleomorph des anamorphen *Aspergillus fischerianus* Samson & W. Gams 1985. Wie Tab. 21 zeigt, liegt das gemessene Temperaturoptimum bei 37°C, während bei 15°C kaum Wachstum zu verzeichnen ist. In der Literatur ist das Temperaturoptimum mit 26-45°C angegeben, das Minimum liegt bei 11-13°C (Domsch et al., 2007). Auch *Neosartorya* wird in der Literatur häufig als Endophyt erwähnt, so zum Beispiel von Marquez et al. (2007), Li et al. (2008) und Karamchand et al. (2009). Auch Isolat EP4, bei welchem es sich laut NCBI-Gendatenbank um *Penicillium turbatum* (Westling) (siehe Tab. 16) handelt, konnte zum Beispiel von Schmeda-Hirschmann et al. (2005) und Rovati et al. (2010) als Endophyt isoliert werden. Bei Isolat EPC handelt es sich laut DNA-Sequenz-Vergleich um *Penicillium purpurogenum* Stoll 1904 (siehe Tab. 17), der ebenfalls bereits in diversen Arbeiten als Endophyt erwähnt wurde (El-Morsy, 2004; Franceschini et al., 2005; Linaldeddu et al., 2005).

Obwohl derzeit vor allem Medizinalpflanzen im Focus der Endophytenforschung stehen und daher auch endophytische Pilze der Gattungen *Alpinia* und *Curcuma* auf bioaktive Substanzen untersucht worden sind, wurde bei früheren Studien (siehe Kapitel 1.2.6) keiner der in der vorliegenden Arbeit isolierten Endophyten gefunden. Unter dem Blickwinkel der hohen Diversität endophytischer Gemeinschaften südostasiatischer Pflanzen (Tomita, 2003) und der allgemeinen Diversität endophytischer Pilze (Rodriguez et al., 2009) ist dies kein ungewöhnliches Ergebnis und zeigt vielmehr den enormen Bedarf an weiteren Studien zur Erschließung des endophytischen Kontinuums.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott SP, 2002. Mycotoxins and Indoor Moulds. *Indoor Environment Connections* 3(4): 14-24.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA, 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* 3: 267-274.
- Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA, 2003. Fungal Endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Vol. 100(26): 15649-15654.
- Banu GS, Kumar G, 2009. Preliminary Screening of Endophytic Fungi from Medicinal Plants in India for Antimicrobial and Antitumor Activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 2(2): 566.571.
- Beahdy J, 1974. Recent Developments of Antibiotic Research and Classification of Antibiotics According to Chemical Structure. *Advances in Applied Microbiology* 18: 309 - 406.
- Betina V, 1989. *Bioactive Molecules - Mycotoxins*. Elsevier, Amsterdam.
- Brem B, 2002. Verbreitung und insektizide Wirkung charakteristischer Inhaltsstoffe aus tropischen Aglaia- und Stemona-Arten. Dissertation, Universität Wien.
- Burnett J, 2003. *Fungal Populations and Species*. Oxford University Press, Oxford.
- Bush LP, Wilkinson HH, Schardl CL, 1997. Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte Symbioses. *Plant Physiology* 114: 1-7.

- Busi S, Peddikotla P, Upadyayula SM, Yenamandra V, 2009. Isolation and Biological Evaluation of Two Bioactive Metabolites from *Aspergillus gorakhpurensis*. Records of Natural Products 3(3): 161-164.
- Carroll GC, 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials, in: Fokkema NJ & van den Heuvel J (Eds.), Microbiology of the Phyllosphere, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 205-222.
- Cho J, Cha SH, Sok DE, 1994. Presynaptic Effects of Verruculogen on Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Uptake and Release in Rat Brain. Korean Journal of Biochemistry 27(4): 353-356.
- Clark EM, White JW, Patterson RM, 1983. Improved histochemical techniques for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue and methods of *in vitro* culture of the fungus. Journal of Microbiological Methods 1: 149-155.
- Davey ML, Currah RS (2006). Interactions between mosses (Bryophyta) and fungi. Canadian Journal of Botany 84(10): 1509-1519.
- Ding G, Liu S, Guo L, Zhou Y, Che Y, 2007. Antifungal Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis foedan*. Journal of Natural Products, published on web.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH, 2007. Compendium of soil fungi. IHW Verlag, Eching.
- Dulaney EL, Gray RA, 1962. Penicillia that make (N-formyl)-hydroxyamino-acetic acid, a new fungal product. Mycologia 54: 253-287.
- Duong LM, Jeewon R, Lumyong S, Hyde KD, 2006. DGGE coupled with ribosomal DNA phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes on living leaves of *Magnolia liliifera*. Fungal Diversity 23: 121-138.

