

**ERGOLINALKALOIDVORKOMMEN BEI CONVULVULACEEN:
BIOCHEMISCHE UND ÖKOLOGISCHE INTERAKTIONEN
EINER PFLANZE-PILZ-SYMBIOSE**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sabine Hellwig, geb. Kucht
aus Starnberg

Bonn 2007

Anfertigung mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert (Erscheinungsjahr 2007).

1. Referent: Prof. Dr. E. Leistner
2. Referent: PD Dr. W. Knöß

Tag der Promotion: 27. 04. 2007

für meinen Mann Ralf

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Leistner für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die vielen wertvollen Hinweise, die dauernde Gesprächsbereitschaft und die ständige Unterstützung. Zudem bedanke ich mich herzlich für die Ermöglichung diverser Forschungsaufenthalte in Warschau und Jena, die für mich auch privat eine große Bereicherung waren.

Ein herzliches Dankeschön gilt zudem Privatdozent Herrn Dr. W. Knöß für die Bereitschaft, als Zweitgutachter in der Promotionskommission mitzuwirken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Privatdozentin Frau Dr. U. Steiner für die Ermöglichung der lichtmikroskopischen Untersuchungen und Bildaufnahmen bedanken. Ihr kontinuierliches Interesse und die vielen guten Ideen waren für das Fortschreiten der Arbeit sehr wertvoll. Vielen Dank auch für die Mitwirkung in der Promotionskommission.

Herrn Prof. Dr. G. Bendas danke ich ebenfalls herzlich für die Mitwirkung in der Promotionskommission.

Frau Prof. Dr. M. Furmanowa und ihren Mitarbeitern danke ich für die überaus freundliche Betreuung während der Warschau-Aufenthalte.

Herrn Prof. Dr. W. Boland und seinen Mitarbeitern danke ich für die wiederholte Bereitstellung von deuterierter Mevalonsäure und deuterierter Deoxyxylulose, die intensive Unterstützung der Inkubationsversuche und die Ermöglichung der Forschungsaufenthalte im Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena.

Herrn Prof. Dr. D. Gröger danke ich für die Überlassung der Ergolinalkaloid-Standards, die eine Identifizierung der Substanzen in den Pflanzenextrakten ermöglicht haben.

Dem Gärtnermeister Herrn Dirk Schmitz danke ich für die zuverlässige Mitarbeit rund um die Pflege der Convolvulaceen. Seine aufmerksame und fachkundige Betreuung der Pflanzen hat die Durchführung zahlreicher Versuche ermöglicht.

Frau Marianne Vasmer-Ehse möchte ich für die freundliche Hilfe bei der Pflege der Sterilkulturen danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Dr. Marc Lamshöft für die Hilfe in analytischen Fragen sowie die Bereitstellung der Radio-HPLC.

Herrn Prof. Dr. W. A. König und Frau Dr. S. Basar danke ich für die Aufnahme der GC-MS-Spektren des Ätherischen Öls.

Für die Ermöglichung der HPLC-MS-Nutzung danke ich Frau Prof. Dr. C. Müller.

Hochschuldozent Herr Dr. G. Kirfel danke ich für die Bereitstellung der Elektronenmikroskope.

Bei Frau Prof. Dr. H. Schnabel möchte ich mich für die Bereitstellung der Klimakammer bedanken.

Mein Dank gilt zudem allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere ist hier Frau Dr. Christel Drewke zu nennen. Sie sorgte mit viel Geschick für die Regelung zahlreicher Dinge und Fragen rund um das Institut.

Ganz besonders danke ich meinem Mann Ralf für sehr viel Geduld und Ausdauer sowie die nicht abreißende Hilfsbereitschaft.

Meiner Mutter und ihrem Mann Clemens danke ich herzlich für ihre rege Anteilnahme und ihre ständige Gesprächsbereitschaft.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	X
TABELLENVERZEICHNIS.....	XIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Vom Mutterkorn zur D-Lysergsäure (Die Entdeckung der Ergolinalkaloide).....	1
1.2 Struktur der Ergolinalkaloide.....	3
1.3 Biosynthese der Ergolinalkaloide.....	5
1.4 Medizinische Verwendung der Ergolinalkaloide.....	7
1.4.1 Pharmakologische Eigenschaften.....	7
1.4.2 Beispiele für Indikationen und Präparate.....	9
1.4.3 Rechtliches.....	9
1.5 Vorkommen von Ergolinalkaloiden.....	10
1.5.1 Vorkommen in Pilzen.....	10
1.5.2 Vorkommen in Höheren Pflanzen.....	11
1.6 Horizontaler Gentransfer.....	12
1.7 Zielsetzung.....	13
2 MATERIAL.....	16
2.1 Chemikalien, Lösungen, sonstige Materialien.....	16
2.1.1 Chemikalien.....	16
2.1.2 Fungizide.....	18
2.1.3 Düngemittel.....	19
2.1.4 Puffer und Lösungen für die Mikroskopie.....	19
2.1.5 Reagenzien und Fließmittel.....	20
2.1.6 Sonstige Materialien.....	20
2.2 Kulturmedien.....	21
2.2.1 Medien zur Isolierung und Anzucht von Pilzen.....	22
2.2.2 Medien zur Förderung und Etablierung von pflanzlichen Sterilkulturen.....	23
2.2.2.1 MS-Medium, basale Salzmischung.....	24
2.2.2.2 Medium zur Anzucht von Samenpflanzen und Stecklingen.....	24
2.2.2.3 Medien zur Regeneration von Pflanzen.....	24
2.2.2.4 LS-Medium zur Anlage von Zellkulturen.....	25
2.3 Biologisches Material.....	26

2.3.1 Pflanzen.....	26
2.3.2 Pilze.....	26
2.4 Laborbedingungen und Einrichtungen.....	28
2.4.1 Reinstwasseraufbereitung.....	28
2.4.2 Sterilisationsmethoden.....	28
2.4.3 Sterile Bedingungen.....	28
2.4.4 Raum zur Kultivierung pflanzlicher Sterilkulturen.....	28
2.4.5 Klimakammer.....	29
2.4.6 Sonstige Geräte.....	29
3 METHODEN.....	31
3.1 Ökologische und physiologische Methoden.....	31
3.1.1 Fungizidversuche.....	31
3.1.2 Anzucht von pilz- und alkaloidfreien Pflanzen.....	31
3.1.3 Versuche zur Pilzübertragung und Pilzetablierung.....	32
3.1.3.1 „Attachment-Versuche“.....	32
3.1.3.2 Pfropfversuche.....	32
3.1.3.3 Inokulationsversuche.....	33
3.1.4 Versuche zum Einfluss von pflanzlichen Wachstumsfaktoren auf Alkaloid- bildung und Pilzentwicklung.....	33
3.1.4.1 Veränderung des Lichtangebots.....	34
3.1.4.2 Veränderung des Nährstoffangebots.....	34
3.1.5 Anzucht von Pflanzen in einer Klimakammer.....	35
3.1.6 Anzucht von sterilen Stecklingen und Sämlingen.....	35
3.2 Arbeiten mit pflanzlichen Zellkulturen.....	36
3.2.1 Anlage von pflanzlichen Zellkulturen.....	36
3.2.2 Regeneration von Pflanzen aus Kalluskulturen.....	37
3.3 Arbeiten mit Mikroorganismen.....	37
3.3.1 Isolierung und Anzucht von Endophyten.....	38
3.3.2 Isolierung und Anzucht von Iasa-F13 und Tcor-F01.....	38
3.3.3 Konservierung von Pilzen.....	39
3.4 Biochemische und analytische Methoden.....	39
3.4.1 Extraktion von Ergolinalkaloiden aus Pflanzenmaterial.....	39
3.4.2 Extraktion von Ergolinalkaloiden aus Iasa-F13 und Tcor-F01.....	41
3.4.3 Analyse von Ergolinalkaloiden mittels DC.....	41
3.4.4 Analyse von Ergolinalkaloiden mittels UV-VIS-Spektroskopie.....	42
3.4.5 Analyse von Ergolinalkaloiden mittels HPLC-MS.....	43

3.4.6 Extraktion von Ergosterol.....	43
3.4.7 Analyse von Ergosterol mittels HPLC.....	44
3.4.8 Gewinnung von Ätherischem Öl.....	44
3.4.9 Analyse von Ätherischem Öl mittels GC-MS.....	45
3.4.10 Inkubationsversuche mit deuterierten Präkursoren der Terpenbiosynthese.....	45
3.4.10.1 Inkubation zur Überprüfung des Deuteriumeinbaus in Ergolinalkaloide.....	45
3.4.10.2 Inkubation zur Überprüfung des Deuteriumeinbaus in Duftstoffe.....	46
3.4.11 Isolierung von Ergolinalkaloiden mittels präparativer DC zur Überprüfung..... des Deuteriumeinbaus.....	46
3.4.12 Überprüfung des Deuteriumeinbaus in Ergolinalkaloide mittels GC-MS.....	47
3.4.13 Überprüfung des Deuteriumeinbaus in Duftstoffe mittels GC-MS.....	48
3.4.14 Inkubationsversuche mit ¹⁴ C-Tryptophan.....	48
3.4.14.1 Inkubation von <i>Ipomoea asarifolia</i> mit ¹⁴ C-Tryptophan.....	48
3.4.14.2 Ultraschallbehandlung von Blättern.....	49
3.4.14.3 Inkubation von Iasa-F13 mit ¹⁴ C-Tryptophan.....	49
3.4.15 Überprüfung des Einbaus von ¹⁴ C-Tryptophan in Ergolinalkaloide mittels..... Radio-HPLC und MS.....	49
3.5 Mikroskopische Untersuchungen.....	50
3.5.1 Untersuchungen mittels Lichtmikroskop.....	50
3.5.1.1 Bestimmung des quantitativen Vorkommens von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01..... mittels Lichtmikroskop.....	51
3.5.2 Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskop (REM).....	52
3.5.3 Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM).....	52
4 ERGEBNISSE.....	54
4.1 Wegweisende Ergebnisse bisheriger Untersuchungen.....	54
4.1.1 Fungizidbehandlung von <i>Ipomoea asarifolia</i>	54
4.1.2 Untersuchung des Ätherischen Öls von <i>Ipomoea asarifolia</i>	56
4.2 Reproduzierbarkeit der bisherigen Untersuchungen.....	57
4.2.1 Wiederholung der Fungizidbehandlung von <i>Ipomoea asarifolia</i>	57
4.2.2 Anzucht von Stecklingen und Sämlingen pilz-/alkaloidfreier Pflanzen zur..... Überprüfung der Korrelation von Pilz- und Alkaloidvorkommen bei..... <i>Ipomoea asarifolia</i>	59
4.2.3 Untersuchung von <i>Turbina corymbosa</i> zur experimentellen Bestätigung der... bisherigen Befunde.....	61
4.2.3.1 Vergleich der Alkaloidspektren von <i>Ipomoea asarifolia</i> und <i>Turbina corymbosa</i> mittels DC und HPLC-MS.....	61

4.2.3.2 Lichtmikroskopischer Vergleich des Pilzvorkommens bei <i>Ipomoea asarifolia</i> und <i>Turbina corymbosa</i>	64
4.2.3.3 Fungizidbehandlung von <i>Turbina corymbosa</i>	65
4.2.3.4 Wiederholung der Fungizidbehandlung von <i>Turbina corymbosa</i>	67
4.2.3.5 Untersuchung des Ätherischen Öls von <i>Turbina corymbosa</i>	69
4.2.4 Überprüfung der Spezifität der epibiontischen Pilze.....	71
4.2.4.1 <i>Turbina corymbosa</i> aus dem Botanischen Garten in Mainz.....	71
4.2.4.2 Anzucht von Pflanzen aus eigener Samenernte in einer Klimakammer.....	72
4.2.4.3 Anzucht von Pflanzen aus käuflich erworbenen Samen in einer Klimakammer..	73
4.3 Untersuchungen zur Pilzherkunft und Pilzübertragung.....	73
4.3.1 Sterile Anzucht von Samenpflanzen.....	73
4.3.2 Untersuchungen zur Pilzverbreitung über die vegetativen Pflanzenteile.....	77
4.3.2.1 „Attachment-Versuche“.....	77
4.3.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	79
4.3.2.3 Pfropfversuche.....	83
4.3.2.4 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen.....	85
4.4 Isolierung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 und Versuch der Pilzanzucht.....	87
4.5 Zusammenfassung molekularbiologischer Ergebnisse zweier weiterer..... Doktorarbeiten zum Verständnis der vorliegenden Arbeit.....	90
4.6 Inokulationsversuche.....	91
4.7 Versuche zur Bindung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 an den pflanzlichen..... Stoffwechsel.....	94
4.7.1 Untersuchungen zum Einfluss von pflanzlichen Wachstumsfaktoren.....	95
4.7.1.1 Veränderung des Lichtangebots.....	95
4.7.1.2 Veränderung des Nährstoffangebots.....	96
4.7.1.3 Ergebnisse zur Veränderung von Licht- und Nährstoffangebot.....	96
4.7.2 Untersuchungen von Pilz- und Alkaloidvorkommen in pflanzlichen..... Zellkulturen.....	103
4.7.3 Veränderung des Lichtspektrums bei der Anzucht steriler Pflanzen.....	104
4.7.4 Gesamtalkaloidgehalt und Ergosterolverteilung in unterschiedlichen..... Blattstadien.....	108
4.8 Versuche zur Rolle der epibiontischen Pilze bei der Alkaloidbiosynthese.....	117
4.8.1 Untersuchungen zur Alkaloidspeicherung.....	117
4.8.2 Einbaustudien mit Deuterium-markierten möglichen Präkursoren der..... Ergolinalkaloid Biosynthese.....	122
4.8.3 Einbaustudien mit ¹⁴ C-Tryptophan.....	126

5 DISKUSSION.....	129
5.1 Symbiosen von Gräsern und Ergolinalkaloid-bildenden Pilzen.....	129
5.1.1 Endophytische Pilze.....	129
5.1.2 Epibiontische Pilze.....	131
5.2 Entdeckung epibiontischer Pilze auf Ergolinalkaloid-führenden.....	
Convolvulaceen.....	133
5.3 Beurteilung der Fungizidversuche.....	135
5.3.1 Wirkung der Fungizide.....	135
5.3.2 Beeinflussung der Ätherisch Öl-Produktion.....	138
5.4 Überlegungen zu Lebensweise und Verbreitung der epibiontischen Pilze.....	
Iasa-F13 bzw. Tcor-F01.....	140
5.4.1 Führen die Pilze ein Dasein zwischen Epibiont und Endophyt bzw. zwischen..	
Mutualist und Antagonist ?.....	140
5.4.2 Erfolgt die Verbreitung in den Samen ?.....	141
5.5 Bedeutung der Pfropfversuche.....	142
5.6 Beobachtungen zum Vorkommen weiterer Pilzisolat.....	143
5.7 Beurteilung der spezifischen Rolle von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 bei der.....	
Alkaloidbildung.....	145
5.7.1 Einfluss des pflanzlichen Stoffwechsels auf die Alkaloidbildung.....	145
5.7.2 Erklärungsansätze für den sinkenden Pilz- und Alkaloidgehalt bei.....	
zunehmendem Blattalter.....	147
5.7.3 Pilz- und Alkaloidvorkommen in pflanzlichen Zellkulturen und regenerierten....	
Pflanzen.....	149
5.7.4 Hohe Transporteffizienz oder Induktion der Alkaloidbildung durch die.....	
epibiontischen Pilze ?.....	150
5.7.5 Überlegungen zu den Einbaustudien mit Präkursoren der.....	
Alkaloidbiosynthese.....	152
5.7.5.1 Versuche mit deuterierter Mevalonsäure (d ₂ -MVA) und deuterierter.....	
Deoxyxylulose (d ₂ -DOX).....	152
5.7.5.2 Versuche mit ¹⁴ C-Tryptophan.....	155
5.8 Überlegungen zum Vorkommen von Ergolinalkaloiden in weiteren.....	
Convolvulaceen.....	156
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	160
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	163

8 ANHANG.....	181
8.1 Informationen zu den Fungiziden Benomyl [®] , Folicur [®] , Pronto Plus [®] und Switch [®] ...	
8.2 Informationen zu dem Dünger Plantosan [®]	
8.3 Massenspektren der Ergolinalkaloide.....	
8.4 Massenspektren der Terpenoide.....	181

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Bq	Becquerel
bzw.	beziehungsweise
c	centi (10^{-2})
ca.	circa
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, NL
Ci	Curie
cps	counts per second
°C	Grad Celsius
d.h.	das heißt
DAD	Diodenarray Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Deoxyxylulose
dpm	disintegrations per minute
Ø	durchschnittlich
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'tetraacetat
et al.	et alii, und andere
Fa.	Firma
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatographie)
i.d.R.	in der Regel
ITS	Internal-Transcribed-Spacer

KBq	Kilobecquerel
l	Liter
λ (Lambda)	Wellenlänge
m	milli (10^{-3}), Masse
M	Molarität
m/z	Masse pro Ladung
max.	maximal
MBq	Megabecquerel
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
MVA	Mevalonsäure
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
N	Normalität
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA
o.g.	oben genannt
pers.	persönlich
pH	potentia Hydrogeni; negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
%	Prozent
rDNA	ribosomale DNA
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
®	eingetragenes Warenzeichen
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit
s.	siehe
s.o.	siehe oben

sog.	sogenannt
sp.	species; Art
SSCP	Single strand conformation polymorphism
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht
V	Volumen
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbares Licht
WGA	Wheat Germ Agglutinine
z.B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1.1 Vegetationsformen von Mutterkorn
- Abbildung 1.2 Tetracyclisches Ergolinsystem
- Abbildung 1.3 Grundstruktur der einfachen D-Lysergsäureamide
- Abbildung 1.4 Grundstruktur von Ergopeptinen
- Abbildung 1.5 Grundstrukturen von Clavin-Alkaloiden
- Abbildung 1.6 Biosynthese der Ergolinalkaloide
- Abbildung 1.7 *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*
- Abbildung 4.1 DC-Chromatogramm der Alkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia* nach Fungizidbehandlung
- Abbildung 4.2 Pilzmycel und Drüsenschuppen auf der Blattoberseite von *Ipomoea asarifolia* (Lichtmikroskopische Aufnahmen)
- Abbildung 4.3 Gaschromatographie des Ätherischen Öls von *Ipomoea asarifolia*
- Abbildung 4.4 Pilzmycel auf der Blattoberseite von *Ipomoea asarifolia* (Lichtmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 4.5 DC-Chromatogramme der Alkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia*, *Turbina corymbosa* und der Ergolinalkaloidstandards
- Abbildung 4.6 HPLC-Chromatogramme der Alkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*
- Abbildung 4.7 Pilzmycel auf der Blattoberseite von *Turbina corymbosa* (Lichtmikroskopische Aufnahmen)
- Abbildung 4.8 DC-Chromatogramm der Alkaloidfraktionen von *Turbina corymbosa* nach der 1. Fungizidbehandlung
- Abbildung 4.9 Pilzmycel auf der Blattoberseite von *Turbina corymbosa* nach Fungizidbehandlung (Lichtmikroskopische Aufnahmen)
- Abbildung 4.10 DC-Chromatogramm der Alkaloidfraktionen von *Turbina corymbosa* nach der 2. Fungizidbehandlung
- Abbildung 4.11 Gaschromatographie des Ätherischen Öls von *Turbina corymbosa*
- Abbildung 4.12 Pilzmycel auf der Blattoberseite von *Turbina corymbosa* aus dem Botanischen Garten in Mainz (Lichtmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 4.13 Sterile Anzucht von Samenpflanzen in MS/2-Medium

-
- Abbildung 4.14 Pilzmycel von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 auf den Blattoberseiten steril angezogener Samenpflanzen (Lichtmikroskopische Aufnahmen)
- Abbildung 4.15 „Attachment“-Versuche
- Abbildung 4.16 REM-Aufnahmen vom Mycel der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01
- Abbildung 4.17 REM-Aufnahmen vom Mycel der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01
- Abbildung 4.18 Appressorienbildung
- Abbildung 4.19 REM-Aufnahmen der Blattoberfläche von *Ipomoea asarifolia* nach Ultraschallbehandlung
- Abbildung 4.20 Gärtnerisches Pfropfen
- Abbildung 4.21 Pfropfversuche
- Abbildung 4.22 TEM-Aufnahmen der Blattzellen von *Ipomoea asarifolia* mit Pilzmycel
- Abbildung 4.23 Blattknospen mit Pilzmycel
- Abbildung 4.24 Konidien von *Penicillium* auf der Blattoberfläche von *Ipomoea asarifolia* (Lichtmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 4.25 Versuche zur Veränderung des Licht- und Nährstoffangebots (Photometrische Messung der Alkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*)
- Abbildung 4.26 Versuche zur Veränderung des Licht- und Nährstoffangebots (DC-Chromatogramme der Alkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*)
- Abbildung 4.27 Versuche zur Veränderung des Licht- und Nährstoffangebots (HPLC-MS Messung der Alkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia*)
- Abbildung 4.28 Versuche zur Veränderung des Licht- und Nährstoffangebots (HPLC-MS Messung der Alkaloidfraktionen von *Turbina corymbosa*)
- Abbildung 4.29 Pilzzellen in einer sterilen Zellkultur von *Ipomoea asarifolia* (Lichtmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 4.30 Regeneration von *Ipomoea asarifolia* aus sterilen Blatt- und Stängelstücken
- Abbildung 4.31 Regeneration von *Ipomoea asarifolia* (Photometrische Messung der Alkaloidfraktionen)
- Abbildung 4.32 Regeneration von *Ipomoea asarifolia* (HPLC-MS Messung der Alkaloidfraktionen)

-
- Abbildung 4.33 Untersuchung verschiedener Blattstadien von *Ipomoea asarifolia* (Photometrische Messung der Alkaloidfraktionen)
- Abbildung 4.34 Untersuchung verschiedener Blattstadien von *Turbina corymbosa* (Photometrische Messung der Alkaloidfraktionen)
- Abbildung 4.35 Untersuchung verschiedener Blattstadien von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (DC-Chromatogramme der Alkaloidfraktionen)
- Abbildung 4.36 Untersuchung verschiedener Blattstadien von *Ipomoea asarifolia* (HPLC-Chromatogramme der Ergosterolextrakte)
- Abbildung 4.37 Untersuchung verschiedener Blattstadien von *Turbina corymbosa* (HPLC-Chromatogramme der Ergosterolextrakte)
- Abbildung 4.38 Aufnahme der Blattstadien von *Ipomoea asarifolia*
- Abbildung 4.39 Untersuchung verschiedener Blattstadien von *Ipomoea asarifolia* (HPLC-MS Messung der Alkaloidfraktionen)
- Abbildung 4.40 Untersuchung verschiedener Blattstadien von *Turbina corymbosa* (HPLC-MS Messung der Alkaloidfraktionen)
- Abbildung 4.41 Ultraschallversuche mit *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (DC-Chromatogramme der Alkaloidfraktionen)
- Abbildung 4.42 Ultraschallversuche mit *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (HPLC-MS Messung der Alkaloidfraktionen)
- Abbildung 4.43 Kolonienbildung von Iasa-F13 und Tcor-F01 an den lipophilen Drüsenschuppen (Lichtmikroskopische Aufnahmen)
- Abbildung 4.44 Einbau von Deuterium in Chanoclavin-I
- Abbildung 4.45 Versuchsaufbau der „Closed Loop Stripping“-Analyse zur Anreicherung von flüchtigen Blattinhaltsstoffen
- Abbildung 4.46 GC-MS Messung von Caryophyllen nach Inkubation der Pflanzen in deuterierter MVA bzw. DOX
- Abbildung 5.1 Lebenskreislauf von *Epichloë festuca*
- Abbildung 5.2 Stammbaum epibiontischer und endophytischer *Balansia*-Arten
- Abbildung 5.3 Biosynthese von Ergosterol
- Abbildung 5.4 Pilzmycel und Drüsenschuppen auf der Blattoberseite von *Ipomoea asarifolia* (Lichtmikroskopische Aufnahmen)
- Abbildung 5.5 Mevalonatweg und Deoxyxyluloseweg der Isopentenylpyrophosphat- bzw. Dimethylallylpyrophosphat-Biosynthese

