

Untersuchungen über endophytische Pilze. I, Infektionswege von Endophyten bei *Hedera helix* L.

Autor(en): **Luginbühl, Martino / Müller, Emil**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **90 (1980)**

Heft 3-4

PDF erstellt am: **25.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-63722>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Untersuchungen über endophytische Pilze

I. Infektionswege von Endophyten bei *Hedera helix* L.

Martino Luginbühl und Emil Müller

Mikrobiologisches Institut
der Eidgenössischen Technischen Hochschule
Zürich

Manuskript eingegangen am 15. Dezember 1980

Verschiedentlich wurden in jüngster Zeit Pilze im Inneren von gesunden, voll assimilierenden Blättern nachgewiesen, die keinerlei Schädigungen in den Geweben verursachen, also nicht phytopathogen sind (Zusammenfassung vgl. Petrini et al., 1979).

Erste Arbeiten befassten sich mit dem Befall von Coniferennadeln (z.B. Carroll et al., 1977; Petrini und Müller, 1979). Endophyten leben aber auch in immergrünen Laubpflanzen (Luginbühl und Müller, 1980) und in einjährigen Getreidearten (Luginbühl et al., 1980). In all diesen Fällen wurde der Nachweis solcher Pilze durch Isolierung aus den an der Oberfläche sterilisierten oberirdischen Organen (Blätter, Stengel, Früchte) erbracht.

Je nach Pflanzenart und Organteil lag die Infektionsrate zwischen 30% und 100%. Bei *Taxus baccata* L. war beim Befall hauptsächlich nur eine einzige Pilzart, *Guignardia philo-prina* (Berk. et Court) Van der Aa, beteiligt, in den meisten anderen Pflanzen hingegen erwies sich die Zahl der Pilzarten als relativ gross: Bei *Juniperus communis* L. wurden z.B. 108, bei *Ilex aquifolium* L. 38, bei *Hedera helix* L. 24 Arten festgestellt.

Ueber die Herkunft der Endophyten und ihre Infektionswege waren aber bis anhin nur Vermutungen anhand der Verbreitung der Pilze in den Pflanzenteilen möglich. So sind bei *Juniperus*-Nadeln und den parallelnervigen Phyllokladien von *Ruscus aculeatus* L. sprossnahe Partien signifikant stärker befallen als die Spitzen. Bei *Buxus sempervirens* L. und *Ilex aquifolium* L. dagegen wird die Mittelrippe bevorzugt besiedelt, was mit den Beobachtungen über die Epiphytenflora von Blättern verschiedener weiterer Pflanzen

übereinstimmt (Pugh & Buckley, 1971; Stadelmann, 1976). In *Hedera helix* L. ist der Befall gleichmässig verteilt; es gehören jedoch 60% der nachgewiesenen Pilze einer einzigen Art, *Cryptocline paradoxa* (De Not.) v. Arx, an. In den Stengeln wurden Endophyten aus der Rinde, jedoch nie aus dem Holz isoliert. In den Früchten konnten Pilze im Fruchtfleisch, aber nicht in den Samen gefunden werden.

Pilze könnten sowohl direkt von der Blattoberfläche in das Gewebe eindringen, als auch schon kurz nach der Keimung die junge Pflanze infizieren und sich im Inneren der Pflanzen ausbreiten. Eine Infektion durch die Leitbündel von der Wurzel her scheint dagegen ausgeschlossen.

Für die Ueberprüfung der geäusserten Vermutungen wurden deshalb einige Versuche durchgeführt, die nachfolgend dargestellt sind.

1. Material und Methoden

1.1. Aufzucht steriler Pflanzen

Voraussetzung für die experimentelle Aufklärung der Infektionsweise endophytischer Pilze sind sterile Pflanzen für Infektionsversuche. Aus praktischen Gründen muss es sich um leicht kultivierbare, anspruchslose, rasch wachsende Pflanzen handeln. Diesen Ansprüchen genügte *Hedera helix* am besten. Auch erwiesen sich in Vorversuchen die Samen dieser Pflanze als vollständig pilzfrei.