- Duong LM, McKenzie EHC, Lumyong S, Hyde KD, 2008. Fungal succession on senescent leaves of *Castanopsis diversifolia* in Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. Fungal Diversity 30: 23-36.
- El-Morsy EM, 2004. Evaluation of microfungi for the biological control of water hyacinth in Egypt. Fungal Diversity 16: 35-51.
- Engelmeier D, 2002. Biotests with phytopathogenic microfungi for determination of antifungal activities from different natural compounds. Dissertation, Universität Wien.
- Ernst M, 2005. Verbreitung und funktionelle Charakterisierung endophytischer Pilze in *Phragmites australis* am Bodensee. Dissertation, Universität Konstanz.
- Filip P, Weber RWS, Sterner O, Anke T, 2003. Hormonemate, a New Cytotoxic Compound from the Endophytic Fungus *Hormonema dematioides*. I. Identification of the Producing Strain, and Isolation and Biological Properties of Hormonemate. Zeitschrift für Naturforschung 58c: 547-552.
- Franceschini A, Linaldeddu BT, Marras F, 2005. Occurrence and distribution of fungal endophytes in declining cork oak forests in Sardinia (Italy). Integrated Protection in Oak Forests 28(8): 67-74.
- Fry WE, Goodwin SB, Dyer AT, Matuszak JM, Drenth A, Tooley PW, Sujkowski LS, Koh YJ, Cohen BA, Spielman LJ, Deahl KL, Inglis DA, Sandlan KP, 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways and implications. Plant Disease 77: 653-661.
- Gao F, Dai C, Liu X, 2010. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. African Journal of Microbiology Research 4(13): 1346-1351.

- Guo L, Wu J, Han T, Tong C, Rahman K, Qin L, 2008. Chemical Composition, Antifungal and Antitumor Properties of Ether Extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its Endophytic Fungus *Chaetomium fusiforme*. *Molecules* 13: 2114-2125.
- Guo LD, Hyde KD, Liew ECY, 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* 147: 617-630.
- Guo LD, Hyde KD, Liew ECY, 2001. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 1-13.
- Hänsel R, Sticher O, 2004. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, 7. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 613-615.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2002. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270: 313-321.
- Hegnauer R, 1963. *Chemotaxonomie der Pflanzen II: Monocotyledonae*. Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, pp. 451-471.
- Ho W, To P, Hyde KD, 2003. Induction of antibiotic production of freshwater fungi using mix-culture fermentation. *Fungal Diversity* 12: 45-51.
- Hoffmeister D, Keller NP, 2006. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports* 24: 393-416.
- Horie Y, Yamazaki M, 1981. Productivity of the tremorgenic mycotoxins, fumitremorgins A and B in *Aspergillus fumigatus* and allied species. *Nippon Kingakkai Kaiko* 22: 113-119.
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H, Sun M, 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33: 61-75.

- Hyde KD, Soyong K, 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal diversity* 33: 163-173.
- Kaczka EA, Gitterman CO, Dulaney EL, Folkers K, 1962. Hadacidin, a new growth-inhibitory substance in human tumor systems. *Biochemistry* 1: 340-343.
- Karamchand KS, Sridhar KR, Bhat R, 2009. Diversity of fungi associated with estuarine sedge *Cyperus malaccensis* Lam. *Journal of Agricultural Technology* 5(1): 111-127.
- Kimmons CA, Gwinn KD, Bernard EC, 1990. Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Plant Disease* 74: 757-761.
- Kowalczyk A, Kacprzak M, Manka M, 2004. Fungi inhabiting Scots Pine (*Pinus sylvestris*) seeds in various stages of extraction process. *The Polish Phytopathological Society* 33: 53-70.
- Krebs KG, Heusser D, Wimmer H, 1967. Sprühreagentien, in: *Dünnschichtchromatographie*, Stahl E (Ed.), Springer Verlag, Berlin, pp. 813-859.
- Kreisel H, Schauer F, 1987. *Methoden des mykologischen Laboratoriums*. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 46-52.
- Kress WJ, Prince LM, Williams KJ, 2002. The phylogeny and new classification of the Gingers (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. *American Journal of Botany* 89: 1682-1696.
- Kress, WJ, 1990. The phylogeny and classification of the Zingiberales. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 77: 698-721.
- Krings M, Taylor TN, Hass H, Kerp H, Dotzler N, Hermsen EJ, 2007. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old landplant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist* 174(3): 648-657.