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1	Ergolinalkaloide in der modernen Medizin
Tabelle 2.1	Wichtige Chemikalien und ihre Bezugsquellen
Tabelle 2.2	In dieser Arbeit verwendete Fungizide und ihre Hersteller
Tabelle 2.3	Puffer und Lösungen für die Mikroskopie
Tabelle 2.4	Reagenzien und Fließmittel
Tabelle 2.5	Wichtige Materialien und ihre Bezugsquellen
Tabelle 2.6	Medien für Pilze
Tabelle 2.7	MS-Medium
Tabelle 2.8	Medien zur Regeneration von Pflanzen
Tabelle 2.9	LS-Medium
Tabelle 2.10	Untersuchtes Pflanzenmaterial und seine Herkunft
Tabelle 2.11	In dieser Arbeit untersuchte Pilzisolat
Tabelle 2.12	In dieser Arbeit untersuchte Pilze aus externen Quellen
Tabelle 2.13	Geräte
Tabelle 3.1	Lichtintensität (Lux) im Gewächshaus unter verschiedenen Bedingungen
Tabelle 3.2	Düngung mit Plantosan®
Tabelle 4.1	Quantitative Untersuchung der Ergolinalkaloide von <i>Ipomoea asarifolia</i> nach Fungizidbehandlung
Tabelle 4.2	Fungizide und ihre Wirkung
Tabelle 4.3	Anzucht von Stecklingen und Sämlingen
Tabelle 4.4	Molekulargewichte von Ergolinalkaloiden
Tabelle 4.5	Quantitative Untersuchung der Ergolinalkaloide von <i>Turbina corymbosa</i> nach dem 1. Fungizidversuch
Tabelle 4.6	Quantitative Untersuchung der Ergolinalkaloide von <i>Turbina corymbosa</i> nach dem 2. Fungizidversuch
Tabelle 4.7	Ergolinalkaloidvorkommen in steril angezogenen Samenpflanzen

Tabelle 4.8	Pilzorgane, die der Vermehrung, Ausbreitung und Überdauerung dienen
Tabelle 4.9	Auswahlkriterien für Nährmedien zur Anzucht von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01
Tabelle 4.10	Vergleich von Alkaloidvorkommen, Pilzbesiedelung und Pflanzenzustand der Versuchsgruppen von <i>Ipomoea asarifolia</i> und <i>Turbina corymbosa</i> nach Veränderung des Licht- bzw. Nährstoffangebots
Tabelle 4.11	Peakhöhen und Peakflächen von Ergosterol in den Ergosterolextrakten von <i>I. asarifolia</i> und <i>T. corymbosa</i>
Tabelle 4.12	Ergolinalkaloid- und Ergosterolgehalt der unterschiedlichen Blattstadien von <i>I. asarifolia</i> und <i>T. corymbosa</i>
Tabelle 4.13	Quantitative Untersuchung der Ergolinalkaloide (Pflanzen- bzw. Pilzextrakte) von <i>I. asarifolia</i> und <i>T. corymbosa</i>
Tabelle 4.14	Einbau von ¹⁴ C-Tryptophan in Ergolinalkaloide bzw. andere Verbindungen nach Inkubation verschiedener Versuchsgruppen von <i>Ipomoea asarifolia</i> bzw. von Pilzmycel in wässriger ¹⁴ C-Tryptophan-Lösung

1 EINLEITUNG

1.1 Vom Mutterkorn zur D-Lysergsäure (Die Entdeckung der Ergolinalkaloide)

Mutterkorn (*Secale cornutum*) ist das Sklerotium des Pilzes *Claviceps purpurea* (L.) Tulasne, der auf den Ähren von Roggen, Weizen, seltener auf Gerste oder Hafer und anderen Gräsern wächst. Als Sklerotium wird die Dauerform des Mutterkornpilzes bezeichnet, ein dichtes dunkel gefärbtes Hyphengeflecht, das sich statt einer normalen Frucht in der Getreideähre entwickelt (siehe Abb. 1.1).

Wie die reifen Getreidekörner fallen die Sklerotien auf den Boden, wo sie eine Winterruhe durchmachen. Erst im Frühjahr wird sichtbar, dass es sich bei ihnen keinesfalls um pflanzliche Gebilde, sondern um Pilze handelt. Aus dem Mutterkorn keimen dann zahlreiche Fruchtkörper (Perithezien) aus, die schlauchförmige Sporangien (Asci) enthalten. Der Wind transportiert die aus ihnen freigesetzten Schlauchsporen (Ascosporen) auf die Narben von Grasblüten. Dort dringen die Keimhyphen in die Fruchtknoten ein. Das sich entwickelnde Mycel löst das Gewebe auf und verhindert so die Samenentwicklung.

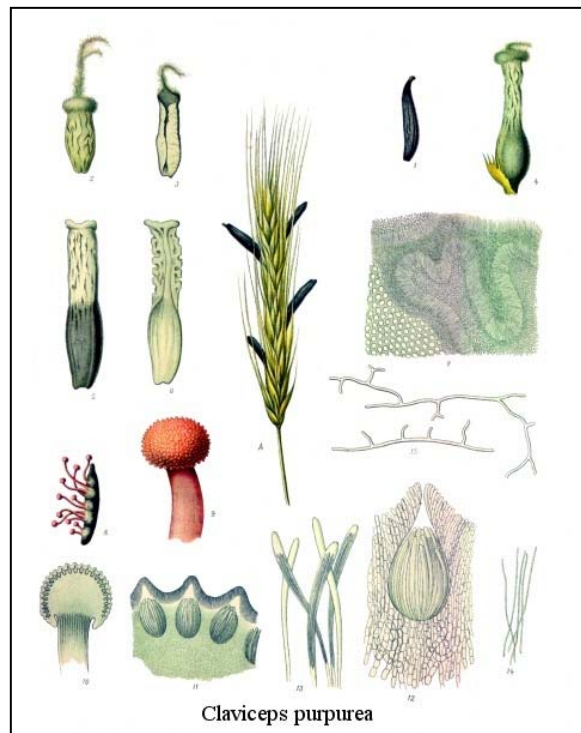


Abbildung 1.1 Vegetationsformen von Mutterkorn; aus Köhler's *Medizinal-Pflanzen* 1887.

Der Mutterkornpilz produziert toxische Alkaloide (Mutterkornalkaloide, syn. Ergotalkaloide, syn. Ergolinalkaloide), die zu Symptomen wie Darmkrämpfen, Absterben von Extremitäten aufgrund von Durchblutungsstörungen und Halluzinationen führen können. Erstmals trat das Mutterkorn im frühen Mittelalter als Ursache von epidemieartig auftretenden Massenvergiftungen (Ergotismus, syn. Mutterkornbrand, syn. Kribbelkrankheit, syn. Antoniusfeuer) in Erscheinung. Als Helfer gegen die Seuche galt vor allem der heilige Antonius. Er ist der Namenspatron des Antoniter-Ordens, welcher sich mit der Pflege der am „Antoniusfeuer“ Erkrankten befasste. Mit der Verbesserung des Ackerbaus und nachdem man 1679 erkannte, dass mutterkornhaltiges Brot die Ursache des Ergotismus war, nahm die Häufigkeit der Mutterkornepidemien ab (Barger 1931). Der Pilz *Claviceps purpurea* wurde allerdings erst 1853 von dem französischen Mykologen Louis René Tulasne als Mutterkornpilz identifiziert.

Die erste Erwähnung einer medizinischen Anwendung von Mutterkorn als Wehenmittel (daher die Bezeichnung Mutterkorn) findet sich im Kräuterbuch des Frankfurter Stadtarztes Adam Lonitzer (Lonicerus), aus dem Jahre 1582 (Barger 1931). Da die Mutterkornalkaloide Kontraktionen der Gebärmutter verursachen, wurde ein Pulver aus Mutterkorn zur Wehensteigerung gegeben. Dieses schwer zu dosierende Pulver wurde bezeichnenderweise nicht nur „pulvis ad partum“ (Geburtspulver), sondern auch „pulvis ad mortem“ (Todespulver) genannt (Buttler 2004). Nach der Aufnahme des Mutterkorns in verschiedene Arzneibücher in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts setzten die chemischen Arbeiten zur Isolierung der Wirkstoffe dieser Droge ein (Hofmann 2001).

Der Franzose Charles Tanret extrahierte 1875 aus Mutterkorn eine - allerdings ziemlich verunreinigte - Substanz, die er Ergotinin nannte. Ebenso wie das Ergotoxin, welches 1907 entdeckt wurde, ist es eine Mischsubstanz. Erst Arthur Stoll isolierte 1918 das Ergotamin, das erste reine Ergotalkaloid. Mit dieser Entdeckung konnte die D-Lysergsäure als den Ergolinalkaloiden zugrundeliegende Basisstruktur identifiziert werden (vgl. 1.2). Die übrigen Alkaloide des Mutterkorns wurden in den folgenden 25 Jahren entdeckt. Besondere Verdienste um die Erforschung der Mutterkornalkaloide hat sich der schweizer Chemiker Albert Hofmann erworben, dessen Forschungen 1943 auch zur zufälligen Entdeckung des Halluzinogens LSD (Lysergsäurediethylamid) führten (Albert Hofmann 2000).

1.2 Struktur der Ergolinalkaloide

Ergolinalkaloide sind 3,4-substituierte Indolderivate deren Grundgerüst das tetracyclische Ergolin-Ringsystem ist (siehe Abb. 1.2).

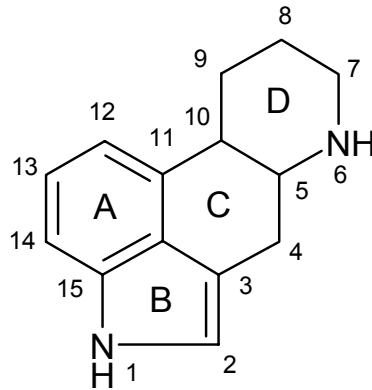


Abbildung 1.2 Tetracyclisches Ergolinsystem

Sie werden entsprechend der Ausgestaltung des Substituenten am C-8 in zwei Substanzklassen eingeteilt, die D-Lysergsäurederivate und die Clavin-Alkaloide.

Die D-Lysergsäurederivate besitzen am C-8 eine Carboxylgruppe, die mittels Amidbindung mit Ammoniak, einem aliphatischen Amin (einfache Lysergsäureamide, siehe Abb. 1.3) oder einem Tripeptidrest (Peptidalkaloide) verbunden ist.

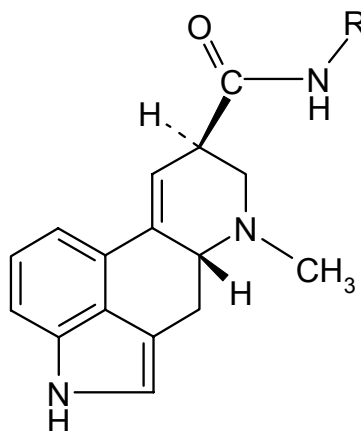


Abbildung 1.3 Grundstruktur der einfachen D-Lysergsäureamide

Der Tripeptidrest der Peptidalkaloide ist sekundär zu einem Lactamring-System aus drei Aminosäuren verändert (Hofmann 1964) (siehe Abb. 1.4). Die ersten zwei Aminosäuren sind variabel, die dritte Aminosäure ist fast immer Prolin. Eine Ausnahme bildet Ergobalansin, hier ist die Aminosäure Prolin durch Alanin ersetzt.

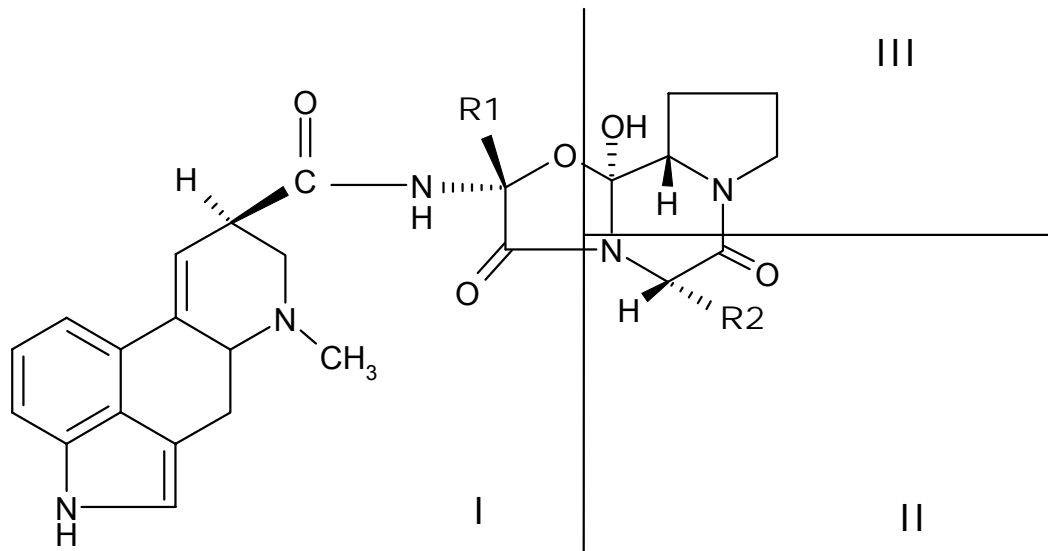


Abbildung 1.4 Grundstruktur von Ergopeptinen; die variablen Aminosäuren sind mit I und II gekennzeichnet; die konstante Aminosäure (III) ist fast immer Prolin (Ausnahme: Ergobalansin).

Bei den einfacheren Clavin-Alkaloiden wird die Carboxylgruppe durch eine Methyl- oder Hydroxymethylgruppe ersetzt (siehe Abb. 1.5 b). Die vom Ergolin abstammenden Alkaloide tragen meistens eine Doppelbindung in Ring D des tetracyclischen Ringsystems. Diese befindet sich entweder in Position 9,10 oder in Position 8,9 (Ergolene). Das N-Atom in Position 6 ist immer methyliert. Ebenso kommen sogenannte Secoergoline vor, bei denen der D-Ring offen ist (siehe Abb. 1.5 a).

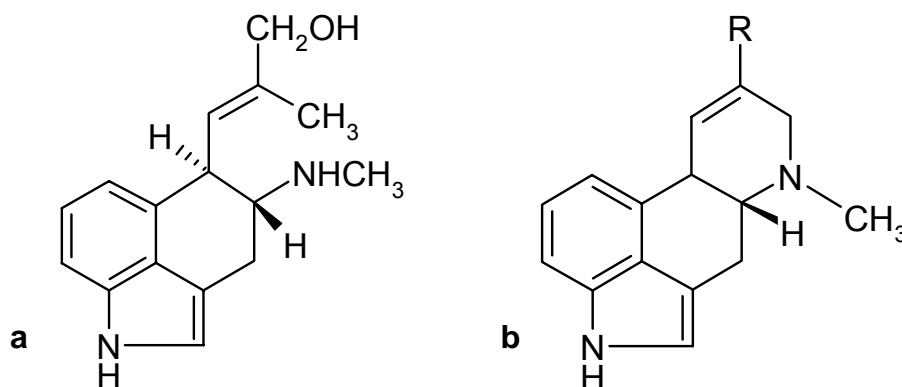


Abbildung 1.5 a: Strukturformel von Chanoclavin, einem Secoergolin; b: Strukturformel von Agroclavin als Beispiel für Clavin-Alkaloide, R = CH₃ bzw. CH₂OH

1.3 Biosynthese der Ergolinalkaloide

Die wesentlichen Schritte der Ergolin-Ringbildung (siehe Abb. 1.6) konnten mit Hilfe von in „vivo – Studien“ an Ergolinalkaloid-bildenden Pilzen, aus der Familie der Clavicipitaceen, weitgehend belegt werden (Floss 1976; Floss und Anderson 1980; Gröger und Floss 1998; Keller 1999).

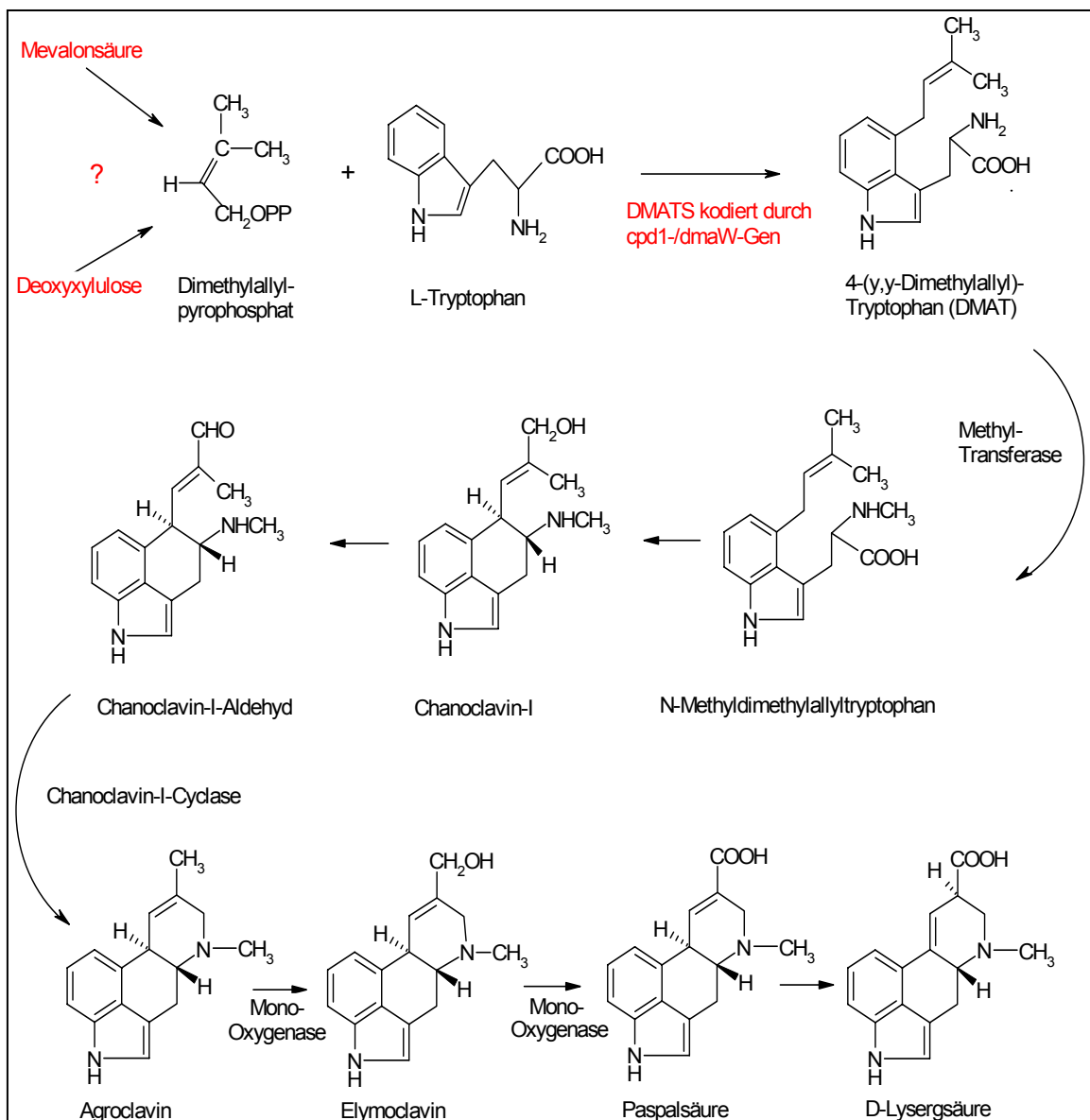


Abbildung 1.6 Biosynthese der Ergolinalkaloide bis zur D-Lysergsäure nach Floss und Gröger (modifiziert von Lohmeyer und Tudzynski 1997); Das Enzym Dimethylallyltryptophan-Synthase (DMATS) wird durch das Gen *cpd1/dmaW* kodiert. Die möglichen Präkursoren von Dimethylallylpyrophosphat sind Mevalonsäure oder Deoxyxylose (eigene Anmerkung).

Im Gegensatz zur Physiologie und Biochemie der Ergolinalkaloid-Biosynthese sind die beteiligten Enzyme nur wenig erforscht, da die meisten dieser Enzyme in zellfreien Extrakten von *Claviceps* sp. instabil sind (Tudzynski et al. 2001).

Eine Ausnahme bildet die Dimethylallyltryptophan (DMAT) – Synthase, welche homogen aufgereinigt werden konnte. Die DMAT-Synthase katalysiert die Prenylierung von L-Tryptophan mit Dimethylallylpyrophosphat (Heinstein et al. 1971). Dieser Schritt ist entscheidend für die Alkaloidbiosynthese in Ergolinalkaloid-produzierenden Pilzen, hier entsteht das Carbonskelett des Ergolin-Ringsystems. Desweiteren wird die Expression des Enzyms durch Tryptophan induziert (Krupinski et al. 1976).

Die N-Methylierung von Dimethylallyltryptophan wird durch eine Methyltransferase katalysiert (Otsuka et al. 1979). Anschließend wird Chanoclavin-I gebildet. Diese Reaktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Gröger und Floss 1998).

Darauf folgt eine Decarboxylierung und die Schließung von Ring C mit Hilfe der Chanoclavin-I-Cyclase (Erge et al. 1973; Gröger und Sajdl 1972). Der genaue Mechanismus der Chanoclavin-I-Cyclisierung ist nicht bekannt.

Ein weiteres bekanntes Enzym ist die Agroclavin-17-Monooxygenase (Kim et al. 1981), welches spezifisch Agroclavin in Elymoclavin umwandelt. Elymoclavin wird dann von der Elymoclavin-17-Monooxygenase (Kim et al. 1983; Maier et al. 1988) in Paspalsäure umgeformt. Beide Enzyme sind abhängig von NADPH und molekularem Sauerstoff und daher vermutlich Cytochrom P450 – Monooxygenasen.

Paspalsäure isomerisiert letztlich zu Lysergsäure durch Verschiebung der Doppelbindung in Ring D von Position 8,9 auf Position 9,10.

Der Syntheseweg der Ergolinalkaloide endet bei den verschiedenen Pilzstämmen an unterschiedlichen Stellen. So zum Beispiel beim Chanoclavin-I oder beim Elymoclavin. Dies kann das Ergebnis von natürlichen Mutationen der Gene sein oder deren komplette Auslöschung bedeuten (Tudzynski et al. 2001).

Andere Stämme bilden D-Lysergsäure als unmittelbaren Vorläufer von einfachen D-Lysergsäureamiden bzw. Ergopeptinen, in denen D-Lysergsäure an ein Lactamring-System aus drei Aminosäuren gebunden ist (Hofmann 1964) (siehe Abb. 1.4). Die ersten zwei Aminosäuren sind variabel, die dritte Aminosäure ist mit Ausnahme von Ergobalansin immer Prolin. Die Bindung der drei Aminosäuren an D-Lysergsäure wird durch das Enzym D-Lysergylpeptidsynthetase (LPS) katalysiert. Das Enzym konnte von Riederer et al. (1996) aufgereinigt und als typische nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS) identifiziert werden (Marahiel et al. 1997).

Ungewöhnlicher Weise besteht das Enzym aus zwei großen Untereinheiten (LPS1 und LPS2), während alle bisher beschriebenen Pilz-NRPSs aus einer Polypeptidkette bestehen. Die größere Untereinheit (LPS1) aktiviert die Aminosäuren, die kleinere Untereinheit (LPS2) ist für die Aktivierung der Lysergsäure verantwortlich.