Für die Infektionsversuche sammelten wir jeweils im Februar in Ronco s/A (Kt. Tessin) reife Früchte, trennten im Labor die Samen vom Fruchtfleisch und sterilisierten sie an der Oberfläche mit 96%-Aethanol während 30 Sekunden. Anschliessend wurden sie auf 2%-Malzagarplatten ausgelegt. Innerhalb dreier Wochen keimten über 90% der ausgelegten Samen und wurden sofort zu dritt in vorbereitete 1 l-Erlenmeyerkolben gegeben. Diese enthielten eine Mischung von 325 cc Perlit, 125 cc Torfmull und 300 ml Melin-Norkrans-Nährlösung (Norkrans, 1949). Die Pflanzen wurden bei 20°C und einer täglichen Beleuchtungsdauer von 16 Stunden inkubiert.

Melin-Norkrans-Nährlösung

KH ₂ PO ₄	0,5	g
CaCl	0,05	g
NaCl	0,025	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,15	g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25	g
Sequestren (Eisenchelate, CIBA-GEIGY AG)	0,02	g
Glucose	2,5	g
Thiamin	25	µg
Wasser	1000	ml

1.2. Infektion durch Aufsprühen einer Sporensuspension

Die Vermutung eines Eindringens durch die Blattoberfläche wurde mit Aufsprühen von Sporensuspensionen auf 16 Wochen alte pilzfreie Pflanzen geprüft. Dazu dienten folgende häufig im Efeu auftretenden Pilze (vgl. Luginbühl & Müller, 1980): *Cryptocline paradoxa* (De Not.) v. Arx, *Epicoccum purpurascens* Ehrenb. ex Schlecht. *Phomopsis* Sacc. sp. Die Pilze wurden sowohl einzeln wie in einer Mischung 1:1 aus Sporen von *Cryptocline paradoxa* und *Phomopsis* sp. eingesetzt.

Die Sporensuspensionen wurden aus bewachsenen Schrägagarröhrchen gewonnen, nachdem die Keimfähigkeit der Sporen 80-95% erreicht hatte. In jedes Röhrchen wurden 10ml steriles Wasser gegeben und anschliessend fünf Minuten geschüttelt. Die Sporendichte wurde mit Hilfe einer Thoma-Kammer gezählt und auf 100 000 - 150 000 Sporen pro ml eingestellt. Die Suspension wurde anschliessend mit Hilfe eines Gaschromatographiezerstäubers und filtrierter Pressluft in Portionen von 1,5 ml pro Erlenmeyer auf die pilzfreien Pflanzen gesprüht.

Nach 10 und 14 Wochen wurden sowohl die infizierten Pflanzen als auch die nichtinfizierten Kontrollen auf endophytisches Pilzwachstum untersucht. In einem ersten Schritt wurde die Oberfläche der Blätter sterilisiert. Die noch sehr jungen Blätter wurden 30 Sekunden in 96%-Aethanol gegeben, 1 Minute in Javellewasser, 5:1 verdünnt, getaucht und gleich danach 30 Sekunden in 96%-Aethanol gewaschen. Die Blätter wurden anschliessend in fünf Stücke geschnitten und auf Petrischalen mit 2%-Malzagar ausgelegt. Diese wurden bei 18^o C und unregelmässiger Beleuchtung während dreier Wochen inkubiert.

1.3. Infektion von Keimpflanzen

Um festzustellen, wie weit Infektion von Keimpflanzen für den Befall mit Endophyten eine Rolle spielen könnte, wurden Mycelstücke von *Cryptocline paradoxa*, *Epicoccum purpurascens*, *Phomopsis* sp. sowie *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud auf Efeukeimlinge gegeben. Die Vorkultur der Pilze erfolgte auf Agarplatten mit 2%-Malzextrakt während 2 Wochen; die herausgestochenen Mycelstücke waren etwa 1 cm² gross. Nach 30 Wochen Inkubation wurde ein Teil der Blätter infizierter Pflanzen gleichzeitig mit gleichaltrigen nicht infizierten Kontrollen auf endophytische Pilze untersucht. Ein anderer Teil wurde auf epiphytische Pilze geprüft, wobei die Blätter ohne Oberflächensterilisation auf Nähragarplatten ausgelegt wurden.