- Ladino C, Schneeberger EE, Rabito CA, Lynch RD (1989). Reduction an adenine nucleotide content of clone 4 mdck cells: effects on multiplication, protein synthesis, and morphology. *Journal of Cellular Physiology* 140: 186-194.
- Larsen K, Larsen SS, 2006. *Gingers of Thailand*. Maerim, Chiang Mai, Thailand.
- Leuchtmann A, 1984. Über *Phaeosphaeria* Miyake und andere bitunicate Ascomyceten mit mehrfach querseptierten Ascosporen. *Sydowia* 37: 75-194.
- Li G, Zhang K, Xu J, Dong J, Liu Y, 2007. Nematicidal Substances from Fungi. *Recent Patents on Biotechnology* 1(2): 1-22.
- Li J, Zhao J, Xu L, Zhou L, Li X, Wang J, 2008. Endophytic fungi from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 24(5): 733-737.
- Li WC, Zhou J, Guo SY, Guo LD, 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal diversity* 25: 69-80.
- Linaldeddu BT, Franceschini A, Pulina MA, 2005. Epidemiological aspects of *Biscogniauxia mediterranea* in declining cork oak forest in Sardinia (Italy). *Integrated Protection in Oak Forests* 28(8): 75-81.
- Lugauskas A, 2005. Potential toxin producing micromycetes on food raw material and products of plant origin. *Botanica Lithuanica* 7: 3-16.
- Luginbühl M, Müller E, 1980. Endophytische Pilze in den oberirdischen Organen von 4 gemeinsam an gleichen Standorten wachsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*, *Ilex*, *Ruscus*). *Sydowia* 33: 185-209.

- Lumyong S, Bussaban B, Lumyong P, Hyde KD, McKenzie EHC, Asano K, Tomita F, 2004. Evaluation of Endophytic Fungi from Zingiberaceae for Antibiotic Production. *Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics* 17: 472-476.
- Marquez SS, Bills GF, Zabalgogezcoa I, 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* 27: 171-195.
- Moller W, DeVay J, 1968. Insect transmission of *Ceratocystis fimbriata* in deciduous fruit orchards. *Phytopathology* 58: 1499-1508.
- Müller E, Loeffler W, 1992. *Mykologie: Grundriss für Naturwissenschaftler und Mediziner*, 5. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp. 6-8.
- Nicoletti R, Ciavatta ML, Buommino E, Tufano MA, 2008. Antitumor Extrolites Produced by *Penicillium* Species. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2(1): 1-23.
- Nielsen PV, Beuchat LR, Frisvad JC, 1988. Growth of and Fumitremorgin Production by *Neosartorya fischeri* as Affected by Temperature, Light, and Water Activity. *Applied and Environmental Microbiology* 54(6): 1504-1510.
- Niere BI, Speijer PR, Gold CS, Sikora RA, 1999. Fungal endophytes from bananas for the biocontrol of *Radopholus similis*, in: Frison EA, Gold CS, Karamura EB, Sikora EA (Eds.), *Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa*, INIBAP, Montpellier, pp. 313-318.
- Pancharoen O, Prawat U, Tuntiwachwuttikul P, 2000. Phytochemistry of the Zingiberaceae. *Studies in Natural Products Chemistry* 23, part D, Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 797-865.
- Penzig AJO, 1882. *Fungi Agromiculi*. *Michelia* 2: 385-503.