Abschließend löst sich das D-Lysergyltripeptid von LPS1 und es erfolgt die Cyclisierung zum Lactam (Riederer et al. 1996; Zocher und Keller 1997).

Im Gegensatz zu den D-Lysergyltripeptiden ist der Mechanismus zur Bildung der einfachen D-Lysergsäureamide wie Ergonovin unbekannt.

Vor einiger Zeit wurde die bedeutende Entdeckung gemacht, dass die Biosynthesegene bei *Claviceps purpurea* geclustert vorliegen (Tudzynski et al. 1999). Durch neueste Studien konnte die Lage des Genclusters im Pilz-Genom mittels der Technik des Chromosomen-walking bestimmt werden (Haarmann et al. 2004). Desweiteren wurden zusätzliche Gene der Ergolinbiosynthese identifiziert. Die vermutete Clustersequenz beinhaltet vier verschiedene nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS)-Gene und zahlreiche vermutliche Oxidase-Gene. Northern-Blot-Analysen zeigten, dass die meisten der Gene co-reguliert werden.

1.4 Medizinische Verwendung der Ergolinalkaloide

1.4.1 Pharmakologische Eigenschaften

D-Lysergsäurederivate besitzen ein weites Spektrum an Aktivitäten. Tudzynski et al. (2001) vermuten, dass die Wirkung der Ergoline mit einer gewissen Strukturanalogie zu den Neurotransmittern erklärt werden kann. Abhängig von den Substituenten an der Carboxylgruppe des C-8 vom Ergolin-Ringsystem, treten eventuell unterschiedliche Affinitäten zu den Rezeptoren der Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin (Dihydroxyphenylethylamin) und Serotonin auf.

Je nach ihrer Struktur, dem betroffenen Organ und dessen Funktionszustand können D-Lysergsäurederivate partielle agonistische oder antagonistische Wirkung zeigen.

Ergopeptine üben entsprechend ihrer Affinität zu α -adrenergen Rezeptoren vasokonstriktorische (gefäßverengende) und α -sympathicolytische (rezeptorblockierende) Effekte aus (Berde und Stürmer 1978; Hofmann 1978; Stadler und Giger 1984). D.h. sie unterstützen bzw. unterdrücken die Funktionen von Noradrenalin.

Im Gegensatz dazu haben Clavine und einfache D-Lysergsäureamide, wie das Ergonovin, eine wesentlich geringere α -adrenerge Aktivität. Entsprechend ihrer höheren Affinität zu serotoninergen Rezeptoren haben sie starke serotinerge Wirksamkeit. Ergonovin führt zur Kontraktion der Muskulatur des graviden Uterus.

Durch Modifikationen der natürlichen Ergopeptine lassen sich die Effekte verstärken oder abschwächen:

- Im Falle von Ergotamin hat das hydrierte Derivat einen wesentlich stärkeren α -sympathicolytischen und gleichzeitig einen verringerten vasokonstriktorischen Effekt (Hofmann 1964). Dihydroergotamin findet Anwendung bei Migräne.
- Dihydroergotoxin wird aufgrund des verstärkten α -sympathicolytischen Effektes bei Bluthochdruck und cerebralen Durchblutungsstörungen älterer Menschen angewendet (Wadworth und Crisp 1992).
- Die Bromierung von Ergocriptin in Position C-2 des Ergolinringes hat eine stark erhöhte dopamin-agonistische Wirkung zur Folge. Diese Entdeckung führte zum Einsatz von Bromocriptin bei der Behandlung des Parkinson-Syndroms (Keller und Da Prada 1979).
- Die Modifizierung des Ergolin-Ringes durch Anfügen einer Alkylgruppe in den Positionen C-13 oder C-14 vermindert die dopaminerge Aktivität von Ergolinalkaloiden. Sie führt statt dessen zu erhöhter serotinerger Aktivität mit besonderer Affinität zu den 5-HT₂-Rezeptoren (Mantegani et al. 1998). Die serotoninergen Rezeptoren 5-HT₂ und 5-HT_{1A} spielen bei psychischen Erkrankungen, wie Depressionen und Schizophrenie, eine Rolle (Zifa und Fillion 1992).
- Die halluzinogene Wirkung des semisynthetischen Ergolinalkaloids D-Lysergsäurediethylamid (LSD) beruht ebenfalls auf einem serotonin-agonistischen Mechanismus. Der Angriff an 5-HT₂- und 5-HT_{1A}-Rezeptoren führt zu Bewußtseinserweiterungen und eventuell zum Verlust der Kontrolle über die Reizverarbeitung. LSD ist in Deutschland aufgrund seiner Aufführung im Betäubungsmittelgesetz ein nicht verkehrsfähiges Betäubungsmittel.

1.4.2 Beispiele für Indikationen und Präparate

Tabelle 1.1 Ergolinalkaloide in der modernen Medizin, nach Buttler 2004

Wirkstoff	Fertigarzneimittel	Anwendung
Ergotamin	Ergo Kranit [®]	Kupierung eines akuten Migräneanfalls oder von Clusterkopfschmerzen.
Dihydroergotamin	Ergont [®] DET MS spezial [®]	Kreislaufstörungen durch zu niedrigen Blutdruck; Intervallbehandlung der Migräne und anderer gefäßbedingter Kopfschmerzen.
Dihydroergotoxin	Hydergin [®]	Hypertonie und Kreislaufzentralisation
Methylergonovin	Methergin [®]	Kontraktion des Uterus; beschleunigt den Ausstoß der an der Gebärmutterwand haftenden Plazenta.
Bromocriptin Lisurid	Pravidel [®] Kirim [®] Dopergin [®]	Parkinsonsyndrom; zum Abstillen, bei Milchstau oder Mastitis.
Nicergolin	Nicergolinneuraxpharm [®]	Hirnleistungstörungen

1.4.3 Rechtliches

Das deutsche Grundstoffüberwachungsgesetz schränkt die Abgabe von Ergotamin ein, da es als Basis zur Herstellung von Lysergsäurediethylamid (LSD) verwendet werden könnte. Zusammen mit Ergonovin fällt es auch unter das „Übereinkommen der Vereinten Nationen vom 20. Dezember 1988 gegen den unerlaubten Verkehr mit Suchtstoffen und psychotropen Stoffen (Suchtübereinkommen)“.

1.5 Vorkommen von Ergolinalkaloiden

1.5.1 Vorkommen in Pilzen

Der Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* aus der Familie Clavicipitaceae und der Klasse Ascomycetes (Schlauchpilze) war der erste bekannte Ergolinalkaloid-bildende Pilz (vgl. 1.1). Später folgten zahlreiche weitere *Claviceps*-Arten.

Innerhalb der Clavicipitaceae wurden Ergolinalkaloide neben *Claviceps* (Flieger et al. 1997; Gröger und Floss 1998) bei den Gattungen *Balansia* (Bacon et al. 1986), *Atkinsonella* (Leuchtman und Clay 1988), *Epichloe* (Miles et al. 1996; Siegel et al. 1990; TePaske et al. 1993) und *Echinodothis* (Glenn und Bacon 1997) gefunden. Alle Mitglieder dieser Pilzfamilie gehen biotische Wechselbeziehungen ein, sowohl in Form einer mutualistischen Symbiose mit Pflanzenwirten, als auch als schädigende Parasiten von Pflanzen, Invertebraten und anderen Pilzen (Schardl et al. 1997). Als Pflanzenwirte waren bisher nur Gräser insbesondere der Familie Poaceae bekannt.

Die Gattung *Balansia* hebt sich in zweierlei Hinsicht von den übrigen Vertretern der Clavicipitaceen ab. Eine Besonderheit ist das Vorkommen von Ergobalansin, einem Prolin-freien Ergopeptin (Powell et al. 1990) (siehe Abb. 1.4). Diese Verbindung wurde zudem in *Ipomoea asarifolia* gefunden, einer Pflanze aus der Familie der Convolvulaceae (Jenett-Siems et al. 1994, 2004) (vgl. 1.5.2). Eine weitere Besonderheit von *Balansia*-Arten ist ihr epibiontisches Wachstum (Clay und Frenz 1993). Die meisten *Balansia*-Arten und einige *Atkinsonella*-Arten wachsen epibiontisch auf Meristemen, jungen Blättern und Knospen von Poaceen, während die anderen Vertreter der Clavicipitaceen fast ausschließlich als Endophyten in das Pflanzengewebe eindringen.

Das Vorkommen von Ergolinalkaloiden ist jedoch nicht auf die Familie der Clavicipitaceae beschränkt. Sie wurden auch bei entfernten Verwandten wie *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten, aus der Familie Eurotiaceae, gefunden (Flieger et al. 1997; Gröger und Floss 1998). Diese Familie gehört ebenfalls zur Klasse der Ascomycetes. Desweiteren wurden Ergolinalkaloide als Stoffwechselprodukte von *Rhizopus*-Arten aus der Familie Mucoraceae und der Klasse Zygomycetes identifiziert (Frohne und Jensen 1992). Hierbei handelt es sich meist um Saprophyten, seltener um Parasiten.

1.5.2 Vorkommen in Höheren Pflanzen

Ergolinalkaloide wurden in einer Reihe von Vertretern der Convolvulaceae (Windengewächsen) nachgewiesen, insbesondere bei den Gattungen *Turbina*, *Argyreia* und *Ipomoea*.

Schon 1960 entdeckte der Chemiker Albert Hofmann Ergolinalkaloide als das wirksame Prinzip der aztekischen Rauschdroge „Ololiuqui“ (Hofmann und Tschertter 1960; Hofmann 1961). Als „Ololiuqui“ werden die pulverisierten Samen von *Turbina corymbosa* (L.) Raf. [syn. *Rivea corymbosa* (L.) Hall. F., syn. *Ipomoea corymbosa* (L.) Roth] bezeichnet. Die Heimat dieser Pflanze ist vor allem Mexiko aber auch Kuba. *Turbina corymbosa* ist ethnobotanisch die wahrscheinlich interessanteste Winde. „Ololiuqui“ spielt seit alters her in Mexiko eine große Rolle. Es wurde schon in der Kolonialzeit von den Maya rituell und medizinisch angewandt. Bis heute verwenden u.a. die Mixteken, die Zapoteken und Mixe die Windensamen für diese Zwecke (Rätsch 2004). Im Rahmen der Dissertation von J. Groß (2004) und der vorliegenden Arbeit wurden Ergolinalkaloide in allen Teilen dieser Pflanze, mit Ausnahme der Wurzeln, nachgewiesen.

Die Gattung *Argyreia* ist in Hawaii, den Pazifischen Inseln, Afrika und Asien (Indien, Sri Lanka) beheimatet. In dieser Gattung wird insbesondere die als „Hawaiianische Holzrose“ bekannte *Argyreia nervosa* (Burman f.) Bojer [syn. *Argyreia speciosa* (L. f.) Sweet, syn. *Convolvulus speciosus* (L. f.)] für entheogene Zwecke genutzt. In Hawaii werden die Samen von armen Leuten als Rauschmittel verwendet. Es sind bisher jedoch keine rituellen Verwendungen dieser Pflanze bekannt geworden (Rätsch 2004).

Die Heimat der Gattung *Ipomoea* ist vor allem Mittelamerika, insbesondere Mexiko. Aufgrund der vielfältigen rituellen und medizinischen Verwendung ist hier *Ipomoea violacea* (L.) [syn. *Ipomoea tricolor*, syn. *Ipomoea rubro-caerulea*] besonders hervorzuheben. Die Samen dieser Pflanze wurden schon von den Azteken unter der Bezeichnung „Titliltzin“ als Entheogen genutzt. Sie werden heute vor allem von den Chinanteken, den Mazateken, Zapoteken und den Lakandonen rituell verwendet (Rätsch 2004). Im Handel sind zahlreiche Zuchtsorten erhältlich, deren Ergolinalkaloidgehalt in vegetativen Pflanzenorganen und Samen stark schwankt (Dissertation J. Groß 2004).

An dieser Stelle muss auch *Ipomoea asarifolia* Roem. et Schult. genannt werden. Im Rahmen der Dissertation von J. Groß (2004) und der vorliegenden Arbeit wurden Ergolinalkaloide in allen Teilen dieser Pflanze, mit Ausnahme der Wurzeln,

nachgewiesen. Die Pflanze wurde zunächst fälschlicherweise als *Ipomoea piurensis* identifiziert (Jenett-Siems et al. 2004). Es sind zwei Phänotypen der Pflanze bekannt: Die weißblütigen Individuen, deren Heimat Ecuador und Indien sind und die rotblütigen Individuen aus Panama (pers. Mitteilung Prof. Dr. E. Eich, FU Berlin). Über eine eventuelle Nutzung der Pflanzen ist nichts bekannt. Allerdings werden Vergiftungserscheinungen brasilianischer Ziegen nach dem Genuss von *Ipomoea asarifolia* beschrieben (Medeiros et al. 2003). Die Ziegen waren orientierungslos, zitterten, ließen sich fallen, litten unter starkem Speichelfluss und kamen häufig zu Tode. Man stellte fest, dass diese Symptome denen ähnelten, die an grasendem Vieh nach dem Verzehr von *Lolium perenne* beobachtet wurden (Towers 2000). Dieses Gras ist als Wirt von Ergolinalkaloid-bildenden Pilzen aus der Familie der Clavicipitaceen bekannt (Christensen et al. 1993, Spiering et al. 2005).

In den Höheren Pflanzen sind bisher hauptsächlich Clavin-Alkaloide (siehe Abb. 1.5) wie Chanoclavin, Agroclavin und Elymoclavin sowie einfache Lysergsäureamide (siehe Abb. 1.3) wie Lysergsäureamid (syn. Ergin), Isolysergsäureamid (syn. Isoergin) und Ergonovin gefunden worden (Gröger und Floss 1998). Eine Ausnahme bildet das Ergobalansin, ein Prolin-freies Ergopeptin (siehe Abb. 1.4). Ergobalansin kommt sowohl in *Ipomoea asarifolia*, als auch in der Pilzgattung *Balansia* vor (Jenett-Siems et al. 1994, 2004).

1.6 Horizontaler Gentransfer

Die Gründe für das Vorkommen von Ergolinalkaloiden in Convolvulaceen waren seit ihrer Entdeckung durch Hofmann und Tschertter (1960) ungeklärt. Es bestand einerseits die Möglichkeit, dass die Höheren Pflanzen selber in der Lage sind, Ergolinalkaloide zu bilden bzw. eine Teilaufgabe zu übernehmen. Andererseits konnten, wie bei den Poaceen, ausschließlich mit der Pflanze vergesellschaftete Pilze für die Biosynthese verantwortlich sein (vgl. 1.5.1).

Im Falle einer eigenständigen Ergolinalkaloid Produktion durch die Convolvulaceen ist ein Horizontaler Gentransfer nicht auszuschließen. Als Horizontaler Gentransfer oder Lateraler Gentransfer wird eine Übertragung von Genen außerhalb der geschlechtlichen Fortpflanzung und über Artgrenzen hinweg bezeichnet. Er bildet in

der Evolutionstheorie eine Möglichkeit zur Erklärung von Sprüngen in der Entwicklung vor allem von Mikroorganismen.

Die genetische Information für die Biosynthese der Ergolinalkaloide könnte von den Pilzen auf die Höheren Pflanzen oder umgekehrt übertragen worden sein. Dies ist im Falle einer symbiontischen Gemeinschaft nicht auszuschließen. Eine enge physische Assoziation zwischen Organismen wird auch in anderen Systemen (Marienfeld et al. 1997, Bushmann 2002) für einen Horizontalen Gentransfer verantwortlich gemacht.

Die Biosynthesegene von *Claviceps purpurea* liegen in einem Ergolinalkaloid-Gencluster vor (Tudzynski et al. 1999, Haarmann et al. 2005). Dies könnte auch für andere Pilzarten gelten und würde den Horizontalen Gentransfer erheblich vereinfachen. Die Biosynthesegene in Pflanzen liegen i.d.R. nicht geclustert vor, sie sind im Genom verstreut. Daher wären für den Gentransfer von den Höheren Pflanzen auf die Pilze mehrere koordinierte Transferereignisse notwendig.

Bisher wurde in den Pflanzen kein Biosynthese-Apparat zur Produktion von Ergolinalkaloiden gefunden.

1.7 Zielsetzung

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde die Korrelation von Pilzbesiedelung und Ergolinalkaloidgehalt der beiden Convolvulaceen *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (vgl. 1.5.2, siehe Abb. 1.7) auf molekularbiologischer, ökologischer und biochemischer Ebene untersucht. Die Untersuchungen sollten die unter 1.6 erläuterte Frage nach der Herkunft von Ergolinalkaloiden in den Höheren Pflanzen aufklären. Dabei wurde die gut erforschte Symbiose von Gräsern (Poaceen) und Ergolinbildenden Clavicipitaceen-Pilzen als experimentelles Vorbild genommen (z.B. Schardl et al. 2004, Tudzynski und Scheffer 2004, Gentile et al. 2005). Da die Symbiose von Gräsern mit Ergolinalkaloid-bildenden Endophyten (im Pflanzengewebe wachsend, von griech. endon = innerhalb) häufiger beschrieben wird und besser untersucht ist, als die Symbiose von Gräsern mit Ergolinalkaloid-bildenden Epibionten (auf der Pflanzenoberfläche wachsend, von griech. epí- = auf) wurden zunächst Endophyten als Alkaloidproduzenten in den Convolvulaceen favorisiert (vgl. Dissertation J. Groß 2004). Als potentielle Ergolinalkaloid-Produzenten erwiesen sich jedoch letztlich epibiontische Pilze auf den Blattoberflächen der Pflanzen (Kucht et al. 2004, Steiner et al. 2006).



Abbildung 1.7 links: *Ipomoea asarifolia*, rechts: *Turbina corymbosa*; Gewächshaus des Instituts für Pharmazeutische Biologie, Bonn.

Ziele der weiteren Untersuchungen waren die Bestätigung der Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Vorkommen der Epibionten, die Identifizierung der Pilze, die Begründung der Symbiose sowie die Aufklärung der spezifischen Rollen von Pilzen und Pflanzen bei der Alkaloidbildung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels ökologischer und biochemischer Experimente sowie mittels mikroskopischer und analytischer Methoden versucht, die Pflanze-Pilz-Interaktionen von *Turbina corymbosa* und *Ipomoea asarifolia* aufzuklären. Fraglich war, was die Pilze auf den Blattoberflächen der dikotylen Convolvulaceen finden, möglicherweise aber nicht bei den monokotylen Poaceen? Wie vermehren sich die Pilze? Konnte es sich bei den Pilzen um fakultative Endophyten handeln oder waren die vermeintlichen Mutualisten eventuell fakultative Parasiten? Die phylogenetische Nähe epibiontischer und endophytischer Clavicipitaceen-Pilze sowie der fließende Wechsel von Mutualismus zu Antagonismus ist aus Symbiosen mit Poaceen hinreichend bekannt (Clay und Schardl 2002, Schardl et al. 2004). Unbeantwortet war zudem, wie die Pflanzen von dieser Gemeinschaft profitieren. Haben die Ergolinalkaloide eine Schutzfunktion? Die Verbesserung der ökologischen Fitness von Poaceen durch die Alkaloidbildung wird häufig beschrieben (z.B. Clay und Schardl 2002, Bush et. al 1997). Möglich war auch eine Teilfunktion der Pflanzen bei der Alkaloidbildung.

Zur Beantwortung dieser Fragen waren zunächst Lebensweise und Vermehrung der Pilze von Interesse. Elektronenmikroskopische Studien, die Anzucht von Pflanzen aus sterilen Samen sowie ökologische Verbreitungsexperimente sollten hier Aufschluss geben.

In weiteren Experimenten sollten die ökologischen und biochemischen Interaktionen von Pilzen und Pflanzen untersucht werden. Dazu wurden die pflanzlichen Ressourcen Licht und Nährstoffe verändert. Dies ermöglichte die Beobachtung von Wachstum und Produktivität der Pilze bzw. der Pflanzen in verschiedenen Lebenssituationen. Zudem sollten in einer vergleichenden Analyse Pilzdichte und Alkaloidgehalt unterschiedlicher Blattstadien überprüft werden.

Desweiteren war es wichtig, die spezifische Rolle von Pilzen und Pflanzen bei der Ergolinalkaloid Biosynthese aufzuklären. Noch war nicht auszuschließen, dass auch die Pflanzen zur Biosynthese fähig bzw. daran beteiligt sind. Versuche zur Alkaloidspeicherung sowie biochemische Einbaustudien mit möglichen Präkursoren der Ergolinbiosynthese sollten Hinweise auf den Stoffaustausch von Pilz und Pflanze geben.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit konnten letztendlich mit den Erkenntnissen der molekularbiologischen Arbeiten verglichen werden. Deren Hauptaugenmerk galt der Identifizierung der epibiontischen Pilze und dem Auffinden von Biosynthesegenen in den Pilzen.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien, Lösungen, sonstige Materialien

2.1.1 Chemikalien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fanden die in Tabelle 2.1 aufgelisteten Chemikalien Verwendung. Benötigte Referenzsubstanzen (Ergolinalkaloide) sind als solche gekennzeichnet.

Tabelle 2.1 Wichtige Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Substanz	Bezugsquelle
Agar	Fluka, Taufkirchen
Ammoniumhydroxidlösung 25 %	Riedel-de Haën, Buchs, Schweiz
Ammoniumnitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Anilinblau 0,05 %	Dr. Steiner, Bonn
Bactopepton	Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA
6-Benzylaminopurin (BAP)	Sigma, Deisenhofen
Bleiacetatlösung (vgl. Tab. 2.3)	Dr. Steiner, Bonn
Borsäure	Fluka, Taufkirchen
Cacodylsäure 0,2 M	Dr. Steiner, Bonn
Calciumchlorid	Fluka, Taufkirchen
Chanoclavin (Referenzsubstanz)	Prof. Gröger, Halle
Chloralhydrat 2,5 %	Merck KGaA, Darmstadt
Cobaltchlorid x 6 H ₂ O	Fluka, Taufkirchen
Deoxyxylulose (deutertiert)	Prof. Boland, Jena
Dichlormethan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Fluka, Taufkirchen
p-Dimethylaminobenzaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
EDTA, Dinatriumsalz (Titriplex [®] III)	Merck KGaA, Darmstadt
Eisensulfat x 7 H ₂ O	Riedel-de Haën, Buchs, Schweiz
Elymoclavin (Referenzsubstanz)	Prof. Gröger, Halle
Ergometrin (Referenzsubstanz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäureethylester	SDS GmbH, Rastatt

Ethanol, 96 %	SDS GmbH, Rastatt
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt (Mikrobiologie)	Fluka, Taufkirchen
Hexan	SDS GmbH, Rastatt
Indol-3-essigsäure (IAA)	Merck KGaA, Darmstadt
Isolysergsäureamid (Referenzsubstanz)	Prof. Gröger, Halle
Isolysergsäure α -hydroxyethylamid (Referenzsubstanz)	Prof. Gröger, Halle
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumcitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumiodid	Fluka, Taufkirchen
Kaliumnitrat	Riedel-de Haën, Buchs, Schweiz
Karnovskylösung (vgl. Tab. 2.3)	Dr. Steiner, Bonn
Kupfersulfat x 5 H ₂ O	Fluka, Taufkirchen
Limonen	Dr. Steiner, Bonn
Lysergsäureamid (Referenzsubstanz)	Prof. Gröger, Halle
Lysergsäure α -hydroxyethylamid (Referenzsubstanz)	Prof. Gröger, Halle
Magermilchpulver	Fluka, Taufkirchen
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maisstärke	Fluka, Taufkirchen
Malzextrakt	Fluka, Taufkirchen
Mangansulfat x H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol (HPLC-Qualität)	SDS GmbH, Rastatt
Mevalonsäure (deutertiert)	Prof. Boland, Jena
Myo-Inositol	Merck KGaA, Darmstadt
1-Naphtylessigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhypochlorid (6-14% aktives Chlor)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriummolybdat x 2 H ₂ O	Riedel-de Haën, Buchs, Schweiz
Natriumnitrit	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumsulfat, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
Nicotinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Osmiumtetroxidlösung (vgl. Tab. 2.3)	Dr. Steiner, Bonn
Paraffin	Fluka, Taufkirchen
Penicillin G K-salt	Serva GmbH, Heidelberg
Pepton aus Casein (Mikrobiologie)	Merck KGaA, Darmstadt

Petrolether 40-60°	SDS GmbH, Rastatt
Phytigel	Sigma, Deisenhofen
Pyridoxin	Merck KGaA, Darmstadt
Rosmarinsäure	Dr. Steiner, Bonn
Saccharose	Carl Roth GmbH
Salzsäure, 37 % rauchend	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure, 95-98 %, reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Streptomycinsulfat	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Tetracyclinhydrochlorid	Fluka, Taufkirchen
Thiamin-HCL	Merck KGaA, Darmstadt
Thujon	Dr. Steiner, Bonn
Thymol	Dr. Steiner, Bonn
Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tryptophan	Fluka, Taufkirchen
Tryptophan- ¹⁴ C	Hartmann Analytic, Braunschweig
Weinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Zinksulfat x 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2 Fungizide

Der Einsatz der, in Tabelle 2.2 aufgelisteten, Fungizide war für die vorliegende Arbeit von zentraler Bedeutung.