2. Ergebnisse

2.1. Infektion durch Sporensuspension

Die im Alter von 16 Wochen mit einer Sporensuspension verschiedener Pilzarten besprühten, steril aufgezogenen Efeupflanzen wurden nach 10 und 14 weiteren Wochen auf endophytischen Befall untersucht. Die Pflanzen hatten eine Grösse von 15 bis 30 cm und trugen 6 bis 12 Blätter, die im Zeitpunkt der Infektion noch sehr klein und zart waren. Die Kutikula war dünn und verletzlich, was eine Rückisolation erschwerte. Vor allem musste ein Eindringen von Chemikalien ins Innere der Blätter vermieden werden. Die Befallshäufigkeit der Pflanzen durch die verschiedenen Pilzarten ist in Tab. 1 dargestellt. Nach 10 Wochen war die Infektion gering. Erst nach 14 Wochen ergab sich bei den mit *Phomopsis* sp. und *Epicoccum* infizierten Pflanzen ein deutlicher Befall von 20 bis 25%. *Cryptocline paradoxa* hingegen konnte praktisch nie nachgewiesen werden und entsprechend konnte aus Blättern mit der Mischinfektion von *Phomopsis* und *Cryptocline paradoxa* nur wieder *Phomopsis* zurückgewonnen werden. Nicht infizierte Kontrollpflanzen erwiesen sich als vollkommen steril. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass keimende Pilzsporen von aussen in die Pflanzen eindringen können.

2.2 Infektion von Keimpflanzen

Pflanzen aus Samen, die auf Mycelstücken ausgewählter Pilze gekeimt hatten, wurden zusammen mit steril gehaltenen Kontrollpflanzen nach 30 Wochen Kulturdauer wie im ersten Versuch auf Pilze untersucht. Die Pflanzenblätter hatten – im Unterschied zur ersten Versuchsserie – nie direkten Kontakt mit den Pilzen gehabt. Deshalb interessierten uns nicht nur die endophytisch lebenden, sondern auch die epiphytischen Pilze auf der Blattoberfläche. Bei der Kontrolle auf Pilzbefall wurde die Blattoberfläche nur bei einem Teil der Blätter sterilisiert und die restlichen unbehandelt auf die Malzagaroberfläche ausgelegt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt. Aus dem Samenkontakt mit *Epicoccum purpurascens* und mit *Aureobasidium pullulans* ergab sich ein Bewuchs der

Oberfläche von fast 90%, während sich *Phomopsis* deutlich weniger häufig und *Cryptocline paradoxa* nur geringfügig auf der Blattoberfläche ausbreiten konnte. Im Blattinnern dagegen war der Befall mit *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum purpurascens* und *Phomopsis* sp. gering und *Cryptocline paradoxa* fehlte wiederum völlig.

Das Mycel von *Aureobasidium*, *Epicoccum* und *Phomopsis* kann sich demnach von der keimenden Pflanze über die ganze Oberfläche ausbreiten, über die Stengel bis hinauf zu den jüngsten Blättern und den Knospen, und gelegentlich auch in die Pflanzenteile eindringen. Zum Teil dürfte das Mycel dann im Innern vordringen. Die Infektionsweise von *Cryptocline paradoxa* dürfte dagegen anders erfolgen. Möglicherweise direkt durch Konidien, die an toten Blättern gebildet werden. Der erste Versuch zeigt aber, dass auch dafür ganz besondere, im Labor nicht simulierbare Bedingungen herrschen müssen.

3. Diskussion

Der Vergleich der Verteilung endophytischer und epiphytischer Pilze in den untersuchten Blättern lässt einige aufschlussreiche Beobachtungen zu. Sowohl auf der Oberfläche als auch im Innern der Blätter werden bei *Buxus* und *Ilex* die Mittelrippen bevorzugt. An der Oberfläche sind die ökologischen Bedingungen für Mikroorganismen hauptsächlich in der Region der Mittelrippe günstig, wo, je nach Blattform, eine mehr oder weniger deutliche Rinne ausgebildet ist. Staubpartikel und Exudate der Pflanze lagern sich dort bevorzugt ab (Stadelmann, 1976), und können epiphytisch wachsenden Pilzen als Nahrungsgrundlage dienen. Auch bietet diese Rinne den Pilzen ein ehesten Schutz.