- Petrini LE, Petrini O, 2010. Schimmelpilze und deren Bestimmung, 3. Auflage. Gebrüder Borntraeger, Stuttgart, pp. 21-28.
- Petrini O, Dreyfuss M, 1981. Endophytische Pilze in epiphytischen Araceae, Bromeliaceae und Orchidaceae. *Sydowia* 34: 135-145.
- Petrini O, 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial Ecology of Leaves*, in: Andrews JH & Hirano SS (Eds.), Springer Verlag, New York, pp. 179-197.
- Photita W, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD, 2004. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity* 16: 131-140.
- Pirozynski KA, Malloch DW, 1975. The origin of landplants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6(3): 153-164.
- Puntaric D, Bosnir J, Smit Z, Skes I, Baclaic Z, 2001. Ochratoxin A in Corn and Wheat. Geographical Association with Endemic Nephropathy. *Public Health* 42(2): 175-180.
- Redman RS, Ranson JC, Rodriguez RJ, 1999. Conversion of the Pathogenic Fungus *Colletotrichum magna* to a Nonpathogenic, Endophytic Mutualist by Gene Disruption. *Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol. 12(11): 969-975.
- Reisch J, Probst W, Gröger D, 1990. Die Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Trennung und Bestimmung von Acridonalkaloiden. *Pharmazie* 45: 500-502.
- Reynolds DR, Taylor JW (eds.), 1993. The fungal holomorph: Mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB International, Oxon.
- Rivera Varas VV, Freeman TA, Gusmestad NC, Secor GA, 2007. Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. *Phytopathology* 97: 1331-1337.

- Rodriguez RJ, Redman RS, Henson JM, 2005. Symbiotic Lifestyle Expression by Fungal Endophytes and the Adaptation of Plants to Stress: Unraveling the Complexities of Intimacy, in: Dighton J, White JF, Oudemans P (Eds.), *The Fungal Community - Its Organization and Role in the Ecosystem*, third ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 683-695.
- Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS, 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182(2): 314-330.
- Roth L, Frank H, Kormann K, 1990. *Giftpilze - Pilzgifte*. Nikol Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hamburg.
- Rovati JI, Delgado OD, Figueroa LIC, Farina JI, 2010. A novel source of fibrinolytic activity: *Bionectria* sp., an unconventional enzyme-producing fungus isolated from Las Yungas rainforest (Tucuman, Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(1): 55-62.
- Sakai K, Miyazaki Y, 1989. Effects of extracts of Zinigeraceae herbs on gastric secretion in rabbits. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 37: 215-217.
- Schmeda-Hirschmann G, Hormazabal E, Astudillo L, Rodriguez J, Theoduloz C, 2005. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(1): 27-32.
- Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust HJ, 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research* 97: 1447-1450.
- Seena S, Wynberg N, Bärlocher F, 2008. Fungal diversity during leaf decomposition in a stream assessed through clone libraries. *Fungal Diversity* 30: 1-14.

- Shenoy BD, JEewon R, Hyde KD, 2007. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity* 26: 1-54.
- Sirirugsa P, 1999. Thai Zingiberaceae: Species Diversity And Their Uses. *Pure and Applied Chemistry* 70(11): 2111.
- Steffan N, Grundmann A, Afiyatullof F, Ruan H, Li SM, 2009. FtmOx1, a non-heme Fe(II) and α -ketoglutarate-dependent dioxygenase, catalyses the endoperoxide formation of verruculogen in *Aspergillus fumigatus*. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7: 4082- 4087.
- Stierle A, Strobel GA, Stierle D, 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. *Science* 260: 214-216.
- Strobel G, Daisy B, Castillo U, 2005. The Biological Promise of Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Plant Pathology Journal* 4(2): 161-176.
- Strynadka NCJ, Adachi H, Jensen SE, Johns K, Sielecki A, Betzel C, Sutoh K, James MNG, 1992. Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1,7 Å resolution. *Nature* 359: 700-705.
- Taechowisan T, Lumyong S, 2003. Activity of endophytic actinomycetes from roots of *Zingiber officinale* and *Alpinia galanga* against phytopathogenic fungi. *Annals of Microbiology* 53(3): 291-298.
- Tan RX, Zhou WX, 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Report* 18: 448-459.
- Taylor TN, Taylor EL, 2000. The rhynie chert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. In: *Microbial Endophytes* (eds. Bacon CW, White JF). Marcel Dekker, New York, pp. 33-45.