Tabelle 2.2 In dieser Arbeit verwendete Fungizide und ihre Hersteller

Fungizid	Wirkstoffe	Anwendung lt. Hersteller*	Hersteller
Folicur®	Tebuconazol (25 %) (Triazol)	2 Behandlungen pro Jahr à 0,15 %; Pilzkrankheiten an Raps, Getreide, Gemüse	Bayer AG, Leverkusen
Pronto Plus®	Spiroxamin (25 %) (Spiroketalamin) Tebuconazol (13 %) (Triazol)	2 Behandlungen pro Jahr à 0,15 %; Pilzkrankheiten an Getreide	Bayer AG, Leverkusen
Switch®	Cyprodinil (37,5 %) (Pyrimidinamin) Fludioxonil (25 %) (Pyrrolnitrin)	2 Behandlungen pro Jahr à 0,1 %; Pilzkrankheiten an Wein, Obst, Gemüse, Zierpflanzen	Syngenta Agro GmbH, Frankfurt a.M.

*Herstellerangaben siehe 8.1

2.1.3 Düngemittel

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Langzeitdünger Plantosan® der Firma Plantosan AG (Toffen, Schweiz) eingesetzt. Plantosan® enthält die pflanzlichen Hauptnährstoffe Stickstoff, Phosphor und Kalium (NPK) im Verhältnis 20 : 10 : 15 sowie die im Gartenbau üblichen Spurenelemente (Herstellerangaben siehe 8.2). Er gibt die für die Pflanzenentwicklung benötigte Nährstoffmenge über einen Zeitraum von 8 – 10 Wochen ab. Etwa 70 % des Stickstoffs liegen als Ureaform-Stickstoff (Formaldehydharnstoff) vor. Dieser langsam fließende Stickstoffanteil wird durch Mikroorganismen in pflanzenverfügbare Stickstoffformen umgewandelt. Da dieser Vorgang ebenso wie das Wachstum der Pflanzen temperaturabhängig ist, wird der Stickstoff den Pflanzen bedarfsgerecht zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Puffer und Lösungen für die Mikroskopie

Die im Folgenden aufgeführten Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt (vgl. 2.4.1).

Tabelle 2.3 Puffer und Lösungen für die Mikroskopie

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung
Anilinblau-Lösung	0,05 % Anilinblau Kaliumphosphatpuffer, pH 9	mischen
Cacodylatpuffer	0,2 M Cacodylsäure Natriumchlorid	in Wasser lösen auf pH 7,4 einstellen
Chloralhydratlösung	2,5 % Chloralhydrat	in Wasser lösen
Kaliumhydroxidlösung	1 N Kaliumhydroxid	in Wasser lösen
Kaliumphosphatpuffer	0,067 M Kaliumhydrogenphosphat	in Wasser lösen, auf pH 9 einstellen
Karnovskylösung	8,0 % Glutaraldehyd 8,0% Paraformaldehyd Cacodylatpuffer, pH 7,4 0,005 g Calciumchlorid	Aldehyde und Puffer 1 : 1 : 2 (V/V/V) mischen, Calcium- chlorid dazugeben
Osmiumtetroxidlösung	0,4 % Kaliumdichromat 3,4 % Natriumchlorid 2,0 % Osmiumtetroxid	1 : 1 : 2 (V/V/V) mischen

Bleiacetatlösung	1,33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1,76 g $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 30 ml Wasser	mischen
------------------	---	---------

2.1.5 Reagenzien und Fließmittel

Essigsäureethylester und Ethanol zur Herstellung der folgenden Reagenzien und Fließmittel wurden über Calciumoxid am Rückfluss destilliert.

Tabelle 2.4 Reagenzien und Fließmittel

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
Fließmittel	DC	Essigsäureethylester 75,0 ml
		Ethanol, 96 % 10,0 ml
		Dichlormethan 10,0 ml
		Ammoniak, 25% 5,0 ml
Van Urk – Reagenz I	Photometrie	Schwefelsäure (konz.) – Wasser 1 : 1
		p-Dimethylaminobenzaldehyd 1mg/ml
Van Urk – Reagenz II	Photometrie	Wasser
		Natriumnitrit 1mg /ml
Van Urk – Sprühreagenz 1	DC	p-Dimethylaminobenzaldehyd 0,25 g
		Salzsäure, 25 % 25,0 ml
		Ethanol, 96 % 25,0 ml
Van Urk – Sprühreagenz 2	DC	Natriumnitrit 0,025 g
		Wasser 25,0 ml
		Ethanol, 96 % 25,0 ml
Van Urk – Sprühreagenz 3	DC	Salzsäure, 25 % 25,0 ml
		Ethanol, 96 % 25,0 ml

2.1.6 Sonstige Materialien

Im Rahmen dieser Arbeit fanden die in Tabelle 2.5 aufgelisteten Materialien Verwendung.

Tabelle 2.5 Wichtige Materialien und ihre Bezugsquellen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Deckgläser, 24 x 32 mm reinweiß	Faust GmbH, Rheinbach
HPLC-Säulen, 125x2 bzw. 250x4 mm ² 5 µm Nucleodur [®] C ₁₈ Pyramid	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren
Kieselgelplatten, 60 F ₂₅₄ DC	Merck KGaA, Darmstadt
Kryogefrierbox	Nalgene, Hamburg
Kryoröhrchen, 2 ml	Nalgene, Hamburg
Küvetten, ½ Mikro Einmalküvetten, 1 x 0,4 x 4,5 cm	ratiolab [®] GmbH, Dreieich
Membranfilter, Spartan 13/0,2 RC	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Objektträger, 76 x 26 mm, reinweiß, geschnitten	Faust GmbH, Rheinbach
Parafilm [™]	American National Can., Greenwich, USA
Sterile Petrischalen 94/16	Greiner bio-one GmbH, Solingen
pH-Indikatorpapier	Merck KGaA, Darmstadt
Probengefäße, 2 ml, klar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SiOH – Säulen (1,2 x 6,5 cm), 6 ml / 500 mg unmodifiziertes Kieselgel	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren
Sterilfilter, FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

2.2 Kulturmedien

Zur Herstellung aller Medien wurde Reinstwasser (vgl. 2.4.1) verwendet. Die benötigten pH-Werte wurden mit verdünnter Natronlauge bzw. verdünnter Salzsäure unter Verwendung eines digitalen pH-Meters eingestellt. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min (vgl. 2.4.2). Antibiotikallösungen wurden nach dem Abkühlen auf unter 50 °C zugegeben.

2.2.1 Medien zur Isolierung und Anzucht von Pilzen

Tabelle 2.6 Medien für Pilze

Medium	Zusammensetzung	Herstellung	
Isolierungsmedium (Petrini et al. 1992)	Malzextrakt	20,0 g	Nach dem Autoklavieren: Zugabe von Penicillin und Streptomycin als wässrige Lösung durch Sterilfiltration (vgl. 2.4.2); Zugabe von Tetracyclin als ethanolische Lösung ohne Sterilisation.
	Agar	20,0 g	
	Penicillin G	0,06 g	
	Streptomycinsulfat	0,08 g	
	Tetracyclin HCL	0,05 g	
	Wasser	1000 ml	
Wachstumsmedium (Schulz et al. 1993)	Malzextrakt	20,0 g	
	Pepton	2,5 g	
	Hefeextrakt	2,5 g	
	Agar	20,0 g	
	Wasser	1000 ml	
Glucose-Citrat Agar (White, unveröffentlicht)	MS-Medium*	4,3 g	*MS-Medium siehe Tab. 2.7
	Kaliumcitrat	5,0 g	
	Glucose	10,0 g	
	Agar	10,0 g	
	Wasser	1000 ml	
Paraffin Agar (White, Owens 1992)	MS-Medium*	1,0 g	*MS-Medium siehe Tab. 2.7
	Paraffin	0,5 g	
	Agar	3,0 g	
	Wasser	200 ml	
Stärke-Milch Agar (White 1993)	MS-Medium*	4,3 g	*MS-Medium siehe Tab. 2.7
	Magermilchpulver	5,0 g	
	Maisstärke	10,0 g	
	Agar	10,0 g	
	Wasser	1000 ml	
Trypton-Glucose Agar (Lam et al. 1995)	MS-Medium*	4,3 g	*MS-Medium siehe Tab. 2.7 Glucose und CaCl ₂ in 100 ml Wasser lösen; die weiteren Komponenten in 900 ml Wasser lösen. Nach dem Autoklavieren: Lösungen mischen; pH 6,5 einstellen.
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,181 g	
	KH ₂ PO ₄	3,0 g	
	K ₂ HPO ₄	2,0 g	
	Myo-Inositol	0,1 g	
	Trypton	2,0 g	
	Agar	15,0 g	
	Thiamin	0,4 mg	
	Nicotinsäure	0,5 mg	
	Pyridoxin	0,5 mg	

Trypton-Glucose Agar (Fortsetzung)	Glucose	20,0 g	
	CaCl ₂	0,332 g	
	Wasser	1000 ml	
Hefeextrakt Agar (Davis et al. 1986)	Hefeextrakt	2,0 g	Nach dem Autoklavieren: Zugabe von Streptomycin als wässrige Lösung durch Sterilfiltration (vgl. 2.4.2); pH 6,5 einstellen.
	KH ₂ PO ₄	5,0 g	
	MgSO ₄	0,5 g	
	Glucose	5,0 g	
	Agar	20,0 g	
	Streptomycinsulfat	0,15 g	
	Wasser	1000 ml	
Flüssigmedium M102 (Rykard et al. 1982)	Saccharose	30,0 g	
	Malzextrakt	20,0 g	
	Bactopepton	2,0 g	
	Hefeextrakt	1,0 g	
	KCL	0,5 g	
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g	
	KH ₂ PO ₄	0,5 g	
	Wasser	1000 ml	
Kirsch Agar (CBS-Rezept)	Extrakt	200 ml	<i>Kirschextrakt:</i> 1 kg Kirschen (entsteint) in 1 l Wasser kurz kochen, 2 h sieden und filtrieren.
	Wasser	800 ml	
	Agar	15,0 g	
Mais- bzw. Hafermehl Agar (Leuchtmann, Clay 1996)	Extrakt	1000 ml	<i>Mais- bzw. Hafermehlextrakt:</i> 30 g Mais- bzw. Hafermehl in 1 l Wasser kurz kochen, 2 h sieden und filtrieren.
	Agar	15,0 g	
Kartoffel-Karotten Agar (Leach 1962)	Extrakt	500 ml	<i>Kartoffel-Karotten-Extrakt:</i> 40 g geriebene Karotten und 40 g geschälte, geschnittene Kartoffeln 5 min getrennt kochen und filtrieren.
	Wasser	500 ml	
	Agar	15,0 g	
Kryomedium für Dauerkulturen (pers. Mitteil. J. Groß)	Saccharose	140 g	
	Pepton	10 g	
	Wasser	1000 ml	

2.2.2 Medien zur Förderung und Etablierung von pflanzlichen Sterilkulturen

Makro- und Mikroelemente sowie Vitamine wurden als 10fach konzentrierte Stocklösung bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung der Medien wurden sie aufgetaut und die benötigte Menge mit Wasser aufgefüllt. Phytohormone wurden als ethanolische Stocklösung (1 mg/ml) bei 4 °C aufbewahrt und dem Medium zugegeben.

2.2.2.1 MS-Medium, basale Salzmischung (Murashige und Skoog, 1962)

Tabelle 2.7 MS-Medium

	Bestandteile	Konzentration / l Wasser	
Makroelemente	KNO ₃	1900,0	mg/l
	NH ₄ NO ₃	1650,0	mg/l
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440,0	mg/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370,0	mg/l
	KH ₂ PO ₄	170,0	mg/l
Mikroelemente	Na ₂ EDTA	37,3	mg/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8	mg/l
	MnSO ₄ x H ₂ O	15,0	mg/l
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6	mg/l
	H ₃ BO ₃	6,2	mg/l
	KI	0,83	mg/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	mg/l
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	mg/l
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	mg/l

pH-Wert 5,75

2.2.2.2 Medium zur Anzucht von Samenpflanzen und Stecklingen

Die Aussaat sterilisierter Samen sowie die Anzucht steriler Samenpflanzen und Stecklingspflanzen erfolgte auf MS/2-Festmedium. Dazu wurde die halbe Konzentration von o.g. MS-Medium (vgl. Tab. 2.7) mit Phytigel (4,0 g/l) versetzt.

2.2.2.3 Medien zur Regeneration von Pflanzen

Tabelle 2.8 Medien zur Regeneration von Pflanzen

Medium	Zusammensetzung	
Festmedium zur Bildung von Kallus	MS-Medium (siehe Tab. 2.7)	1000 ml
	Phytigel	4,0 g
	Saccharose	20,0 g
	6-Benzylaminopurin	2,0 mg
	Indolessigsäure	1,5 mg

Flüssigmedium zur Bildung von Pflanzen aus Kallus	MS-Medium (siehe Tab. 2.7)	1000 ml
	Saccharose	20,0 g
	6-Benzylaminopurin	0,01 mg

2.2.2.4 LS-Medium (Linsmaier und Skoog, 1965) zur Anlage von Zellkulturen

Tabelle 2.9 LS-Medium

	Bestandteile	Konzentration / l Wasser	
Makroelemente	KNO ₃	1900,0	mg/l
	NH ₄ NO ₃	1650,0	mg/l
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440,0	mg/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370,0	mg/l
	KH ₂ PO ₄	170,0	mg/l
Mikroelemente	Na ₂ EDTA	41,3	mg/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8	mg/l
	MnSO ₄ x H ₂ O	22,3	mg/l
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10,6	mg/l
	H ₃ BO ₃	6,0	mg/l
	KI	0,83	mg/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	mg/l
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	mg/l
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	mg/l
	Vitamine	Myo-Inositol	100,0
Thiamin-HCl		0,4	mg/l
Phytohormone	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	0,2	mg/l
	1-Naphtylessigsäure	0,2	mg/l
Zucker	Saccharose	30,0	g/l

pH-Wert 6,0; als Festmedium mit 4,0 g Phytigel

2.3 Biologisches Material

2.3.1 Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* Roem. & Schult. und *Turbina corymbosa* (L.) Raf. aus der Familie der Convolvulaceae untersucht. Die Samen stammen aus unterschiedlichen Quellen (vgl. Tab. 2.10). Das Pflanzenmaterial wurde jährlich durch Stecklinge erneuert. Zudem wurden regelmäßige Samenernten durchgeführt.

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zwischen März und Juni der Jahre 2003, 2004 und 2005 Stecklinge und Sämlinge (aus Samen der Ernte 2003 und 2004) angezogen. Es wurden sowohl pilz-/alkaloidführende als auch pilz-/alkaloidfreie Pflanzen (vgl. 3.1.2) angezogen und untersucht.

Von *Turbina corymbosa* wurden zusätzlich Pflanzen aus käuflich erworbenen Samen (vgl. Tab. 2.10) angezogen und untersucht.

Tabelle 2.10 Untersuchtetes Pflanzenmaterial und seine Herkunft

Pflanze	Herkunft der Samen	untersuchtes Pflanzenmaterial
<i>Ipomoea asarifolia</i>	Wildsammlung in Ecuador, Dez. 1991; Prof. Dr. E. Eich, Berlin	Stecklinge und Samenpflanzen der Jahre 2003, 2004 und 2005 aus eigener Zucht
<i>Turbina corymbosa</i>	Rühlemans Kräuter und Duftpflanzen, Horstedt, Okt. 1999	Stecklinge und Samenpflanzen der Jahre 2003, 2004 und 2005 aus eigener Zucht
<i>Turbina corymbosa</i>	Fa. Sementes, Meßstetten, Okt. 2004	Samenpflanzen des Jahres 2004 aus käuflich erworbenen Samen

2.3.2 Pilze

Die in Tabelle 2.11 aufgeführten Pilzisolat galten, mit Ausnahme von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01, aufgrund der Isolierungsmethode als Endophyten (vgl. 3.3.1). Sie wurden im Jahr 2004 aus *Ipomoea asarifolia* isoliert und als Dauerkulturen gelagert (vgl. 3.3.3).

Bei Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 handelt es sich um epibiontische Pilze. Diese auf der Blattoberfläche der Pflanzen lebenden Pilze wurden von den Blättern der Gattungen *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* isoliert (vgl. 3.3.2). Die Isolierung dieser Pilze erfolgte unmittelbar vor jedem Experiment.

Tabelle 2.11 In dieser Arbeit untersuchte Pilzisolat

Laborbezeichnung	Pilz (Art, Gattung, Familie)	Pflanze	Pflanzenteile
Iasa-F03	<i>Alternaria triticina</i> , Dematiaceae	<i>Ipomoea a.</i>	Blätter, Stängel
Iasa-F06	<i>Penicillium olsonii</i> , Eurotiaceae	<i>Ipomoea a.</i>	Blätter, Stängel
Iasa-F08	<i>Penicillium adametzioides</i> , Eurotiaceae	<i>Ipomoea a.</i>	Stängel
Iasa-F09	<i>Penicillium roquefortii</i> , Eurotiaceae	<i>Ipomoea a.</i>	Blätter
Iasa-F10	<i>Glomerella cingulata</i> , Glomerellaceae	<i>Ipomoea a.</i>	Blätter
Iasa-F12	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , Leotiaceae	<i>Ipomoea a.</i>	Blätter
Iasa-F13	Clavicipitaceae (Art, Gattung unbekannt)	<i>Ipomoea a.</i>	Blätter
Tcor-F01	Clavicipitaceae (Art, Gattung unbekannt)	<i>Turbina c.</i>	Blätter

In Tabelle 2.11 sind ausschließlich die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pilze aufgeführt. Aus *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* wurden zahlreiche weitere Endophyten isoliert. Die Pilze wurden von Diplom-Pharmazeutin Mahalia Ahimsa-Müller im Rahmen ihrer Doktorarbeit zum Teil identifiziert. Durch den Vergleich der 18S-rDNA sowie der Internal-Transcribed-Spacer(ITS)-Regionen isolierter und bekannter Pilze wurden die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse rekonstruiert (vgl. Steiner et al. 2006). Die neuen Sequenzen wurden in eine Internetdatenbank eingeladen. Zum Sequenzvergleich diente das Programm „Blast-Search“ des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Die in Tabelle 2.12 genannten Pilze stammen aus externen Quellen und wurden ebenfalls als Dauerkulturen gelagert (vgl. 3.3.3).

Tabelle 2.12 In dieser Arbeit untersuchte Pilze aus externen Quellen

Pilz (Art, Gattung, Familie)	Herkunft
<i>Balansia obtecta</i>	Prof. Schardl, Lexington, KY, USA
<i>Claviceps purpurea</i>	Prof. Tudzynski, Münster

2.4 Laborbedingungen und Einrichtungen

2.4.1 Reinstwasseraufbereitung

Für alle Arbeiten wurde Reinstwasser verwendet. Die Bereitung erfolgte mit einer „Milli-Q Reagent Water-Anlage“ der Firma Millipore, Eschborn.

2.4.2 Sterilisationsmethoden

Sterilisation von Gebrauchtmaterialien und Medien erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C in gesättigtem Wasserdampf für 20 min im Varioklav Dampfsterilisator der Firma H+P Labortechnik GmbH.

Sterilisation von hitzelabilen Lösungen erfolgte durch Sterilfilter mit einer Nitrocellulosemembran und einer durchschnittlichen Porenweite von 0,2 µm der Firma Schleicher & Schüll GmbH, Dassel.

Zur Oberflächensterilisation wurde Antifect® (Schülke & Mayr) verwendet, zur Händedesinfektion Desderman® (Schülke & Mayr).

2.4.3 Sterile Bedingungen

Arbeiten unter sterilen Bedingungen wurden unter der Querstrombank (Laminar-Air-Flow) durchgeführt. Pflanzen wurden in einer Querstrombank des Typs LF 436B der Firma CEAG, Dortmund bearbeitet. Pilze wurden in einer Querstrombank der Firma Steag GmbH, Pfullingen überimpft. Arbeiten mit Medien wurden in dem Gerät BSB 4A der Firma Gelaire Flow Laboratories durchgeführt.

2.4.4 Raum zur Kultivierung pflanzlicher Sterilkulturen

Alle Kalluskulturen wurden bei 25 °C in weißem Dauerlicht (Osram Cool White, Ø 1960 Lux) kultiviert. Regenerierte sowie aus sterilen Samen angezogene Pflanzen wurden bei 25 °C teilweise in weißem Dauerlicht (s.o.) und teilweise in rot-blauem Dauerlicht (Sylvania Gro-Lux, Ø 2670 Lux) kultiviert.

2.4.5 Klimakammer

Einige Topfpflanzen wurden alternativ zur Anzucht im Gewächshaus in einer Kurztag-Klimakammer bei 25 °C, 50 % Luftfeuchte und 8 h Belichtung kultiviert. Die Klimakammer wurde von Frau Prof. Dr. H. Schnabel, Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.

2.4.6 Sonstige Geräte

In der folgenden Tabelle werden die im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich genutzten Geräte aufgeführt.