Die vorliegende Arbeit bestätigt am Beispiel von *Hedera*, dass von der Region der Oberfläche aus eine Infektion im Innern möglich ist. Allerdings ist eine quantitative Auswertung der erzielten Ergebnisse nicht sinnvoll, denn im Freiland wird der Infektionsprozess durch viele unkontrollierbare Umweltfaktoren beeinflusst (unterschiedliche Sporendichte, Konkurrenz und gegenseitige Förderung durch eine Vielzahl anderer Mikroorganismen, klimatische Veränderungen, verschiedene Altersstufen der Blätter). So ist bekannt, dass alte Blätter wegen der Verwitterung der Oberflächenwachse vermehrt Nährstoffe für Epiphyten und keimende Sporen abgeben (Stadelmann, 1976). In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass gewisse epiphytische Pilze die Wachsschicht auch abzubauen vermögen (McBride, 1972, auf Lärchennadeln mit dem REM nachgewiesen), und somit den Infektionsprozess für andere Pilze erleichtern. Pilze können auch durch die Spaltöffnungen eindringen. Die Tatsache, dass schon im Fruchtfleisch Endophyten vorhanden sind (Luginbühl & Müller, 1980) bringt den Gedanken nahe, dass diese Pilze die Pflanzen schon im Jugendstadium infizieren. Dies trifft auch zu. Das ausgedehnte epiphytische Wachstum zeigt aber auch, dass die Verbreitung in der Pflanze nicht unbedingt auf einen frühen Befall zurückzuführen ist. Eine aktive oder passive Verbreitung an der Oberfläche kann diese Pilze ebenso zu den ausdifferenzierten Blättern bringen, was auch den stärkeren Befall der Nadelbasis bei Koniferen erklärt. Nebst den günstigen ökologischen Bedingungen der Basis für Epiphyten können Pilze ebenso vom Stengel her zur Nadel oder zum Blatt gelangen.

Bei den Phyllokladien von *Ruscus* wird die Infektionsrate im untersten Teil der Phyllokladien zusätzlich dadurch erhöht, dass sich in dieser Region auch die Blüte befindet, die eine ideale Eintrittsstelle für Endophyten bildet.

Die Samen aller untersuchten Pflanzen erwiesen sich als pilzfrei. Eine Infektion in diesem Stadium kann deshalb ausgeschlossen werden.

Tabelle 1:

Infektionsversuch.

Die Infektion erfolgte durch eine auf die Blätter gesprühte Sporensuspension.

Infektionsdauer		Pilzart				
		<i>Cryptocline paradoxa</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	Mischinfektion	Kontrolle
10 Wochen	UB	48	–	48	48	48
	BB	2	–	2	5	–
14 Wochen	UB	46	70	46	48	20
	BB	–	19	13	11	–

Bei der Mischinfektion besprühten wir die Pflanzen mit einem Gemisch aus Sporen von *Phomopsis* sp. und *Cryptocline paradoxa*. Wir konnten jedoch nur *Phomopsis* sp. rückisolieren.

UB = untersuchte Blätter, BB = befallene Blätter.

Tabelle 2: Infektionsversuch.

Die keimenden Samen wurden im Kulturgefäß auf ein Agarstück gelegt, das mit einem der unten aufgeführten Pilze bewachsen war. Die Pflanzen wurden bis zur Untersuchung 30 Wochen inkubiert.

Pflanzenteil und Behandlungsart		Pilzart				
		<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Cryptocline paradoxa</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	Kontrolle
Blätter, oberflächensterilisiert	UB	56	56	58	58	38
	BB	7	–	2	3	–
Blätter, ohne Oberflächensterilisierung	UB	28	28	28	28	20
	BB	25	2	25	8	–
Stengel, oberflächensterilisiert	US	24	24	24	24	8
	BS	7	–	3	9	–

In der Tabelle wird jeweils die Anzahl der untersuchten Blätter (UB), resp. der untersuchten Stengelstücke (US) und der befallenen Blätter (BB), resp. der befallenen Stengelstücke (BS) angegeben.