- Tejesvi MV, Kini KR, Prakash HS, Subbiah V, Shetty HS, 2006. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity* 24: 37-54.
- Teuscher F, 2005. Bioaktive Naturstoffe aus marinen endophytischen und schwammassoziierten Pilzen des Indischen und Pazifischen Ozeans. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Tomita F, 2003. Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity* 14: 187-204.
- Tsai HF, Liu JS, Staben C, Christensen MJ, Latch GCM, Siegel MR, Schardl CL, 1994. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 2542-2546.
- Van Wyk M, Al Adawi AO, Khan IA, Deadman ML, Al Jahwari AA, Wingfield BD, Ploetz R, Wingfield MJ, 2007. *Ceratocystis manginecans* sp. nov., causal agent of a destructive mango wilt disease in Oman and Pakistan. *Fungal Diversity* 27: 213-230.
- Vu T, Hauschild R, Sikora RA, 2006. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. *Journal of Nematology* 8: 847-852.
- Wagener RE, Davis ND, Diener UL, 1980. Penitrem A and Roquefortin Production by *Penicillium commune*. *Applied and Environmental Microbiology* 39(4): 882-887.
- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P, Kogel KH, 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(38): 13386-13391.

- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93: 2325-2327.
- Wiyakrutta S, Sriubolmas M, Panphut W, Thongon N, Danwisetkanjana K, Ruangrunsi N, Meevootisom V, 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 265-272.
- Yuen TK, Hyde KD, Hodgkiss IJ, 1999. Interspecific Interactions among Tropical and Subtropical Freshwater Fungi. *Microbial Ecology* 37: 257-262.
- Zabalgogezcoa I, 2008. Review. Fungal endophytes and their interactions with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 138-146.

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Untersuchte Pflanzen	11
Tab. 2: Methoden zur Oberflächensterilisation	14
Tab. 3: Bestandteile der Nährmedien	15
Tab. 4: Interaktionstypen zur Erstellung eines Punktesystems	19
Tab. 5: Laufmittelgradient für HPLC.....	21
Tab. 6: Laufmittel für Säulenchromatographie.....	23
Tab. 7: Bestandteile der Nährmedien M I - M V	25
Tab. 8: Lösungsmittel & Chemikalien für phytochemische Analysen	26
Tab. 9: Kunstfutter für <i>Spodoptera</i> -Larven für Fraßversuche	26
Tab. 10: Geräte & Chemikalien für molekularbiologische Untersuchung	26
Tab. 11: Laborgeräte	27
Tab. 12: Sonstiges.....	27
Tab. 13: Blast-Suche für EP1.....	33
Tab. 14: Blast-Suche für EP2.....	33
Tab. 15: Blast-Suche für EP3.....	34
Tab. 16: Blast-Suche für EP4.....	34
Tab. 17: Blast-Suche für EPC	35
Tab. 18: Vergleich der Kulturmedien	36
Tab. 19: Isolierte Endophyten	37
Tab. 20: Wuchsgeschwindigkeit bei Zugabe der Pflanzenextrakte.....	38
Tab. 21: Temperaturoptimum.....	39
Tab. 22: Auswertung der Fraßversuche an <i>Spodoptera littoralis</i>	48
Tab. 23: Errechnete Antagonismusindices.....	50

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stammbaum der Zingiberales	3
Abb. 2: Herbarbeleg von <i>Curcuma</i> sp.....	12
Abb. 3: Herbarbeleg von <i>Alpinia malaccensis</i>	13
Abb. 4: Bekannte Mykotoxine	29
Abb. 5: Bekannte Mykotoxine von <i>Penicillium commune</i>	30
Abb. 6: Bekannte Mykotoxine von <i>Neosartorya fischeri</i>	31
Abb. 7: Mykotoxine von <i>Penicillium turbatum</i> und <i>Penicillium purpurogenum</i>	31
Abb. 8: Unterschiede in Wuchsverhalten bzw. Wachstumsgeschwindigkeit bei Zugabe spezifischer Pflanzenextrakte.....	39
Abb. 9: Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit nach Inkubationstemperatur	40
Abb. 10: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von <i>Alpinia malaccensis</i> und <i>Penicillium commune</i> (EP1).....	41
Abb. 11: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von <i>Alpinia malaccensis</i> und <i>Penicillium commune</i> (EP2).....	42
Abb. 12: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von <i>Alpinia malaccensis</i> und <i>Neosartorya fischeri</i> (EP3)	43
Abb. 13: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von <i>Alpinia malaccensis</i> und <i>Penicillium turbatum</i> (EP4)	44
Abb. 14: Vergleich der HPLC-Profile der EtOAc-Extrakte von <i>Curcuma</i> sp. und <i>Penicillium purpurogenum</i> (EPC)	45
Abb. 15: Dünnschichtchromatographie der Pilz- und Pflanzenextrakte	46
Abb. 16: Dünnschichtbioautographie mit <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	47
Abb. 17: Wachstumshemmung von <i>Spodoptera</i> -Larven in %.....	48
Abb. 18: Letalität von <i>Spodoptera</i> -Larven in %.....	49
Abb. 19: Antagonismusindex.....	50
Abb. 20: Kompetitonstests	51