Tabelle 2.13 Geräte

Gerät	Typ / Herkunft
Digitalkamera	Nikon E775, Coolpix 775
Gefrierschrank -80 °C	Jouan VX 430, Astel, Frankreich
HPLC	L-6200 A Intelligent Pump, L-4000 UV Detektor, Merck Hitachi, Ltd. Tokio, Japan
HPLC-MS	HPLC Agilent 1100 Serie (DA Detektor), Agilent, Palo Alto, USA; gekoppelt an LC/MS/MS API2000 (Turbo Ion Spray Quelle), Applied Biosystem / MDS SCIEX
Inkubationsschüttler	Multitron HT Infors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Lichtmikroskop	Leitz DMRB Fotomikroskop, ausgerüstet für Normarski Interferenz und Epifluoreszenz, Firma Leica, Bensheim
Luxmeter	LM 300, ELV AG, Leer
Magnetrührer mit Heizung	Gerhardt, Auer Bittmann Soulite AG, Zürich, Schweiz
pH-Meter	pH525, WTW, Weilheim
Photometer	Uvikon® 860, Kontron, München
Rasterelektronenmikroskop	XL 30 SFEG, Philips, Eindhoven, Niederlande; Kritisch-Punkt-Trochnung: CPD 030, BAL-TEC, Schalksmühlen; Besputtern: Sputter Coater HR 208, Cressington, Watford, UK

Rotationsverdampfer	Verdampfer: Typ RV 05 IKA-Werk, Staufen Vakuumpumpe: MZ 2C/1,7 Vacuubrand, Wertheim
Stabmixer	MR 5000 M, 600 Watt, Braun (Küchengeräte)
Transmissionselektronenmikroskop	CM 120 Elektronenmikroskop mit LaB ₆ Filament, Philips, Eindhoven, Niederlande
Trockenschrank	VT 5042 EK/N2, Heraeus, Hanau
Ultramikrotom	Ultracut E (70-75 nm), Reichert-Jung (Leica Wien)
Ultraschall-Desintegrator	Sonifier Typ 250, Branson, Danbury, Conneticut, USA
UV-Lampe	881128, CAMAG, Berlin
Waagen	H51-Feinwaage, K7-Grobwaage, Mettler, Gießen
Zentrifugen	Superspeed Refrigerated Centrifuge, Du Pont de Nemours GmbH, Sorvall; Eppendorf 5804R, Eppendorf, Hamburg

3 METHODEN

3.1 Ökologische und physiologische Methoden

Die hier dargestellten Versuche wurden, mit Ausnahme von 3.1.5 und 3.1.6, in den Gewächshäusern des Instituts für Pharmazeutische Biologie durchgeführt.

3.1.1 Fungizidversuche

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 Fungizidversuche durchgeführt. Für die Versuche wurden von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* zwischen März und Juni 2003 bzw. 2004 Stecklinge angezogen (vgl. Tabl. 2.10). Im Juni 2003 erfolgte mit 3 Monate alten *Ipomoea*-Pflanzen eine Behandlung. Im September 2003 wurden 3 Monate alte und im Februar 2004 8 Monate alte *Turbina*-Pflanzen mit Fungiziden behandelt. Die Fungizidbehandlungen erfolgten in Anlehnung an einen bereits mit *Ipomoea asarifolia* durchgeführten Versuch (Kucht et al. 2004). Aufgrund der Erfahrungswerte wurden die 3 Fungizide Folicur[®], Pronto Plus[®] und Switch[®] ausgewählt (vgl. Tab. 2.2).

Von beiden Pflanzenarten wurden je 4 Pflanzengruppen mit je 6 Pflanzen gebildet. 3 Gruppen wurden in zweiwöchigem Abstand 18 Wochen lang mit den zugeteilten Fungiziden behandelt. Die Spritzkonzentrationen entsprachen den Herstellerangaben (vgl. Tab. 2.2). Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe und blieb unbehandelt. Es wurde auf eine ausreichende Trennung der Pflanzengruppen geachtet. Alle Pflanzen wurden im Gewächshaus auf desinfizierte Tische gestellt. Nach 18 Wochen wurden die Pflanzen aller Gruppen geerntet und weiterverarbeitet (vgl. 3.4.1).

3.1.2 Anzucht von pilz- und alkaloidfreien Pflanzen

Durch die unter 3.1.1 beschriebene Fungizidbehandlung mit Folicur[®] und Pronto Plus[®] wurden die Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 (vgl. 2.3.2) von der Blattoberfläche der Pflanzen beseitigt, dies führte gleichzeitig zur Eliminierung der Ergolinalkaloide in den Pflanzen. Die so gewonnenen pilz- und alkaloidfreien Pflanzen wurden mittels Stecklingsanzucht vermehrt. Die Stecklinge blieben pilz- und alkaloidfrei. Um

Fungizidrückstände auszuschließen, wurden für die nachfolgend dargestellten Experimente nicht die Stecklinge der behandelten Pflanzen verwendet, sondern ausschließlich Pflanzen der 2. und 3. Stecklingsgenerationen.

Aus den behandelten Pflanzen konnten zudem einige Samen gewonnen werden, deren Sämlinge jedoch pilz- und alkaloidführend waren. Erst die Sämlinge aus Samen der 1. Stecklingsgeneration waren pilz- und alkaloidfrei.

3.1.3 Versuche zur Pilzübertragung und Pilzetablierung

Die Experimente wurden im Juni 2004 und 2005 mit 3 Monate alten Stecklingspflanzen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* begonnen. Es wurden pilz-/alkaloidfreie und pilz-/alkaloidführende Pflanzen eingesetzt. Die Anzucht pilz- und alkaloidfreier Pflanzen erfolgte aus der 2. bzw. 3. Stecklingsgeneration behandelter Pflanzen (vgl. 3.1.2).

3.1.3.1 „Attachment-Versuche“

Es wurden jeweils eine pilz-/alkaloidfreie und eine pilz-/alkaloidführende Pflanze in einem abgeschlossenen Raum aus Acrylglas zusammengestellt (s. Abb. 4.15). Die beiden Pflanzen wurden so miteinander verschlungen, dass die Blattoberflächen in engem Kontakt standen. Von beiden Pflanzenarten (*Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*) wurden je 4 solcher Pflanzenpaare im Gewächshaus aufgestellt. Die Inkubationszeit betrug, an den Fungizidversuch angepasst (vgl. 3.1.1), 18 Wochen.

3.1.3.2 Pfropfversuche

Entsprechend der gärtnerischen Praxis wurden je eine pilz-/alkaloidfreie und eine pilz-/alkaloidführende Pflanze durch Pfropfung zum Verwachsen gebracht (s. Abb. 4.20). Es wurden einerseits pilz-/alkaloidfreie Pflanzen als sog. Reiser auf pilz-/alkaloidführende Unterlagen gepfropft und andererseits pilz-/alkaloidführende Reiser auf pilz-/alkaloidfreie Unterlagen (s. Abb. 4.21). Von beiden Pflanzenarten (*Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*) wurden je 4 solcher Pflanzenpaare im Gewächshaus aufgestellt. Die Inkubationszeit nach dem Verwachsen der Pflanzen betrug, an den Fungizidversuch angepasst (vgl. 3.1.1), 18 Wochen.

3.1.3.3 Inokulationsversuche

Pilz-/alkaloidfreie Pflanzen wurden künstlich mit diversen Pilzen infiziert. Die Pilze waren teils eigene Isolate (vgl. Tab. 2.11) und teils Pilze aus externen Quellen (vgl. Tab. 2.12). Da die Pilzisolate aus *Ipomoea asarifolia* stammten, wurden die Inokulationen ausschließlich mit dieser Pflanzenart durchgeführt.

Die als Dauerkulturen konservierten Pilze (vgl. 3.3.1) wurden auf Wachstumsmedium (vgl. Tab. 2.6) angezogen. Zur Inokulation von 10 Blättern einer Pflanze wurden je Pilz 200 mg gewachsenes Mycel in 3 ml Wasser suspendiert und in folgenden Kombinationen in die Blattlamina injiziert bzw. auf diese aufgebracht:

Pflanze 1: Iasa-F09

Pflanze 2: Iasa-F03, Iasa-F06, Iasa-F08, Iasa-F09, Iasa-F10, Iasa-F12

Pflanze 3: Iasa-F03, Iasa-F08, Iasa-F10, Iasa-F12

Pflanze 4: Iasa-F06, Iasa-F08, Iasa-F09, Iasa-F10

Pflanze 5: Iasa-F06, Iasa-F08, Iasa-F09, Iasa-F12

Pflanze 6: *Balansia obtecta*

Pflanze 7: *Claviceps purpurea*

Die Inkubationszeit betrug, an den Fungizidversuch angepasst (vgl. 3.1.1), 18 Wochen.

Das Pilzmycel von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 (vgl. 2.3.2) wurde unmittelbar vor der Inokulation aus den Blattknospen der beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* abgeschabt (vgl. 3.3.2). Zur Inokulation von 10 Blättern einer Pflanze wurden 200 mg abgeschabtes Mycel (ca. 5 g Blattknospen) in 3 ml Wasser suspendiert und in die Blattlamina injiziert bzw. auf diese aufgebracht. Von beiden Pflanzenarten wurden je 4 pilz-/alkaloidfreie Pflanzen künstlich infiziert. Die Inkubationszeit betrug, an den Fungizidversuch angepasst (vgl. 3.1.1), 18 Wochen.

3.1.4 Versuche zum Einfluss von pflanzlichen Wachstumsfaktoren auf Alkaloidbildung und Pilzentwicklung

Die Experimente wurden im Juni 2005 mit 3 Monate alten Stecklingspflanzen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* begonnen. Es wurden ausschließlich pilz- und alkaloidführende Pflanzen eingesetzt.

3.1.4.1 Veränderung des Lichtangebots

Je 4 pilz-/alkaloidführende Pflanzen der beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* wurden im Gewächshaus aufgestellt und mit Polyesternetzen dauerhaft schattiert. Weitere 4 Pflanzen beider Arten wurden im Tageslicht des gleichen Gewächshauses aufgestellt. Die Inkubationszeit betrug, an den Fungizidversuch angepasst (vgl. 3.1.1), 18 Wochen.

Zur Messung der Lichtintensität stand ein Luxmeter (LM 300, ELV AG, Leer) zur Verfügung. Es wurde in 10, 30 und 40 cm Wuchshöhe der Pflanzen gemessen. In Tabelle 3.1 sind die durchschnittlichen Messwerte aufgeführt.

Tabelle 3.1 Lichtintensität (Lux) im Gewächshaus unter verschiedenen Bedingungen

Zeitpunkt der Messung	Wetter des Tages	Ø Messwert im Tageslicht (Lux)	Ø Messwert im Schatten (Lux)
18. Juli 2005 / 14.00 Uhr	sonnig	31.300	4300
04. September 2005 / 14.00 Uhr	diesig	13.000	1600

Ø = Durchschnitt aus Messungen in 10, 30 und 40 cm Wuchshöhe der Pflanzen

3.1.4.2 Veränderung des Nährstoffangebots

Die Pflanzen wurden in unterschiedlicher Intensität mit dem Langzeitdünger Plantosan® (vgl. 2.1.3) versorgt.

Je 4 pilz-/alkaloidführende Pflanzen der beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* wurden bei Versuchsbeginn mit 2 g Plantosan® pro Topf (1 g/l Substrat) gedüngt. Anschließend wurden sie 2mal alle 8 Wochen ohne zusätzliche Düngung umgetopft. Weitere 4 Pflanzen beider Arten wurden ebenfalls bei Versuchsbeginn mit 2 g Plantosan® pro Topf (1 g/l Substrat) gedüngt. Zusätzlich wurden sie 2mal alle 8 Wochen beim Umtopfen mit 3,5 g Plantosan® pro Topf (1,5 g/l Substrat) gedüngt (vgl. Tab. 3.2). Die Pflanzen wurden im Gewächshaus aufgestellt. Die Inkubationszeit betrug, an den Fungizidversuch angepasst (vgl. 3.1.1), 18 Wochen.

Tabelle 3.2 Düngung mit Plantosan®

<i>Ipomoea asarifolia</i> und <i>Turbina corymbosa</i> (je 4 Pflanzen / Gruppe)	Düngung (g / l Substrat)		
	beim Eintopfen	beim Umtopfen (alle 8 Wochen)	
1. Gruppe	1,0	0	0
2. Gruppe	1,0	1,5	1,5

Anmerkung: Laut Herstellerempfehlung (vgl. 8.2) sollen Kulturen mit mittlerem Nährstoffbedarf 1mal bei Anzuchtbeginn mit 1 g Plantosan / l Substrat gedüngt werden.

3.1.5 Anzucht von Pflanzen in einer Klimakammer

Ein Teil der 2003 von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* geernteten Samen wurden im März 2004 in einer Klimakammer (vgl. 2.4.5) ausgesät. Im Oktober 2004 wurden käuflich erworbene Samen von *Turbina corymbosa* (vgl. 2.3.1) in der gleichen Klimakammer ausgesät. Die angezogenen Pflanzen wurden jeweils nach 4 Monaten geerntet und untersucht.

3.1.6 Anzucht von sterilen Sämlingen und Stecklingen

Ein Teil der 2003 bzw. 2004 von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* geernteten Samen wurden sterilisiert und zwischen 2003 und 2005 auf sterilem Mineralsalzmedium ausgesät. Die sterilen Samenpflanzen wurden steril durch Stecklinge weitervermehrt. Die Arbeiten wurden an einer Querstrombank (vgl. 2.4.3) durchgeführt, alle Materialien und Geräte mussten steril sein (vgl. 2.4.2). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einem Kulturraum (vgl. 2.4.4), teilweise in weißem Dauerlicht (\emptyset 1960 Lux) und teilweise in rot-blauem Dauerlicht (\emptyset 2670 Lux) bei einer gleichbleibenden Temperatur von 25 °C.

Sterilisation der Samen und Anzucht der Sämlinge und Stecklinge werden im Folgenden beschrieben:

Sterilisation der Samen:

Die Samen wurden 5 min in Ethanol (96 %) getaucht, um eine bessere Benetzbarkeit der Oberfläche zu erreichen. Dann wurden die Samen 5 min in wässrige Tensidlösung (10 % Pril gelöst in autoklaviertem Wasser) gegeben. Mittels Magnetrührer (Gerhardt, Auer Bittmann Soulite AG, Zürich, Schweiz) wurden die aufgeweichten Samen anschließend auf geringster Stufe 15 min in Natriumhypochlorid (6 bis 14 % aktives Chlor) vorsichtig bewegt. Nach der Sterilisation wurden die Samen in drei aufeinander folgenden Waschschritten mit autoklaviertem Wasser gespült. Jeder Waschschrift dauerte 3 – 5 min und erfolgte ebenfalls unter vorsichtigem Rühren.

Aussaat und Anzucht der Sämlinge und Vermehrung durch Stecklinge:

Es wurden jeweils 3 – 5 sterilisierte Samen auf 50 ml MS/2-Festmedium (vgl. 2.2.2.2) in 300 ml–Erlenmeyerkolben gesät. Verpilzte Aussaaten wurden aussortiert. Für weitere Arbeiten wurden nur keimfreie Kulturen verwendet. Diese wurden nach 6 – 8 Wochen einzeln auf 500 ml MS/2- Festmedium in 2000 ml–Erlenmeyerkolben umgepflanzt.

Nach weiteren 4 – 6 Wochen wurden die Endtriebe der Pflanzen entnommen und als Stecklinge auf 100 ml MS/2-Festmedium in 500 ml–Erlenmeyerkolben bewurzelt und angezogen.

3.2 Arbeiten mit pflanzlichen Zellkulturen

Die zellbiologischen Arbeiten wurden an einer Querstrombank (vgl. 2.4.3) durchgeführt, alle Materialien und Geräte mussten steril sein (vgl. 2.4.2).

3.2.1 Anlage von pflanzlichen Zellkulturen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* Kallus- und Suspensionskulturen angelegt. Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte in einem Kulturraum (vgl. 2.4.4) in weißem Dauerlicht (\varnothing 1960 Lux) bei einer gleichbleibenden Temperatur von 25 °C.

Um eine neue Zellkultur zu etablieren, wurde der für die Zellkultur vorgesehene Teil der Pflanze (Blatt- oder Stängelstück) zunächst mit Wasser von oberflächlich anhaftenden Verunreinigungen befreit. Anschließend erfolgte 15 min eine Desinfektion mit wässriger Quecksilberchloridlösung (0,1 % gelöst in autoklaviertem Wasser). Das anhaftende Quecksilberchlorid wurde durch dreimaliges Waschen mit autoklaviertem Wasser entfernt. Die desinfizierten Pflanzenteile wurden auf Petrischalen mit LS-Festmedium (vgl. Tab. 2.9) aufgebracht und angedrückt. Es folgte das Anritzen des Pflanzenteils an verschiedenen Stellen mit einem sterilen Skalpell.

Die Pflanzenteile wurden auf dem ersten Medium solange belassen, bis sich Kalluswachstum zeigte. Die Zellen wurden auf frisches Medium überimpft, wenn durch das Wachstum eine Verdopplung der Zellmasse eingetreten war (etwa alle 10 bis 15

Tage). Von Kalluskulturen konnten Teile in flüssiges Medium überführt werden. Durch Kultivierung auf einem Inkubationsschüttler (HT Infors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit 100 rpm konnten aus den Kalluskulturen Suspensionskulturen generiert werden.

3.2.2 Regeneration von Pflanzen aus Kalluskulturen

Zur Regeneration steriler Pflanzen wurde auf steriles Pflanzenmaterial zurückgegriffen (vgl. 3.1.6). Die Anzucht erfolgte in einem Kulturraum (vgl. 2.4.4) teilweise in weißem Dauerlicht (Ø 1960 Lux) und teilweise in rot-blauem Dauerlicht (Ø 2670 Lux) bei einer gleichbleibenden Temperatur von 25 °C. Die Methode wurde während eines zweiwöchigen Aufenthaltes in Warschau im Department of Biology and Pharmaceutical Botany, Medical University Warsaw unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M. Furmanowa erlernt.

Blätter oder Stängelstücke (0,5 bis 1 cm) einer sterilen Pflanze wurden an mehreren Stellen eingeritzt, auf 30 ml Festmedium (vgl. Tab. 2.8) in 100 ml–Erlenmeyerkolben aufgebracht und leicht angedrückt. Das Ziel war die Bildung eines differenzierten Kallus nach etwa 4 Wochen.

Der entstandene Kallus wurde auf 30 ml Flüssigmedium (vgl. Tab. 2.8) in 100 ml–Erlenmeyerkolben überimpft und auf einem Inkubationsschüttler (HT Infors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit 50 rpm geschüttelt. Das Ziel war die Bildung von Adventivknospen und anschließend von vollständigen Pflanzen nach etwa 3 Wochen. Die Triebe wurden von dem Gewebe abgeschnitten und in MS/2-Festmedium (vgl. 2.2.2.2) überführt, in welchem sie nach etwa 2 Wochen Wurzeln entwickelten. Die weitere Anzucht der Pflanzen erfolgte auf 100 ml MS/2-Festmedium in 500 ml–Erlenmeyerkolben.

3.3 Arbeiten mit Mikroorganismen

Die Isolierung von Pilzen erfolgte an einer Querstrombank (vgl. 2.4.3), alle Materialien und Geräte mussten steril sein (vgl. 2.4.2).

3.3.1 Isolierung und Anzucht von Endophyten

Aus *Ipomoea asarifolia* wurden zahlreiche Pilze isoliert. Die Pilze galten aufgrund der Isolierungsmethode als Endophyten (Petrini et al. 1992).

Zur Isolierung von endophytischen Pilzen aus Blättern und Stängeln wurde vorab die Oberfläche der Pflanzenteile sterilisiert. Dies konnte auf chemischem Wege geschehen:

2-3 Pflanzenteile wurden unter fließendem Leitungswasser gut gereinigt und 30 s in Ethanol (96 %) getaucht. Dies diente der besseren Benetzbarkeit der Oberfläche. Dann wurden die Pflanzenteile 4 min in Natriumhypochlorid (6 bis 14 % aktives Chlor) gereinigt. Anschließend wurden die Pflanzenteile in drei Waschschritten mit autoklaviertem Wasser gespült.

Nach dem letzten Waschgang wurde jeweils ein Pflanzenteil auf autoklaviertem Saugpapier vorsichtig abgetupft und allseitig auf eine Petrischale mit Isolierungsmedium (vgl. Tab. 2.6) gedrückt. Dieser sog. 'Abklatsch' diente als Kontrolle der Oberflächensterilisation. Nach dem Kontrollabklatsch wurde das Pflanzenteil auf eine weitere Petrischale mit Isolierungsmedium gelegt und mit einem sterilisierten Skalpell angeschnitten. Dabei wurde auf eine möglichst große Berührungsfläche von eröffnetem Gewebe und Medium geachtet.

Isolierplatte und 'Abklatschplatte' wurden mit Parafilm verschlossen und gemeinsam bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Platten wurden täglich kontrolliert.

Zur genaueren Beobachtung des Wachstums einiger Pilze wurden diese auf Wachstumsmedium (vgl. Tab. 2.6) überimpft. Dazu wurden etwa 1 cm² große Agarstücke mit Pilzmycel aus dem Isolierungsmedium geschnitten und auf Wachstumsmedium gelegt.

3.3.2 Isolierung und Anzucht von Iasa-F13 und Tcor-F01

Zur Isolierung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 wurden junge Blattknospen von *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* mit desinfizierten Händen (vgl. 2.4.2) vorsichtig geöffnet. Der Pilz wurde mit einem sterilisierten Spatel aus dem Inneren der jungen Blattknospen abgeschabt. Alle Untersuchungen und Experimente wurden mit dem abgeschabten Pilzmyzel vorgenommen. Von 5 g Blattknospen konnten etwa 0,2 bis 0,3 g Mycel gewonnen werden. Die benötigte Mycelmenge war von dem jeweiligen Versuch abhängig.

Zur Anzucht auf diversen Nährmedien (vgl. Tab. 2.6) wurde einerseits das abgeschabte Mycel mittels sterilisiertem Spatel auf die Agarplatten aufgebracht. Andererseits wurden die geöffneten Blattknospen mit der Innenseite vorsichtig auf die Agarplatten gedrückt und anschließend sofort wieder entfernt. Die Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und teilweise bei Raumtemperatur, teilweise bei 25 °C im Trockenschrank (VT 5042 EK/N2, Heraeus, Hanau) aufbewahrt. Die Platten wurden täglich kontrolliert.

3.3.3 Konservierung von Pilzen

Zur Dauerkultivierung von Pilzen wurden mehrere ca. 5 mm² große Mycelstücke aus Wachstumsmedium (vgl. Tab. 2.6) geschnitten. Dabei wurde bevorzugt junges Mycel entnommen. Die Stücke wurden in ein Kryoröhrchen mit 2 ml Kryomedium (vgl. Tab. 2.6) gebracht. Nach etwa 1 Stunde wurden die Kryoröhrchen in eine mit Isopropanol gefüllte Kryobox überführt und bei -80 °C in den Eisschrank gestellt. Das Kryomedium ist ein stark zuckerhaltiges Medium. Bringt man in dieses Medium Pilzmycel, so wird aus diesem interzellulär Wasser herausgezogen. Wasserkristalle können sich nicht mehr interzellulär bilden und damit die Zellen schädigen. Die Verwendung der mit Isopropanol gefüllten Kryobox gewährleistet einen konstanten Temperaturabfall von 1 °C/min. Bei erneuter Anzucht werden die Mycelfragmente wieder auf Wachstumsmedium aufgebracht und können regenerieren. Auf diese Weise konserviert, lassen sich die Pilze bei -80 °C mehrere Jahre aufbewahren.

3.4 Biochemische und analytische Methoden

3.4.1 Extraktion von Ergolinalkaloiden aus Pflanzenmaterial

Zur Extraktion der Alkaloide wurde das Pflanzenmaterial zunächst geerntet. Zeitpunkt der Ernte und Erntemenge waren von dem Versuch und der vorhandenen Menge Pflanzenmaterials abhängig. Die Nachweisgrenze für eine Alkaloidextraktion aus Pflanzenmaterial konnte auf ca. 5 g Pflanzenmaterial festgelegt werden. Geerntete Blätter und Stängel wurden getrennt eingewogen und in Stücke geschnitten. Die geschnittenen Pflanzenteile wurden mit flüssigem Stickstoff (-210 °C) schockgefroren

und mit dem Mörser auf Eis zerkleinert. Das gemörserte Pflanzenmaterial wurde bis zur Extraktion in Frischhaltetüten eingeschweißt und im -80 °C-Schrank verwahrt.

Die Extraktion von Alkaloiden aus biologischem Material beruht auf einem Säure-Base-Zyklus und der dadurch beeinflussten Polarität der Alkaloide. Bei der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methode handelt es sich um ein Festphasenextraktionsverfahren. Die Polarität wird durch eine SiOH-Säule (1,2 x 6,5 cm), d.h. eine unmodifizierte Kieselgelsäule, vorgegeben.