Zusammenfassung

Der Infektionsweg einiger endophytisch, d.h. symptomlos im Innern von pflanzlichen Geweben wachsender Pilze wurde am Beispiel von unter sterilen Bedingungen kultivierten Efeupflanzen (*Hedera helix* L.) untersucht. Die ubiquistischen Arten *Epicoccum purpurascens* Ehrenb. ex Schlecht. und eine nicht näher bestimmbare *Phomopsis* sowie die mehr oder weniger artspezifische *Cryptocline paradoxa* (de Not.) v. Arx wurden sowohl mit Sporensuspension wie mit Myzelstücken auf verschieden alte Pflanzen gebracht und nach längerer Inkubationsdauer aus den Geweben rückisoliert. Infektionen gelangen sowohl auf Keimlingen wie auf älteren Pflanzen nur mit den Ubiquisten.

Summary

Studies on endophytic fungi.

I. Infection patterns of endophytes on *Hedera helix* L.

The pattern of infection of some endophytic fungi was examined for *Hedera helix* L. grown under sterile conditions. Spore suspensions and mycelia of the ubiquitous *Epicoccum purpurascens* Ehrenb. and a *Phomopsis* sp. as of the more or less host specific *Cryptocline paradoxa* (de Not.) v. Arx were brought in contact with plants of different ages and – after several weeks of incubation – reisolated. Infection through the plant surface succeeded only with the ubiquists on germs as on older plants.

Die vorliegende Arbeit wurde massgeblich durch einen Forschungskredit der Eidgenössischen Technischen Hochschule unterstützt.

Literatur

- Luginbühl, M. (1980). Endophytische Pilze bei *Buxus*, *Hedera*, *Ilex* und *Ruscus*. Dissertation, ETH Zürich, 78 S.
- Luginbühl, M. & Müller, E. (1980). Endophytische Pilze in den oberirdischen Organen von 4 gemeinsam an gleichen Standorten wachsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*; *Ilex*, *Ruscus*) *Sydowia* 333, 185-209.
- Luginbühl, M., Petrini, O. & Müller, E. (1980). Fungi endofitici nel frumento (*Triticum vulgare* Vill.). *Phytopathologia mediterranea*. 18, 192-194
- McBride, R.P. (1972). Larch leaf waxes utilized by *Sporobolomyces roseus* in situ. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 58, 329–352.
- Melin, E. (1936). Methoden der experimentellen Untersuchungen mykotropher Pflanzen. *Abderhalden: Handb. d. biol. Arbeitsmethd.* XI:4, Berlin.
- Norkrans, B. (1949). Some mycorrhiza-forming *Tricholoma* species. *Svensk. Bot. Tidskr.* 43, 485–490.
- Petrini, O. & Müller, E. (1979). Pilzliche Endophyten von Samenpflanzen am Beispiel von *Juniperus communis* L. *Sydowia* 32, 224–251.

-
- Petrini, O. & Müller, E. & Luginbühl, M. (1979). Pilze als Endophyten von grünen Pflanzen. *Naturwissenschaften* 66, 262–263.
- Pugh, G.J.F. & Buckley, N.G. (1971). The leaf surface as a substrate for colonisation by fungi. *Ecology of leaf surface microorganisms* (ed. Preece, T.F. Dickinson, C.H.) Academic Press, London, 431–445.
- Stadelmann, F. (1976). Die Apfel- und Birnen-Phyllosphären-Mikroflora und ihre Beeinflussung durch biotische und abiotische Faktoren, insbesondere durch *Venturia inequalis* (Bref.) Aderh. Dissertation, Universität Basel, 175 S.

Prof. E. Müller, Dr. M. Luginbühl
Mikrobiologisches Institut
ETH-Zentrum
CH-8092 Zürich