7.3 Danksagung

An oberster Stelle möchte ich mich herzlichst bei Ao.Univ.Prof.Dr. Karin Vetschera bedanken. Sie war erste Anlaufstelle für Schwierigkeiten und Probleme, egal, ob fachlicher oder bürokratischer Natur. Ich möchte mich außerdem für ihr Vertrauen in mich bedanken, mich mit dem Projekt, welches Grundlage für diese Diplomarbeit war, zu betrauen. Mir wurde stets ein roter Faden gegeben, und dennoch wurde mir Freiraum bei der Gestaltung der Arbeit gestattet. Ich bedanke mich für die hervorragende Betreuung von ihrer Seite, und die Fähigkeit, meine enorme Faszination für dieses Thema zu wecken.

Mein Dank sei auch an die "Gesellschaft zur Förderung der Pflanzenwissenschaften" für ihre finanzielle Unterstützung gerichtet.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Mag. Dr. Alexander Urban und Mag. Dr. Carolin Anna Rebernig für die DNA-Sequenzierung der Endophyten, sowie bei Mag. Michael Barfuss und Reinhold Stockenhuber für ihre Unterstützung bei der Klärung molekularbiologischer Fragen.

Ein großes Dankeschön sei an dieser Stelle an Mag. Johann Schinnerl gerichtet, der mich geduldig beim Erlernen der praktischen Arbeit unterstützte und durch seine immerwährende konstruktive Kritik stets dazu anspornte, diverse Methoden immer wieder zu verfeinern und zu verbessern.

Des Weiteren möchte ich mich bei Markus Hofbauer und Stefan Mikulicic für die Durchführung der Insektentests bedanken, sowie bei meinen Kollegen Adriane Raninger, Andrea Zraunig, Tshering Doma Bhutia, Sigrid Steins und Andreas Berger. Ihnen ist und war das hervorragende Arbeitsklima und die Freude an der Arbeit zu verdanken.

Besonderer Dank gebührt meiner langjährigen Freundin, Kollegin und Mitstreiterin Birgit Gschweidl, die es schaffte, mich immer wieder zu motivieren. Ich werde unser "Diplomarbeits-Camp" nie vergessen. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Renate

Zechmeister, die nie aufgab, mir ihren Weitblick vermitteln zu wollen, und bei meinem Freund Maximilian Hödl, der sich nie darüber beklagte, wenn ich zu tun hatte.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren moralische und finanzielle Unterstützung dieses Studium nicht möglich gewesen wäre, und die immer an mich geglaubt haben. Meiner Mutter, Mag. Eveline Zahradnik, danke ich für den eisernen Willen, den sie mir auf meinen Lebensweg mitgegeben hat, und meinem Vater Friedrich Zahradnik dafür, daß er schon früh mein Interesse an Natur und Naturwissenschaft weckte.