Dazu wurde das Pflanzenmaterial in Weinsäure (1 %) aufgenommen und mit einem Stabmixer (MR 5000 M, 600 W, Braun Küchengeräte) etwa 10 min homogenisiert. Anschließend konnte es in 10 min bei 10000 rpm und einer Kühlung von 5 °C abzentrifugiert werden. Der Weinsäureüberstand wurde mit Ammoniak (25 %) auf pH 8–9 eingestellt und 3mal mit jeweils gleichen Teilen Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Im alkalischen Milieu befinden sich die Alkaloide in der organischen Phase. Der gesammelte Essigsäureethylester wurde über Natriumsulfat getrocknet, bis zur Trockene eingengt und in 30 ml Essigsäureethylester aufgenommen.

Die folgenden Arbeitsschritte sind Bestandteil der Festphasenextraktion:

Konditionieren der Säule:

Die polare SiOH-Säule wurde mit einem Reservoir-Volumen eines unpolaren Lösungsmittels gespült. Zum Konditionieren wird grundsätzlich das gleiche Lösungsmittel gewählt, wie zum Waschen der Säule (s.u.). In diesem Fall wurde die Säule 3mal mit 6 ml Petrolether gespült.

Probenaufgabe:

Der Essigsäureethylesterextrakt (30 ml) wurde in 6 ml-Schritten durch die Säule gegeben. Es wurde darauf geachtet, daß nicht mehr als 5 ml pro min aufgegeben wurden. Die Aufgabemenge konnte mit Hilfe einer Spritze und einem aufgesetzten Adapter reguliert werden.

Waschen der Säule:

Die Probenmatrix sowie eventuelle unpolare Störstoffe z. B. Chlorophyll wurden mit Petrolether (1mal 6 ml) entfernt. Die Alkaloide sind polarer als das Lösungsmittel und werden mit den polaren Sorbentien der Säule gebunden.

Elution:

Mit 1-2 ml Methanol (je nach Pflanzenmenge) wurden die Alkaloide direkt in ein Probengefäß eluiert und standen für die Analytik zur Verfügung.

3.4.2 Extraktion von Ergolinalkaloiden aus Iasa-F13 und Tcor-F01

Zur Extraktion der Alkaloide wurden die Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 (vgl. 2.3.2) zunächst wie unter 3.3.2 beschrieben von den Blättern der Pflanzen abgeschabt. Da für eine Alkaloidextraktion aus Pflanzenmaterial die Nachweisgrenze auf ca. 5 g Pflanzenmaterial festgelegt werden konnte, wurde darauf geachtet, dass das Mycel von mindestens 8 - 10 g Blättern abgeschabt wurde. Das abgeschabte Mycel ($\pm 0,5$ g) wurde mit Sand auf Eis gemörsert und in Weinsäure (1 %) aufgenommen. Nachdem sich der Sand am Boden des Aufnahmegefäßes abgesetzt hatte, wurde die Weinsäure mit dem Mycel vorsichtig dekantiert.

Die Extraktion von Alkaloiden aus den Pilzen erfolgte in Anlehnung an die Extraktion aus Pflanzenmaterial (vgl. 3.4.1). Der Aufschluss der Pilzzellen in Weinsäure erfolgte allerdings mittels gepulstem Ultraschall (Stufe 5, Intensität 50%). Als Gerät diente ein Ultraschall-Desintegrator (Sonifier Typ 250, Branson, Danbury, Connecticut, USA). Während der Ultraschallbehandlung wurde die Zellsuspension ständig in Eiswasser gekühlt, um eine Erwärmung und damit einen enzymatischen Abbau der Inhaltsstoffe zu vermeiden. Die Probenbeschallung erfolgte in zwanzig Zyklen für 15 s. Eine Pause von 15 s zwischen den einzelnen Zyklen sollte ein Erwärmen der Probe verhindern. Auf das Abzentrifugieren der Zellen wurde verzichtet, da diese die Extraktion nicht stören. Die weitere Extraktion verlief analog zu 3.4.1. Um eine vollständige Elution der Alkaloide zu gewährleisten, wurden diese zunächst in 1 ml Methanol eluiert. Aufgrund der geringen Pilzeinwaage wurde das Eluat anschließend getrocknet und zur Konzentrierung der Inhaltsstoffe in 150 μ l Methanol aufgenommen. Die Extrakte standen nun für die Analytik zur Verfügung.

3.4.3 Analyse von Ergolinalkaloiden mittels DC

Bevor eine weitere Analytik erfolgte, wurden die Ergolinalkaloide mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen.

Es wurden jeweils 100 μ l methanolischer Extrakt bzw. 5 μ l Standardlösung (2 mg/ml Methanol) mittels Hamiltonspritze auf 1 cm der Kieselgelplatten F₂₅₄ aufgetragen. Das Fließmittel zur Auftrennung der Alkaloide ist in Tabelle 2.4 aufgeführt. Die Laufstrecke betrug 12 cm, die Laufzeit etwa 70 min.

Zur Detektion der Ergolinalkaloide wurden die Platten zunächst bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ (Fluoreszenzlöschung auf der Platte) und $\lambda = 366 \text{ nm}$ (blaue Eigenfluoreszenz der Ergoline) betrachtet. Anschließend erfolgte ein Besprühen der Platten mit 3 Van Urk – Sprühreagenzien (vgl. Tab. 2.4). Dabei wurde die DC-Platte nach dem 1. Sprühen für 5 min bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet. Anschließend wurden nacheinander das 2. und 3. Reagenz aufgebracht. Die Reagenzlösungen rufen bei Vorhandensein von Ergolinen eine Blaufärbung hervor.

3.4.4 Analyse von Ergolinalkaloiden mittels UV-VIS-Spektroskopie

Die quantitative Bestimmung des Gesamtalkaloidgehalts erfolgte mit dem Zweistrahlphotometer Uvicon 860 der Firma Kontron, München. Die Messungen erfolgten nach der Methode von Van Urk. Diese beruht auf einer Farbreaktion von Indolderivaten mit para-Dimethylaminobenzaldehyd.

Dazu wurden $100 \text{ }\mu\text{l}$ der jeweiligen methanolischen Extrakte mit $900 \text{ }\mu\text{l}$ Wasser auf insgesamt 1 ml verdünnt. Es wurden $0,7 \text{ ml}$ der Verdünnung mit $0,7 \text{ ml}$ Van Urk – Reagenz I (vgl. Tab. 2.4) vermischt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Dann wurde 1 ml der Mischung in eine Einmalküvette pipettiert und die Extinktion bei 590 nm gemessen. Der Wert wurde als E1 notiert. Anschließend wurden exakt $25 \text{ }\mu\text{l}$ Van Urk – Reagenz II (vgl. Tab. 2.4) zugesetzt, sorgfältig gemischt und der Extinktionswert E2 notiert. Aus der Differenz $E2 - E1$ bestimmt sich der Extinktionswert einer Probe. Jede Probe wurde 3mal hintereinander gemessen, aus den 3 Messwerten wurde jeweils der Mittelwert errechnet.

Zur quantitativen Bestimmung des Gesamtalkaloidgehalts wurde mit Ergonovin (Stocklösung: $500 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Methanol) kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte in dem für die Extrakte relevanten Bereich. Dieser konnte zwischen 5 und $50 \text{ }\mu\text{g}$ Ergonovin pro ml festgelegt werden. Dazu wurde das entsprechende Volumen der Stocklösung ($10 - 100 \text{ }\mu\text{l}$) mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Mit der Verdünnung wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Quantifizierung der Ergolinalkaloide erfolgte anhand der Ergonovinkonzentrationen.

3.4.5 Analyse von Ergolinalkaloiden mittels HPLC-MS

Die Identifizierung der Alkaloide erfolgte an der HPLC-Anlage Agilent 1100 series der Firma Agilent (Palo Alto, USA) mit Diodenarray Detektor (275 - 315 nm), gekoppelt an das LC/MS/MS-System API2000 der Firma Applied Biosystem / MDS SCIEX (Ionenquelle Turbo Ion Spray). Zur Auswertung wurde die Software Analyst 1.3 von Applied Biosystem eingesetzt. Die Anlage wurde vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Bonn von Frau Prof. C. Müller zur Verfügung gestellt.

Als stationäre Phase diente eine 125x2 mm², 5 µm Nucleodur[®] C₁₈ Pyramid Säule von Macherey-Nagel. Als mobile Phase dienten Wasser (Fließmittel A) und Methanol (Fließmittel B), jeweils versetzt mit 2mM Ammoniumacetat bei einer Flussrate von 0,25 ml/min in folgendem Gradientenprogramm:

Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	70	30
4	70	30
24	0	100
34	0	100
36	70	30
42	70	30

Es wurden jeweils 20 µl methanolischer Extrakt bzw. 10 µl Standard (2 mg/ml Methanol) injiziert.

3.4.6 Extraktion von Ergosterol

Das quantitative Vorkommen der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 (vgl. 2.3.2) auf den Blättern der beiden Convolvulaceenarten *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* wurde lichtmikroskopisch (vgl. 3.5.1) und biochemisch bestimmt. Zur biochemischen Quantifizierung wurde im Rahmen dieser Arbeit das Verfahren der Ergosterolextraktion nach Schwadorf und Müller (1989) modifiziert und etabliert.

Es wurden 9 g frisch geerntete *Ipomoea*-Blätter bzw. 5 g *Turbina*-Blätter in 37 ml Methanol, 25 ml Ethanol und 5 g Kaliumhydroxid mit einem Stabmixer (600 Watt) etwa 10 min homogenisiert. Um die Zellen der Pilze aufzuschließen, wurde das Homogenat mittels gepulstem Ultraschall (Stufe 5, Intensität 50%), wie unter 3.4.2 beschrieben, weiterbehandelt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 80 °C für 30 min im Rückfluss verseift. Nach dem Abkühlen konnte das Pflanzenmaterial in 5 min bei 10000 rpm und einer Kühlung von 5 °C abzentrifugiert werden. Der

Lösungsmittelüberstand wurde 2mal mit je 25 ml Petrolether ausgeschüttelt. Die vereinigten Petroletherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, bis zur Trockene eingengt und in 500 µl Methanol aufgenommen. Vor der HPLC-Messung (vgl. 3.4.7) musste der Extrakt mittels Membranfilter (Ø 13 cm, 0,2 µm) von lipophilen Ablagerungen befreit werden.

3.4.7 Analyse von Ergosterol mittels HPLC

Die Ergosterolbestimmung und –quantifizierung wurde an einer HPLC-Anlage der Firma Merck Hitachi (Tokio, Japan) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels L-4000 UV Detektor bei einer Wellenlänge von 282 nm und einer Absorptionsempfindlichkeit von 0,05. Der molare Absorptionskoeffizient (ϵ) von Ergosterol beträgt 11900 bei λ (max) = 282 nm.

Zur Auswertung wurde die Software EuroChrom™ 2000 der Firma Knauer (Berlin) eingesetzt. Als stationäre Phase diente eine 250x4 mm², 5 µm Nucleodur® C₁₈ Pyramid Säule von Macherey-Nagel (Düren). Als mobile Phase diente Methanol (isokratisch) bei einer Flussrate von 1 ml/min für eine Dauer von 30 min.

Zur quantitativen Bestimmung von Ergosterol in den Extrakten wurde mit Ergosterolstandard (Stocklösung: 1mg/ml Methanol) kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte in dem für die Extrakte relevanten Bereich. Dieser konnte zwischen 50 und 250 µg Ergosterol pro ml festgelegt werden. Dazu wurde das entsprechende Volumen der Stocklösung (50 – 250 µl) mit Methanol auf 1 ml aufgefüllt.

Es wurden jeweils 20 µl filtrierter methanolischer Extrakt (vgl. 3.4.6) bzw. 20 µl der verdünnten Standardstocklösungen injiziert.

3.4.8 Gewinnung von Ätherischem Öl

Zur Gewinnung von Ätherischem Öl aus Pflanzenmaterial diente, entsprechend der Beschreibung im Europäischen Arzneibuch 1997, die Wasserdampfdestillation mittels Karlsruher Apparatur (vgl. auch Stahl und Schild 1981).

Dazu wurden 100 g frisch geerntete Blätter in kleine Stücke geschnitten und mit 600 ml Wasser in einen Rundkolben gegeben. Der Destillationsaufsatz wurde aufgesetzt und das Kapillarsystem luftblasenfrei mit destilliertem Wasser gefüllt. Zum Auffangen des

Ätherischen Öls wurde 1 ml Hexan vorgelegt. Anschließend wurde die Apparatur mittels Heizpilz auf Stufe 2 beheizt und 3 h destilliert. Nach erfolgter Destillation und dem Abkühlen der Apparatur wurde das Ätherisch Öl-/Hexan-Gemisch wasserfrei abgelassen. Die so gewonnene Lösung konnte nun mittels GC-MS analysiert werden (vgl. 3.4.9).

3.4.9 Analyse von Ätherischem Öl mittels GC-MS

Die Identifizierung der Ätherisch Öl-Komponenten erfolgte mittels Hewlett-Packard HP 5890 Gaschromatograph (Säule 25 m mit Polydimethylsiloxan CPSil-5, Starttemperatur 80 °C, Temperaturprogramm 10 °C/min bis 230 °C, Injektionsvolumen 0,5 µl), gekoppelt mit einem VG Analytical 70-250S Massenspektrometer (Interface-Temperatur 230 °C). Zur Auswertung wurde die Software MassFinder 2.3 von Hochmuth et al. (2002) eingesetzt.

Messungen und Auswertungen wurden im Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. A. König bei Frau Dr. S. Basar durchgeführt.

3.4.10 Inkubationsversuche mit deuterierten Präkursoren der Terpenbiosynthese

Pflanzenteile von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* wurden mit deuterierter Mevalonsäure (MVA-d₂) bzw. deuterierter Deoxyxylulose (DOX-d₂) inkubiert und anschließend der Einbau dieser Substanzen in die Alkaloide überprüft. Zur Kontrolle wurde zudem der Einbau von MVA-d₂ bzw. DOX-d₂ in terpenoide Duftstoffe der Pflanzen untersucht. Die Versuche wurden im Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. Boland durchgeführt. Die markierten Substanzen wurden von den dortigen Mitarbeitern synthetisiert und für die Versuche zur Verfügung gestellt.

3.4.10.1 Inkubation zur Überprüfung des Deuteriumeinbaus in Ergolinalkaloide

Es wurden sowohl Blätter, als auch beblätterte Sprosse (etwa 15 cm) mit beiden Substanzen inkubiert. Da für eine Alkaloidextraktion aus Pflanzenmaterial die

Nachweisgrenze auf ca. 5 g Pflanzenmaterial festgelegt werden konnte, wurde darauf geachtet, dass mindestens 8 g pro Versuch eingesetzt wurden.

Die Pflanzenteile wurden zunächst in 2 ml wässriger MVA-d₂- bzw. DOX-d₂-Lösung (je 2 mg/ml H₂O) inkubiert. Nach Verbrauch der Lösung (in ca. 8 h) wurde reines Wasser nachgefüllt. Die Inkubationszeit betrug insgesamt 48 h (Tag-Nachtphase 10 h : 14 h), um die Aufnahme der Substanzen in den Stoffkreislauf der Pflanzen zu gewährleisten. Als Kontrolle wurden einige Pflanzenteile ausschließlich in Wasser inkubiert. Nach 48 h wurden die Pflanzen geerntet und wie unter 3.4.1 beschrieben extrahiert. Um den Einbau der markierten MVA bzw. DOX in die einzelnen Alkaloide nachprüfen zu können, mussten diese mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (vgl. 3.4.11) isoliert und anschließend mittels GC-MS (vgl. 3.4.12) analysiert werden.

3.4.10.2 Inkubation zur Überprüfung des Deuteriumeinbaus in Duftstoffe

Zur Überprüfung des Einbaus der deuterierten Substanzen in die terpenoiden Duftstoffe wurden die Pflanzen in geschlossenen Exsikkatoren wie unter 3.4.10.1 beschrieben inkubiert (s. Abb. 4.45). Die während dieser Zeit emittierten Duftstoffe wurden mittels des sog. „Closed Loop Stripping“ (CLS) auf einem Aktivkohlefilter (Länge = 6 cm, Ø = 0,5 cm, 1,5 mg Aktivkohle) angereichert. Dazu wälzte eine Miniaturpumpe (12 V-Drehschieberpumpe, Fürgut, Aitrach) den Luftraum in den Exsikkatoren kontinuierlich um. Der Luftstrom wurde dadurch über den Aktivkohlefilter geleitet, so dass die flüchtigen Verbindungen an der Aktivkohle adsorbierten und angereichert wurden. Die Desorption der Duftkomponenten erfolgte durch Eluieren des Filters mit 2x15 µl Dichlormethan. Anschließend wurde dem Eluat 5 µl n-Bromdecan interner Standard (7,2 mM in Dichlormethan) zugesetzt und die Lösung auf 40 µl Gesamtvolumen mit Dichlormethan ergänzt. Die Probe wurde unmittelbar nach dem Eluieren mittels GC-MS vermessen (vgl. 3.4.13).

3.4.11 Isolierung von Ergolinalkaloiden mittels präparativer DC zur Überprüfung des Deuteriumeinbaus

Die Alkaloidfraktionen aus dem unter 3.4.10.1 beschriebenen Inkubationsversuch wurden, um eine vollständige Elution der Alkaloide zu gewährleisten, zunächst in 1 ml Methanol eluiert (vgl. 3.4.1). Zur Konzentrierung der Inhaltsstoffe wurde das Eluat anschließend getrocknet und in 500 µl Methanol aufgenommen.

Die 500 μl methanolischer Extrakt wurden mittels Hamiltonspritze auf 3 cm der Kieselgelplatten F₂₅₄ aufgetragen. Je 5 μl der Standardlösungen (2 mg/ml Methanol) wurden auf je 1 cm aufgetragen. Das Fließmittel zur Auftrennung der Alkaloide ist in Tabelle 2.4 aufgeführt. Die Laufstrecke betrug 12 cm, die Laufzeit etwa 70 min.

Zur Detektion der Ergolinalkaloide wurden die Platten bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ (Fluoreszenzlöschung auf der Platte) und $\lambda = 366 \text{ nm}$ (blaue Eigenfluoreszenz der Ergoline) betrachtet. Die Alkaloide des Extraktes konnten mit den Standards verglichen und identifizierte Alkaloide vorsichtig mit dem Bleistift markiert werden. Anschließend wurden die Platten im Dunkeln 2 h getrocknet. Die markierten Substanzen konnten nun mit einem dünnen Spatel von der Kieselgelplatte abgeschabt und das so gewonnene Kieselgel mit den Einzelalkaloiden in jeweils 500 μl Methanol aufgenommen werden. Das Kieselgel wurde in 2 min bei 10000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette in ein neues Gefäß überführt.

Die Reinheit der Alkaloidfraktionen konnte mittels λ -Scan am Zweistrahlphotometer Uvicon 860 der Firma Kontron überprüft werden. Dazu wurden die Absorptionsspektren der Standards mit denen der Isolate verglichen.

Abschließend wurden Proben und Standards getrocknet und nach Zugabe von 50 μl MSTFA 2 h bei 60 °C silyliert. Die Standards wurden 1 : 10 und die Proben 2 : 5 mit Dichlormethan verdünnt und standen nun für die Analyse mittels GC-MS zur Verfügung (vgl. 3.4.12).

3.4.12 Überprüfung des Deuteriumeinbaus in Ergolinalkaloide mittels GC-MS

Nach Isolierung und Aufbereitung der Alkaloidproben aus dem Inkubationsversuch (vgl. 3.4.11) wurde der Einbau deuterierter MVA bzw. DOX überprüft.

Die Analyse erfolgte mittels Finnigan Gaschromatograph (Säule Alltech EC™-5, 15 m, Starttemperatur 120 °C, Temperaturprogramm 10 °C/min bis 280 °C, Injektionsvolumen 1 μl) gekoppelt mit dem Finnigan GCQ Massenspektrometer (Interface-Temperatur 250 °C). Zur Auswertung wurde die Software Finnigan Xcalibur™ 1.2 der Firma Thermoquest eingesetzt.

Messungen und Auswertungen wurden im Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Boland durchgeführt.

3.4.13 Überprüfung des Deuteriumeinbaus in Duftstoffe mittels GC-MS

Nach Elution der Duftstoffproben aus dem Inkubationsversuch (vgl. 3.4.10.2) wurde der Einbau deuterierter MVA bzw. DOX überprüft.

Die Analyse erfolgte mittels Finnigan Gaschromatograph (Säule Alltech EC™-5, 15 m, Starttemperatur 40 °C, Temperaturprogramm 10 °C/min bis 200 °C und 30 °C/min bis 280 °C, Injektionsvolumen 1 µl) gekoppelt mit dem Finnigan GCQ Massenspektrometer (Interface-Temperatur 250 °C). Zur Auswertung wurde die Software Finnigan Xcalibur™ 1.2 eingesetzt.

Messungen und Auswertungen wurden im Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Boland durchgeführt.

3.4.14 Inkubationsversuche mit ¹⁴C-Tryptophan

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden unter Beachtung der Vorschriften für radioaktives Arbeiten in einem Isotopenlabor durchgeführt.

Es wurde sowohl Pflanzenmaterial von *Ipomoea asarifolia* als auch Mycel des Pilzes Iasa-F13 (vgl. 2.3.2) mit ¹⁴C-Tryptophan inkubiert.

3.4.14.1 Inkubation von *Ipomoea asarifolia* mit ¹⁴C-Tryptophan

Da für eine Alkaloidextraktion aus Pflanzenmaterial die Nachweisgrenze auf ca. 5 g festgelegt werden konnte, wurden 9 g der Pflanze *Ipomoea asarifolia* pro Versuch eingesetzt. Es wurden je 9 g Blätter pilz-/alkaloidfreier (vgl. 3.1.2) und pilz-/alkaloidführender Pflanzen inkubiert. Zudem wurden 9 g Blätter pilz-/alkaloidführender Pflanzen mit Ultraschall behandelt (vgl. 3.4.14.2) und ebenfalls inkubiert. Die Pflanzenteile wurden zunächst in 4 ml wässriger ¹⁴C-Tryptophan-Lösung (je 10 µCi in 4 ml H₂O) inkubiert. Nach Verbrauch der Lösung (in ca. 9 h) wurde reines Wasser nachgefüllt. Der Wasserverbrauch unter dem Luftstrom des Abzuges wurde in einem Vorversuch getestet, um eine zügige Aufnahme der radioaktiven Verbindung zu gewährleisten. Die Inkubationszeit betrug, in Anlehnung an den unter 3.4.10 beschriebenen Versuch, insgesamt 48 h. Als Kontrolle wurden einige Pflanzenteile ausschließlich in Wasser inkubiert. Nach 48 h wurden die Pflanzen geerntet und wie unter 3.4.1 beschrieben extrahiert. Der Gesamtalkaloidextrakt konnte mittels Radio-HPLC und MS analysiert werden (vgl. 3.4.15).

3.4.14.2 Ultraschallbehandlung von Blättern

Für einen der oben genannten Versuchsansätze wurden alkaloidhaltige, aber weitgehend pilzfreie Blätter benötigt. Zu diesem Zweck wurden 9 g Blattmaterial in 200 ml Wasser 8 min lang in einem Ultraschallbad behandelt. Die Dauer der Ultraschallbehandlung wurde in mehreren Vorversuchen getestet. Dabei war darauf zu achten, dass sich bei möglichst geringer Blattschädigung möglichst viel Pilzmycel ablöst. Die quantitative Ablösung des Pilzmycels konnte mittels Lichtmikroskop (vgl. 3.5.1) nachgewiesen werden. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Blätter kurz getrocknet und anschließend, wie oben beschrieben, inkubiert.

Mit Ultraschall behandelte Blätter fanden in verschiedenen Experimenten Verwendung (vgl. 4.3.2.2, 4.8.1 und 4.8.3).

3.4.14.3 Inkubation von Iasa-F13 mit ^{14}C -Tryptophan

Von 9 g Blattmaterial der Pflanze *Ipomoea asarifolia* wurden 0,5 g Pilzmycel, wie unter 3.3.2 beschrieben, isoliert. Anschließend wurde das Pilzmycel in 1 ml MS-Flüssigmedium (vgl. Tab. 2.7) aufgenommen und mit 10 μCi ^{14}C -Tryptophan versetzt. Da sich MS-Salzlösung in Pilzmedien bewährt hat, wurde sie statt Wasser für diesen Versuch gewählt. Die Inkubationszeit betrug wie bei dem Blattmaterial 48 h. In dieser Zeit musste keine MS-Salzlösung nachgefüllt werden. Nach 48 h wurde das Mycel in 2 min bei 10000 rpm abzentrifugiert und, wie unter 3.4.2 beschrieben, extrahiert. Der Gesamtalkaloideextrakt konnte mittels Radio-HPLC und MS analysiert werden (vgl. 3.4.15). Der Überstand (etwa 150 μl MS-Lösung) wurde zur Überprüfung des radioaktiven Rückstandes verwahrt.

3.4.15 Überprüfung des Einbaus von ^{14}C -Tryptophan in Ergolinalkaloide mittels Radio-HPLC und MS

Die Überprüfung des ^{14}C -Tryptophan-Einbaus in die Alkaloide der Inkubationsversuche (vgl. 3.4.14) sowie die Identifizierung der Alkaloide erfolgte mittels Thermo-Finnigan Surveyor HPLC-System mit Diodenarray Detektor (275 - 315 nm), gekoppelt mit dem Thermo-Finnigan Massenspektrometer TSQ Quantum Ultra AM (APCI-Ionenquelle, positiver Modus). Zur Auswertung wurde die Software Finnigan Xcalibur™ 1.4 der Firma Thermoquest eingesetzt.

Als stationäre Phase diente eine 150x2 mm² Synergi Fusion Säule von Phenomenex. Als mobile Phase dienten Wasser + 10mM Ammoniumacetat (Fließmittel A) und Acetonitril (Fließmittel B) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min in folgendem Gradientenprogramm:

Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	70	30
4	70	30
20	0	100
30	0	100
31	70	30
37	70	30

Es wurden jeweils 20 µl methanolischer Extrakt bzw. 10 µl Standard (2 mg/ml Methanol) injiziert.

Messungen und Auswertungen wurden im Institut für Umweltforschung (Infu) der Universität Dortmund unter Leitung von Herrn Dr. M. Lamshöft durchgeführt.

3.5 Mikroskopische Methoden

3.5.1 Untersuchungen mittels Lichtmikroskop

Das Vorkommen der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 (vgl. 2.3.2) auf den Blättern der beiden Convolvulaceenarten *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* wurde lichtmikroskopisch bestimmt.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Leitz DMRB Fotomikroskop der Firma Leica (Bensheim), ausgerüstet für Normarski Interferenz und Epifluoreszenz, im Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Bereich Phytomedizin der Universität Bonn unter der Leitung von Privatdozentin Frau Dr. U. Steiner durchgeführt.

Es wurden verschiedene Färbeverfahren, insbesondere Fluoreszenzanfärbungen, angewandt. Die Untersuchung der pflanzlichen Drüschuppen erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nil rot (1 µl/l, Sigma, Deisenhofen) (Filterkombination 490/15, 500, BP 525/20 nach Broun und Somerville 2001). Pilzhypen konnten sowohl mit Anilin blau-Lösung (Anilin blau 0,05 %, Merck KGaA, Darmstadt; Lösung vgl. Tab. 2.3) (Filterkombination BP 340-380, 400, LP 425 nach Ortega et al. 1998) sichtbar gemacht

werden, als auch mit Oregon grün-markiertem Wheat Germ Agglutinin (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) (Filterkombination 490/15, 500, BP 525/20 nach Werner et al. 2002) und mit Calcofluor (10 µg/ml, Sigma, Deisenhofen) (Filterkombination BP 340-380, 400, LP 425). Das Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz hat die Farbstoffe zur Verfügung gestellt.

Vor der Fluoreszenzanfärbung mit Anilin blau wurden die Blätter 4 bis 7 Tage in Chloralhydratlösung (vgl. Tab. 2.3) gelegt, um das Chlorophyll zu entfernen. Dann wurden sie kurz in Kaliumphosphatpuffer (vgl. Tab. 2.3) getaucht, anschließend 2 h in Kaliumhydroxid (1 N) gelegt und erneut kurz in den Puffer getaucht. Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die Blattstücke 1 h in Anilinblau-Lösung (vgl. Tab. 2.3) angefärbt. Nach der Färbung wurde mit Kaliumphosphatpuffer (vgl. Tab. 2.3) abgespült. Anilin blau bindet aufgrund des eingestellten pH spezifisch an das Chitin der Pilzhypen und fluoresziert bei Anregung mit o.g. Wellenlänge grün.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit Wheat Germ Agglutinin (WGA) und Calcofluor war keine Vorbehandlung nötig. WGA ist ein Lectin, welches, wie Anilin blau, spezifisch an Chitin bindet. Es muss mit einem Fluoreszenzmarker (hier Oregon grün) gekoppelt sein. WGA + Oregon grün-Marker fluoreszieren bei der Anregung mit o.g. Wellenlänge grün. Calcofluor ist weniger spezifisch, da es außer Chitin auch andere Polysaccharide mit β -glykosidischer Verknüpfung bindet. Es fluoresziert bei Anregung mit o.g. Wellenlänge blau.

Vor der Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot war es sinnvoll, die Blätter einige Tage in Chloralhydratlösung (vgl. Tab. 2.3) zu legen, da das rot fluoreszierende Chlorophyll störte. Nil rot fluoresziert in lipophiler Umgebung bei der Anregung mit o.g. Wellenlänge rot und macht insbesondere die sezernierenden Drüsenschuppen sichtbar.

3.5.1.1 Bestimmung des quantitativen Vorkommens von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 mittels Lichtmikroskop

Für die Bestimmung des quantitativen Vorkommens von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 wurden von jeder zu untersuchenden Pflanzengruppe 10 gleichgroße Blattstücke (\emptyset 0,5 cm) ausgestochen. Die Blattstücke wurden zur Quantifizierung mit Calcofluor (siehe oben) gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

Da der Pilz überwiegend an den pflanzlichen Drüschuppen vorkommt, wurden je Blattstück 50 Drüschuppen eines willkürlich festgelegten Bereiches ausgezählt und der Anteil der Drüsen mit und ohne Pilzmyzel notiert.

3.5.2 Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die Oberflächenstrukturen von Blättern und Pilzhyphen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop XL 30 SFEG der Firma Philips (Eindhoven, Niederlande), ausgestattet mit einem Sekundärelektronendetektor, im Institut für Zellbiologie der Universität Bonn unter der Leitung von Hochschuldozent Herrn Dr. G. Kirfel untersucht.

Zur Präparation wurden etwa 0,5 cm² große Blattstücke 24 h mit Karnovskylösung (vgl. Tab. 2.3) (Karnovsky 1965) fixiert. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 min in 10, 30, 50, 70, 90 % Ethanol und 2x15 min in 100 % Ethanol auf Molekularsieb) entwässert. Es folgte die Trocknung der Proben mittels Kritisch-Punkt-Trocknung (CPD) in einer Balzers CPD 030 der Firma BAL-TEC (Schalksmühlen). Dabei wurden die Proben in Anlehnung an Svitkina et al. (1984) 8 x 2 min mit flüssigem Kohlendioxid geflutet. Die getrockneten Proben wurden auf Aluminiumhalter aufgeklebt und in dem Sputter Coater HR 208 der Firma Cressington mit 2 nm Platin/Palladium beschichtet. Die beschichteten Präparate konnten bis zur Verwendung im REM in einem Exsikkator aufbewahrt werden.

Die Probenpräparation wurde im Institut für Zellbiologie der Universität Bonn unter der Leitung von Hochschuldozent Herrn Dr. G. Kirfel durchgeführt.

3.5.3 Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Das Vorkommen von Pilzhyphen im Gewebe der Blätter wurde mit dem Transmissionselektronenmikroskop CM 120 der Firma Philips (Eindhoven, Niederlande), ausgestattet mit einem LaB₆-Filament, im Institut für Zellbiologie der Universität Bonn unter der Leitung von Hochschuldozent Herrn Dr. G. Kirfel untersucht.

Zur Präparation wurden etwa 0,5 cm² große Blattstücke mindestens 2 h mit Karnovskylösung (vgl. Tab. 2.3) (Karnovsky 1965) fixiert. Anschließend wurden die Proben 10mal mit Cacodylatpuffer (vgl. Tab. 2.3) gespült und desweiteren mit Osmiumtetroxidlösung (vgl. Tab. 2.3) fixiert. Osmiumtetroxid erhöht die

Elektronenabsorption und führt zu einem besseren Photokontrast. Das Chrom in der Fixierungslösung erhält die Gewebestrukturen und fixiert auch die Lipide (Plattner 1987).

Die Proben wurden nun bis zu 8mal für je 20 min mit Cacodylatpuffer (vgl. Tab. 2.3) gespült und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 20 min in 30, 50, 70, 90 % Ethanol und 60 min in 96 bzw. 100 % Ethanol) entwässert.

Anschließend wurden die Proben in 100 % Kunstharz bei 70 °C für 8 – 12 h polymerisiert. Es folgten die Ultradünnschnitte (70-75 nm Dicke) am Reichert-Jung Ultramikrotom Ultracut E mit einem Diamantmesser und die Platzierung der Schnitte in Nickelnetzen. Die Netze wurden zur Kontrastierung der Schnitte 8 min in 2 % Uranylacetat und dann 2 min in Bleiacetatlösung (vgl. Tab. 2.3) gelegt. Zwischen den Lösungen und im Anschluss an die Kontrastierung wurde je 2mal mit destilliertem Wasser gespült.

Die Probenpräparation wurde im Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Bereich Phytomedizin der Universität Bonn unter der Leitung von Privatdozentin Frau Dr. U. Steiner, durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Wegweisende Ergebnisse bisheriger Untersuchungen

4.1.1 Fungizidbehandlung von *Ipomoea asarifolia*

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bilden frühere Beobachtungen und Experimente, die in Kucht et al. (2004) publiziert werden konnten. Dabei wurde die Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Vorkommen assoziierter Pilze bei *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) untersucht: Im Rahmen einer Versuchsreihe führte die Behandlung von *Ipomoea asarifolia* mit den zwei Fungiziden Pronto Plus® und Folicur® zur Eliminierung der Alkaloide. Gleichzeitig führte sie zur Beseitigung eines auf den Blattoberflächen unbehandelter Pflanzen lebenden Pilzes.

Die Auftrennung der Ergolinalkaloide mittels Dünnschichtchromatographie (vgl. 3.4.3) ist in Abbildung 4.1 dargestellt (zur Identifizierung der Alkaloide vgl. 4.2.3.1).

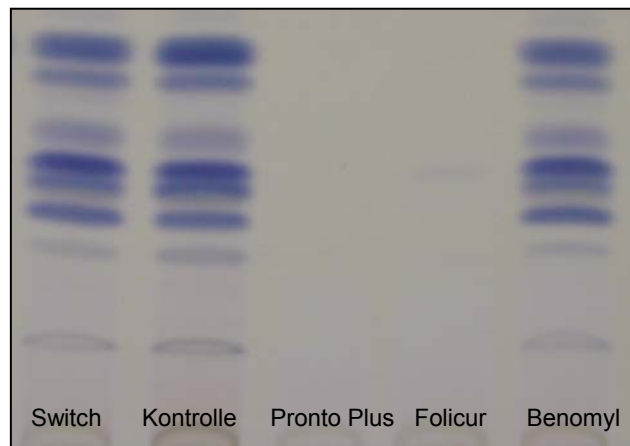


Abbildung 4.1 DC-Chromatogramm der Ergolinalkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia* nach Fungizidbehandlung. Die Extrakte wurden in gleichen Mengen aufgetragen. Die Behandlung der Pflanzen mit Pronto Plus bzw. Folicur führte zur Eliminierung der Alkaloide.

Zusätzlich erfolgte die quantitative Bestimmung des Gesamtalkaloidgehalts photometrisch (vgl. Tab. 4.1), hier wurde mit Ergonovin kalibriert (vgl. 3.4.4).

Tabelle 4.1 *Quantitative Untersuchung der Ergolinalkaloide von Ipomoea asarifolia nach Fungizidbehandlung. Der Gesamtalkaloidgehalt wurde photometrisch als Ergonovin bestimmt. Die Behandlung der Pflanzen mit Pronto Plus und Folicur führte zur Eliminierung der Alkaloide.*

Alkaloide	Kontrollpflanzen (unbehandelt)	Fungizid behandelte Pflanzen			
		Switch	Benomyl	Folicur	Pronto Plus
µg / g Frischgewicht	6,3	5,3	5,0	0	0
%	100	84	79	0	0

Der epibiontische meist an den Blattdrüsen vorkommende Pilz wurde nach Anfärbung mit diversen Fluoreszenzfarbstoffen (vgl. 3.5.1) lichtmikroskopisch sichtbar gemacht (siehe Abb. 4.2 a-c). Die lipophilen Drüsenschuppen der Pflanzen waren nach Fluoreszenzanfärbung mit Nil rot (vgl. 3.5.1) ebenfalls lichtmikroskopisch deutlich nachweisbar (siehe Abb. 4.2 d).

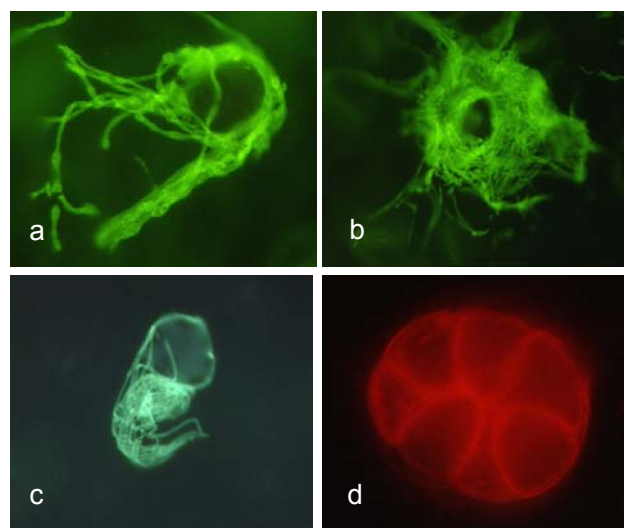


Abbildung 4.2 *a-c: Pilzmycel an den Drüsenschuppen der Blattoberseite unbehandelter Kontrollpflanzen von Ipomoea asarifolia; d: Drüsenschuppe ohne Mycel auf der Blattoberseite von Ipomoea asarifolia. Lichtmikroskopische Aufnahmen (1000fach) nach Fluoreszenzanfärbung mit Oregon grün-markiertem Wheat Germ Agglutinin (a und b); Anilinblau (c) und Nilrot (d).*

4.1.2 Untersuchung des Ätherischen Öls von *Ipomoea asarifolia*

Weitere Untersuchungen haben sich mit dem Vorkommen von Ätherischem Öl in behandelten und unbehandelten Pflanzen beschäftigt.

Das Ätherische Öl wurde durch Wasserdampfdestillation gewonnen (vgl. 3.4.8) und mittels GC-MS analysiert (vgl. 3.4.9). Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

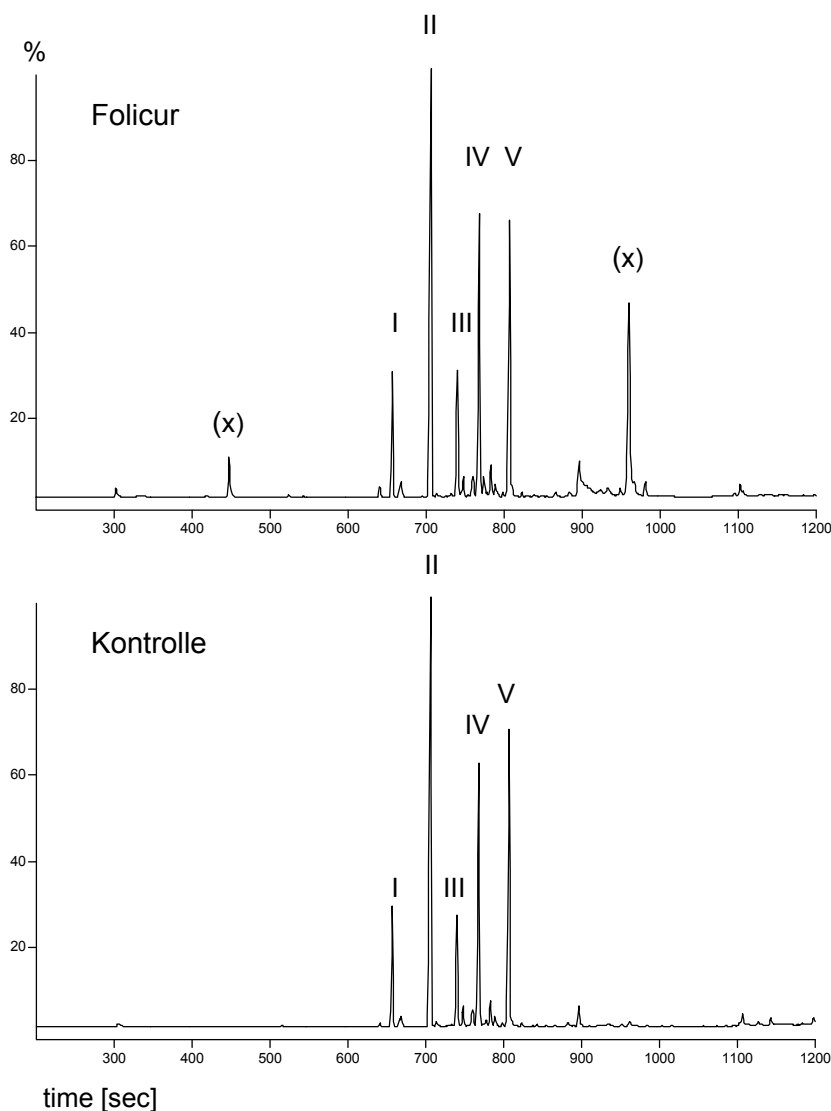


Abbildung 4.3 Gaschromatographie des Ätherischen Öls von *Ipomoea asarifolia*; **oben**: nach Fungizidbehandlung mit Folicur, **unten**: unbehandelt. **(x)**: unbekannte Verbindung, **I**: α -Copaen, **II**: (*E*)- β -Caryophyllen, **III**: α -Humulen, **IV**: Germacren D, **V**: δ -Cadinen

Wie die Abbildung zeigt, wurden im Ätherischen Öl der mit Folicur[®] behandelten Pflanzen zwei unbekannte Komponenten gefunden. Die fünf identifizierten Hauptkomponenten, α -Copaen, (E)- β -Caryophyllen, α -Humulen, Germacren D und δ -Cadinen, konnten jedoch in behandelten und unbehandelten Pflanzen nachgewiesen werden (Massenspektren siehe 8.4). Auch das quantitative Vorkommen der Terpenoide war nahezu identisch. Dies ließ darauf schließen, dass der Einsatz von Folicur[®] nicht generell in den Sekundärstoffwechsel der Pflanzen eingreift. Demnach konnte vermutet werden, dass die Eliminierung der Alkaloide unmittelbar mit der Vernichtung des epibiontischen Pilzes durch die Fungizide korreliert. Alle weiteren Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese Korrelation überprüfen sowie die dahinterstehenden Pflanze-Pilz-Interaktionen aufklären.

4.2 Reproduzierbarkeit der bisherigen Untersuchungen

4.2.1 Wiederholung der Fungizidbehandlung von *Ipomoea asarifolia*

Zunächst musste die Reproduzierbarkeit der unter 4.1 dargestellten Beobachtungen überprüft werden. Dazu wurde der Fungizidversuch wiederholt (vgl. 3.1.1) und erneut das Vorkommen des Blattoberflächenpilzes und der Ergolinalkaloide verglichen.

Im 1. Fungizidversuch wurden die Fungizide vor allem aufgrund ihrer systemischen Wirksamkeit ausgewählt, d.h. aufgrund ihrer Eigenschaft in das Blattgewebe einzudringen (vgl. Tab. 4.2). Zahlreiche Beschreibungen Ergolinalkaloid-bildender endophytischer Pilze in Poaceen (z.B. Clay und Schardl 2002, Tudzynski und Scheffer 2004, Bush et al. 1997), gaben zunächst Anlass zu der Annahme, dass auch in *Ipomoea asarifolia* endophytische - im Gewebe der Pflanzen lebende - Pilze für die Ergolinalkaloidbildung verantwortlich sind.

Tabelle 4.2 Fungizide und ihre Wirkung

Gruppe	Fungizid	Wirkungsspektrum	Wirkungsweise
1	Benomyl[®] (Benzimidazol)	gegen Asco-, Basidio- und Deuteromyceten (Delp 1987)	systemisch; Blockade der Kernteilung (Davidse 1987)
2	Folicur[®] (Triazol)	gegen Asco- und Basidiomyceten, u.a. gegen <i>Fusarium</i> -Arten (Bayer AG)*	systemisch; Inhibierung der Ergosterolbiosynthese (Buchenauer 1987)

3	Pronto Plus [®] (Triazol; Spiroketalamin)	insbesondere gegen 'Echten Mehltau'; sonst wie Folicur [®] (Bayer AG)*	systemisch; Inhibierung der Sterolbiosynthese (National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals 2001)
4	Switch [®] (Pyrimidinamin; Pyrrolnitrin)	gegen Ascomycetenarten, insbesondere gegen <i>Botrytis</i> - und <i>Sclerotinia</i> -Arten (Syngenta Agro GmbH)*	systemisch und protektiv; Verhinderung der Biosynthese von Aminosäuren des Pilzes; Beeinflussung der membranabhängigen Transportprozesse des Pilzes (Syngenta Agro GmbH)*

* Herstellerangaben siehe 8.1

Für den 2. Fungizidversuch war das entscheidende Auswahlkriterium die beobachtete Wirksamkeit gegen den epibiontischen Pilz. Daher fiel die Wahl auf die 3 Fungizide Folicur[®], Pronto Plus[®] und Switch[®] (vgl. Tab. 2.2). Wie unter 4.1.1 dargestellt, führte die Behandlung der Pflanzen mit Folicur[®] und Pronto Plus[®] zur Beseitigung des epibiontischen Pilzes und zur gleichzeitigen Eliminierung der Ergolinalkaloide in den Pflanzen. Die Behandlung mit Switch[®] und Benomy[®] hatte auf Pilz und Alkaloide keinen nennenswerten Effekt. Switch[®] erschien als Vergleichsfungizid interessant, da es sich um ein modernes Fungizid mit neuartigen Wirkstoffgruppen handelt (vgl. 8.1).

Der 2. Fungizidversuch wurde im Juni 2003 mit 3 Monate alten *Ipomoea asarifolia*-Pflanzen begonnen (vgl. 3.1.1). Es wurden 4 Pflanzengruppen gebildet. 3 Gruppen wurden mit jeweils einem der 3 o.g. Fungizide in 2wöchigem Abstand (insgesamt 18 Wochen) gespritzt, eine Gruppe blieb unbehandelt. Alle Pflanzengruppen wurden im Gewächshaus gehalten. Die Intensität der Fungizidbehandlung (vgl. 3.1.1) beruhte auf den im 1. Versuch gemachten Erfahrungen. Das Ziel war die Erhaltung der Pflanzengesundheit bei maximaler Behandlungskapazität. Hierbei war das Einhalten der Höchstmengenverordnung nach dem Bundesgesetzblatt sowie von Wartezeiten nicht relevant, da es sich nicht um pflanzliche Nahrungsmittel handelte.