7.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden verschiedene Methoden zur Oberflächensterilisierung und Isolierung endophytischer Pilze aus Rhizomen von *Alpinia malaccensis* und Wurzeln von *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) getestet. Es konnten fünf Pilz-Endophyten isoliert und mittels DNA-Sequenzierung charakterisiert werden. Ihre Dichlormethan-Extrakte konnten mittels Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie phytochemisch charakterisiert und mit den jeweiligen Pflanzenextrakten verglichen werden. Dabei konnten keinerlei Übereinstimmungen der Inhaltsstoffprofile von Pilzen und Pflanzen festgestellt werden. Physiologische Tests zur Bestimmung der Temperaturoptima ergaben für alle Isolate ein Wachstumsoptimum von 22°C, mit Ausnahme von *Neosartorya fischeri*, dessen Optimum bei 37°C lag. Weiters wurde der Einfluss der Pflanzenextrakte von *Alpinia malaccensis* und *Curcuma* sp. auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze untersucht. Das *Alpinia*-Medium führte bei *Penicillium commune* (EP2) zu schnellerem Wachstum als das *Curcuma*-Medium und das extraktfreie Kontrollmedium. Hingegen ist das Wachstum des aus *Curcuma* sp. isolierten Pilzes *Penicillium purpurogenum* (EPC) auf dem *Alpinia*-Medium vollständig gehemmt. Dünnschichtbioautographien mit Sporen von *Cladosporium sphaerospermum* zeigten für alle Isolate mit Ausnahme von *Neosartorya fischeri* moderate antifungale Wirkung. Ebenso zeigten die Extrakte der Pilzisolate in Fraßversuchen an *Spodoptera*-Larven moderate Wirkung. Mit Ausnahme von *Neosartorya fischeri* (EPC) wurde eine mehr oder weniger hohe Sterblichkeitsrate der Larven beobachtet. Konkurrenztests der Endophyten untereinander sowie gegen *C. sphaerospermum* ergaben eine erhöhte Konkurrenzfähigkeit für *Penicillium commune* (EP2), *Penicillium commune* (EP1) und *Neosartorya fischeri* (EP3) gegenüber *Cladosporium sphaerospermum* und *Penicillium purpurogenum* (EPC).

7.5 Abstract

Within the framework of this diploma thesis different methods for surface sterilization and isolation of fungal endophytes from rhizomes of *Alpinia malaccensis* and roots of *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) were tested. Five endophytes were isolated and characterized through DNA-sequencing. Their dichloromethane extracts were phytochemically characterized by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) and compared with the profiles of the plant extracts. Profiles of extracts of endophytes proved to be completely different. Physiological tests showed a growth optimum of 22°C for all isolates except *Neosartorya fischeri*, which preferred higher temperatures of 37°C. Furthermore the effect of plant extracts of *Alpinia malaccensis* and *Curcuma* sp. on the growth speed of the fungi were analyzed. The *Alpinia*-medium lead to a more increased growth speed of *Penicillium commune* (EP2) than the *Curcuma*-medium and the extract-free control-medium. By contrast, growth of the endophyte *Penicillium purpurogenum* (EPC) isolated from *Curcuma* sp. was completely inhibited. Thin layer bioautography with spores from *Cladosporium sphaerospermum* showed moderate antifungal activity for all isolates except for *Neosartorya fischeri* (EP3). Similar results were obtained with feeding experiments on *Spodoptera*-larvae, where all isolates except of *Neosartorya fischeri* (EP3) showed a more or less existent mortality rate. Competition tests between endophytes and against *Cladosporium sphaerospermum* showed increased competitiveness of *Penicillium commune* (EP1), *Penicillium commune* (EP2) und *Neosartorya fischeri* (EP3), opposite to *Cladosporium sphaerospermum* and *Penicillium purpurogenum* (EPC).

7.6 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Staatsbürgerschaft: Österreich
 Familienstand: ledig
 Geburtsdatum: 06.09.1984

Werdegang

September 2010	Poster-Präsentation am 19. Internationalen Symposium für "Biodiversität und Evolutionsbiologie", Department für Systematik und Evolutionsbiologie, 1030 Wien
März - August 2009	Biohelp - Schädlingsbekämpfung, Logistik, 1110 Wien
Juli - September 2008	Querbeet - Ethnobotanik, Beratung und Verkauf, 1060 Wien
Juni 2008	Diplomarbeit und Projektarbeit "Pilz-Endophyten in Ingwergewächsen", Department für Systematik und Evolutionsbiologie, 1030 Wien
Mai 2007 - Februar 2008	Projektarbeit FWF-Projekt "DNA-Sequenzierung von Großpilzen in naturnahen und Forst-Wäldern", Fakultät für Biodiversität, 1030 Wien
Juli 2005 - März 2006	Electrovac - hermetic packages, Musterfertigung, 3400 Klosterneuburg
Oktober 2002	Inskription Diplomstudium Biologie - Botanik, Universität Wien
Juli - August 2002	Agrarmarkt Austria, Datenerfassung, 1200 Wien
1994 - 2002	Bundesgymnasium Hollabrunn, 2020, Abschluss mit Matura am 07.06.2002
1990 - 1994	Volksschule Hollabrunn, 2020