Nach 18wöchiger Fungizidbehandlung wurden die 3 behandelten Pflanzengruppen sowie die unbehandelten Pflanzen in gleichen Teilen geerntet und extrahiert (vgl. 3.4.1). Der Ergolinalkaloidgehalt wurde mittels DC (vgl. 3.4.3) und UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) nachgewiesen. Desweiteren wurde das Vorkommen des epibiontischen Pilzes lichtmikroskopisch untersucht (vgl. 3.5.1).

Das Ergebnis der Untersuchungen entsprach dem des 1. Fungizidversuchs (vgl. 4.1.1):

Die mit Pronto Plus[®] bzw. Folicur[®] behandelten Pflanzen führten keine Ergolinalkaloide, zudem war bei beiden Pflanzengruppen kein Mycel des epibiontischen Pilzes auffindbar. Die mit Switch[®] behandelten und die unbehandelten Pflanzen führten das gesamte Alkaloidspektrum (vgl. Abb. 4.1) in ähnlicher Konzentration ($\pm 6 \mu\text{g/g}$ Frischgewicht). Das Pilzmycel war bei beiden Pflanzengruppen in gleicher Ausprägung vorhanden. Abbildung 4.4 gibt einen repräsentativen Eindruck von der Myceldichte.

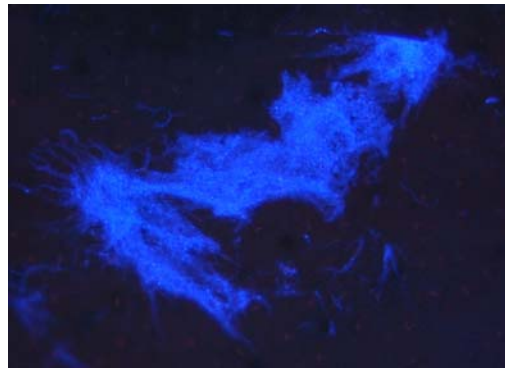


Abbildung 4.4 Pilzmycel auf der Blattoberseite von *Ipomoea asarifolia*; Beispiel für die Myceldichte auf den Blättern unbehandelter Pflanzen sowie mit Switch oder Benomyl behandelte Pflanzen. Lichtmikroskopische Aufnahme (100fach) nach Fluoreszenzanfärbung mit Calcofluor.



Die Bedeutung des Pilzes für die Alkaloidproduktion in *Ipomoea asarifolia* war damit sehr wahrscheinlich. Der Pilz erhielt die Bezeichnung Iasa-F13 (vgl. Tab. 2.11). Zur Bestätigung der Korrelation von Pilz- und Alkaloidvorkommen folgten weitere Untersuchungen.

4.2.2 Anzucht von Stecklingen und Sämlingen pilz-/alkaloidfreier Pflanzen zur Überprüfung der Korrelation von Pilz- und Alkaloidvorkommen bei *Ipomoea asarifolia*

Die durch den Fungizidversuch gewonnenen pilz- und alkaloidfreien Pflanzen (vgl. 4.2.1) wurden sowohl mittels Stecklingsanzucht als auch mittels Samen vermehrt (vgl. 3.1.2). Aus dieser 1. Generation wurde zudem eine 2. Generation Stecklinge und Sämlinge angezogen. Die Anzucht beider Generationen erfolgte ohne weitere Fungizidbehandlung. Der Alkaloidgehalt der Pflanzen wurde regelmäßig photometrisch

(vgl. 3.4.4) und das Pilzvorkommen lichtmikroskopisch (3.5.1) überprüft. Als Kontrolle dienten Stecklinge und Sämlinge unbehandelter pilz- und alkaloidführender Pflanzen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3 Anzucht von Stecklingen und Sämlingen

Stecklinge		Sämlinge	
			
Pronto Plus®/Folicur® 1. Generation	pilz-/alkaloidfrei	Pronto Plus®/Folicur® 1. Generation	pilz-/alkaloidführend
Pronto Plus®/Folicur® 2. Generation	pilz-/alkaloidfrei	Pronto Plus®/Folicur® 2. Generation	pilz-/alkaloidfrei
Kontrolle (unbehandelt)	pilz-/alkaloidführend	Kontrolle (unbehandelt)	pilz-/alkaloidführend

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, waren die Stecklinge der mit Pronto Plus® und Folicur® behandelten Pflanzen (1. Generation) ebenso pilz- und alkaloidfrei, wie die Stecklinge der folgenden Generation. Die Sämlinge aus Samen der mit Pronto Plus® und Folicur® behandelten Pflanzen (1. Generation) waren dagegen pilz- und alkaloidführend. Die Sämlinge der folgenden Generation, d.h. aus Samen der 1. Stecklingsgeneration behandelter Pflanzen, waren pilz- und alkaloidfrei. Stecklinge und Sämlinge unbehandelter Kontrollpflanzen waren zu jeder Zeit pilz- und alkaloidführend.

Die Untersuchung bestätigte einerseits ein weiteres Mal die Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Vorkommen des Pilzes Iasa-F13 (vgl. 4.2.1). Andererseits ergaben sich durch das Vorkommen von Pilz und Alkaloiden in der 1. Sämlingsgeneration behandelter Pflanzen neue Fragen. Die Fungizidbehandlung mit Pronto Plus® und Folicur® schien nur die vegetativen Teile der Pflanzen zu erreichen, nicht aber die generativen Teile, also die Blüten der Pflanzen. Es konnte vermutet werden, dass sich der Pilz Iasa-F13 in den Samen der Pflanzen vermehrt und somit ein Samenendophyt ist. Dies wurde in späteren Experimenten überprüft (vgl. 4.3).

Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen sollten erneut die Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Vorkommen des Pilzes Iasa-F13 bestätigen.

4.2.3 Untersuchung von *Turbina corymbosa* zur experimentellen Bestätigung der bisherigen Befunde

Die Convolvulacee *Turbina corymbosa* ist, genauso wie ihre Verwandte *Ipomoea asarifolia*, eine Ergolinalkaloid-führende Pflanze (vgl. Dissertation J. Groß, 2004). Sie war bereits in den Gewächshäusern des Instituts für Pharmazeutische Biologie etabliert und eignete sich daher ideal als weiteres Experimentalsystem zur Bestätigung der bisherigen Untersuchungen.

4.2.3.1 Vergleich der Alkaloidspektren von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* mittels DC und HPLC-MS

Zur Bestätigung der bisherigen Untersuchungen musste zunächst die Vergleichbarkeit von *I. asarifolia* und *T. corymbosa* untersucht werden. Der erste Schritt war der Vergleich der Alkaloidspektren. Die Pflanzen wurden zu gleichen Teilen (je 14 g Blätter und 14 g Stängel) und zum gleichen Zeitpunkt geerntet und anschließend extrahiert (vgl. 3.4.1). Bevor eine weitere Analytik erfolgte, wurden die Alkaloide mittels DC (vgl. 3.4.3, s. Abb. 4.5) nachgewiesen.

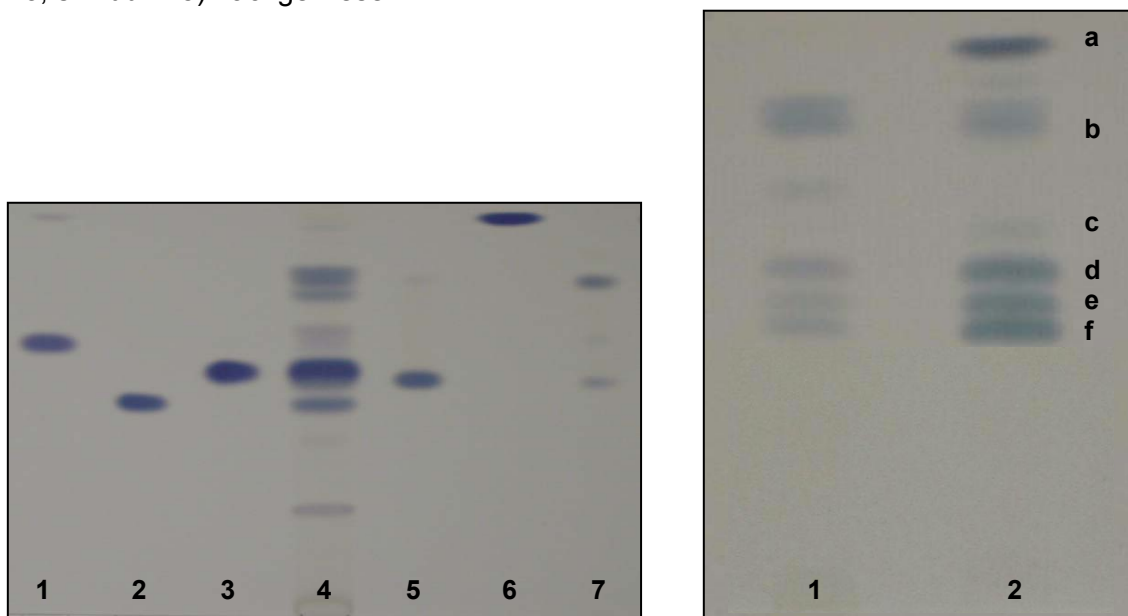


Abbildung 4.5 links: DC-Chromatogramm der Ergolinalkaloide von *I. asarifolia* und Ergolinalkaloid-Standards; 1: Elymoclavin, 2: Ergonovin, 3: Chanoclavin, 4: Pflanzenextrakt, 5: Lysergsäureamid, 6: Agroclavin, 7: Isolysergsäureamid; rechts: DC-Chromatogramm der Ergolinalkaloide von *I. asarifolia* (1) und *T. corymbosa* (2); a: Agroclavin, b: Isolysergsäureamid, c: Elymoclavin, d: Chanoclavin, e: Lysergsäureamid, f: Ergonovin.

Anmerkung: Für die beiden obigen DC-Chromatogramme wurden unterschiedliche Extrakte von *I. asarifolia* verwendet. Beide Extrakte weisen jedoch das gleiche Alkaloidspektrum auf. In dem linken Chromatogramm wird Lysergsäureamid von dem hohen Chanoclavinanteil überdeckt.

Anhand authentischer Vergleichssubstanzen konnten einige Ergolinalkaloide der Pflanzenextrakte identifiziert werden. Wie der Abbildung 4.5 (rechts) zu entnehmen ist, sind die Alkaloidspektren von *T. corymbosa* und *I. asarifolia* ähnlich. Die Alkaloide Lysergsäureamid, Isolysergsäureamid, Chanoclavin und Ergonovin waren in beiden Pflanzenarten mittels Co-Chromatographien nachweisbar. Das Vorkommen von Agroclavin und Elymoclavin schien auf *T. corymbosa* beschränkt zu sein.

Eine wesentlich sichere Analyse konnte mittels HPLC-MS (vgl. 3.4.5) erfolgen. Das Gradientenprogramm wurde zusammen mit Dipl.-Chemiker Dr. M. Lamshöft ausgearbeitet. Der erste Schritt war die Vermessung der vorhandenen Vergleichssubstanzen und die Bestimmung der Molekulargewichte (vgl. Tab. 4.4). Es wurden Chanoclavin, Elymoclavin, Agroclavin, Ergonovin, Lysergsäureamid, Isolysergsäureamid und zusätzlich zur DC-Analyse Lysergsäure α -hydroxyethylamid und Isolysergsäure α -hydroxyethylamid vermessen (Massenspektren siehe 8.3). Anschließend wurden die Absorptionsmaxima der UV-Spektren photometrisch bestimmt. Sie lagen bei allen Alkaloiden zwischen 275 und 315 nm.

Nun wurden die beiden Pflanzenextrakte von *I. asarifolia* und *T. corymbosa* (s. Abb. 4.5 rechts) vermessen und die Alkaloide anhand ihrer UV-Spektren (Diodenarray Detektion zwischen 275 und 315 nm) und ihrer Massenspektren identifiziert.

Tabelle 4.4 Molekulargewichte von Ergolinalkaloiden

Ergolinalkaloide	Molekulargewichte
	[M + H] ⁺
Agroclavin	239
Chanoclavin	257
Elymoclavin	255
Ergonovin	326
Lysergsäureamid	268
Isolysergsäureamid	268
Lysergsäure α -hydroxyethylamid	312
Isolysergsäure α -hydroxyethylamid	312

Das Ergebnis der Analyse entsprach qualitativ weitgehend dem der DC-Untersuchung (s. Abb. 4.6).

Die Alkaloide Lysergsäureamid, Isolysergsäureamid, Chanoclavin und Ergonovin waren in beiden Pflanzenarten zweifelsfrei vorhanden, ebenso die zusätzlich identifizierten Alkaloide Lysergsäure α -hydroxyethylamid und Isolysergsäure α -hydroxyethylamid. Elymoclavin und Agroclavin wurden nur in *T. corymbosa* detektiert. Ergonovin hat die gleiche Retentionszeit wie Agroclavin und war in *T. corymbosa* nur anhand des Massenspektrums erkennbar, nicht mittels HPLC-Chromatogramm.

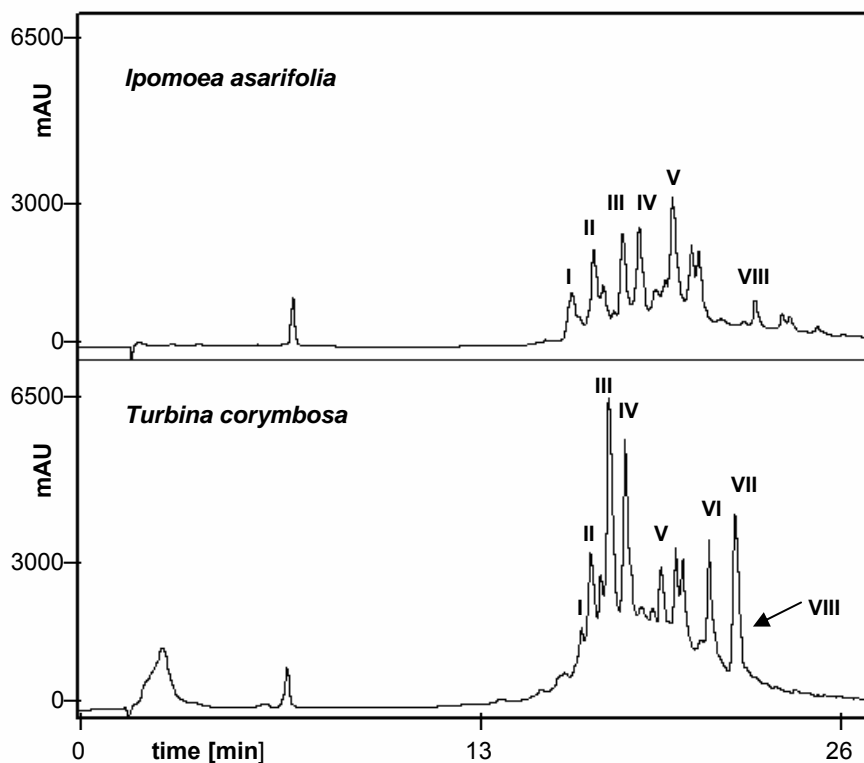


Abbildung 4.6 HPLC-Chromatogramme der Alkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (je 20 μ l); **I**: Chanoclavin, **II**: Lysergsäureamid, **III**: Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **IV**: Isolysergsäure α -hydroxyethylamid, **V**: Isolysergsäureamid, **VI**: Elymoclavin, **VII**: Agroclavin, **VIII**: Ergonovin. Ergonovin hat die gleiche Retentionszeit wie Agroclavin und ist bei *T. corymbosa* nur anhand des Massenspektrums identifizierbar. Die Identifizierung der Alkaloide erfolgte mittels UV-Spektren (DAD zwischen 275 und 315 nm) und Massenspektren der Vergleichssubstanzen.

Später durchgeführte Experimente, in denen beide Pflanzenarten mittels analytischer Methoden verglichen wurden (vgl. 4.7), entsprachen dieser erstmalig durchgeführten vergleichenden Analyse. Die Alkaloidspektren werden auch durch Literaturangaben weitgehend bestätigt (vgl. 1.5.2). Ungeklärt ist das Vorkommen von Ergobalansin, welches mangels Vergleichssubstanz nicht untersucht werden konnte. In der Literatur wird das Vorkommen von Ergobalansin in *Ipomoea asarifolia* beschrieben (vgl. 1.5.2).

4.2.3.2 Lichtmikroskopischer Vergleich des Pilzvorkommens bei *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*

Nach der Analyse des Alkaloidvorkommens musste nun das Pilzvorkommen bei *T. corymbosa* untersucht werden. Wie bei *I. asarifolia* wurden die Blätter der Pflanzen mit diversen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und anschließend lichtmikroskopisch untersucht (vgl. 3.5.1).

Es zeigte sich, dass auch auf den Blattoberflächen von *T. corymbosa* ein spezifisches Pilzmycel vorkommt. Wie bei *I. asarifolia* ist dieses Mycel sehr häufig mit den Drüsenschuppen der Pflanzen assoziiert (s. Abb. 4.7 a). Die Pilzmycelien der beiden Pflanzen verhalten sich auch sonst sehr ähnlich. Beide neigen zur Koloniebildung in der Nähe der Drüsen und wachsen von dort sternförmig in alle Richtungen (vgl. Abb. 4.4 und 4.7 b). Allerdings wirkt das Mycel von *T. corymbosa* etwas kräftiger, als das Mycel von *I. asarifolia*.

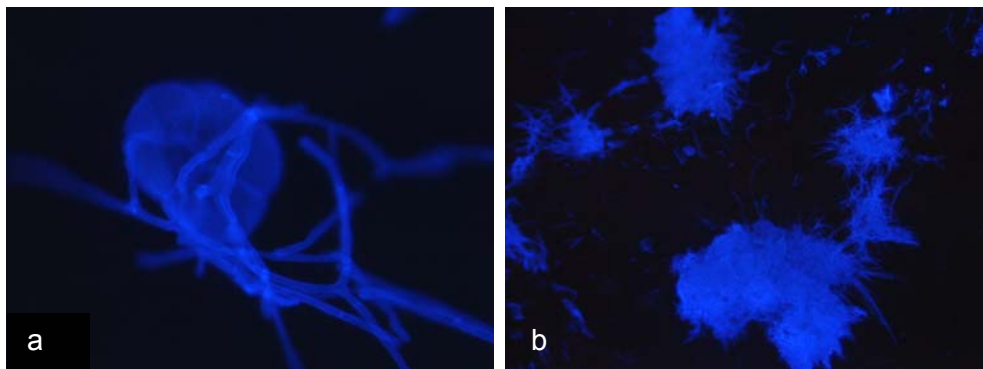


Abbildung 4.7 Pilzmycel an den Drüsenschuppen der Blattoberseite von *Turbina corymbosa*; **a:** Drüsenschuppe mit Mycel, **b:** typische Koloniebildung bei starkem Mycelwachstum. Lichtmikroskopische Aufnahmen (a:1000fach, b:100fach) nach Fluoreszenzanfärbung mit Calcofluor.

Die oben dargestellten Beobachtungen gaben Anlass zu der Vermutung, dass auch bei *T. corymbosa* Ergolinalkaloidgehalt und Vorkommen des epibiontischen Pilzes in direktem Zusammenhang stehen. Zur Überprüfung wurde die geschilderte Fungizidbehandlung von *I. asarifolia* (vgl. 4.2.1) mit *T. corymbosa* wiederholt.

4.2.3.3 Fungizidbehandlung von *Turbina corymbosa*

Die 1. Fungizidbehandlung von *Turbina corymbosa* erfolgte in Anlehnung an die Behandlung von *Ipomoea asarifolia* mit den 3 Fungiziden Folicur[®], Pronto Plus[®] und Switch[®] (vgl. 4.2.1). Sie wurde im September 2003 mit 3 Monate alten *T. corymbosa* - Pflanzen begonnen (vgl. 3.1.1). Es wurden 4 Pflanzengruppen gebildet. 3 Gruppen wurden mit jeweils einem der 3 o.g. Fungizide in 2wöchigem Abstand (insgesamt 18 Wochen) gespritzt, eine Gruppe blieb unbehandelt. Alle Pflanzengruppen wurden im Gewächshaus gehalten. Die Intensität der Fungizidbehandlung (vgl. 3.1.1) beruhte auf den bisherigen Erfahrungen.

Nach 18wöchiger Fungizidbehandlung wurden die 3 behandelten Pflanzengruppen sowie die unbehandelten Pflanzen in gleichen Teilen geerntet und extrahiert (vgl. 3.4.1). Der Ergolinalkaloidgehalt wurde mittels DC (vgl. 3.4.3) und UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) nachgewiesen. Desweiteren wurde das Vorkommen des epibiontischen Pilzes lichtmikroskopisch untersucht (vgl. 3.5.1).

In Abbildung 4.8 (DC-Chromatogramm) und Tabelle 4.5 (Photometrische Messung) ist jeweils das Alkaloidvorkommen der unterschiedlich behandelten Pflanzengruppen dargestellt. Der Alkaloidgehalt der verschiedenen Fraktionen wird als Ergonovin angegeben. In Abbildung 4.9 wird die Veränderung des Pilzvorkommens in Abhängigkeit von der Behandlung gezeigt. Das Ergebnis der Untersuchungen unterschied sich von dem mit *I. asarifolia* erzielten Ergebnis hinsichtlich der Wirkungsweise der Fungizide (vgl. 4.1.1). Dennoch zeigte sich auch hier ein deutlicher Zusammenhang zwischen Ergolinalkaloidgehalt und Pilzvorkommen.

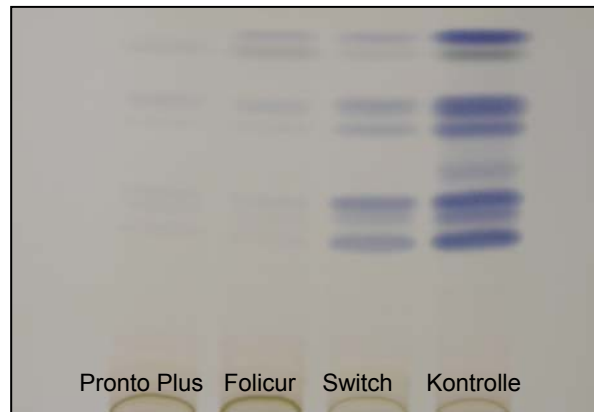


Abbildung 4.8 DC-Chromatogramm der Ergolinalkaloidfraktionen von *Turbina corymbosa* nach dem 1. Fungizidversuch (zur Identifizierung der Alkaloide vgl. 4.2.3.1). Die Extrakte wurden in gleichen Mengen aufgetragen. Die Behandlung der Pflanzen mit Pronto Plus bzw. Folicur führte nicht, wie bei *Ipomoea asarifolia*, zur vollständigen Eliminierung der Alkaloide. Die Behandlung mit Switch war dagegen erfolgreicher als bei *I. asarifolia* (vgl. Abb. 4.1).

Tabelle 4.5 Quantitative Untersuchung der Ergolinalkaloide von *Turbina corymbosa* nach dem 1. Fungizidversuch. Der Gesamtalkaloidgehalt wurde photometrisch als Ergonovin bestimmt. Die Behandlung der Pflanzen mit Pronto Plus und Folicur führte nicht, wie bei *Ipomoea asarifolia*, zur vollständigen Eliminierung der Alkaloide. Die Behandlung mit Switch war dagegen erfolgreicher als bei *I. asarifolia* (vgl. Tab. 4.1).

Alkaloide	Kontrollpflanzen (unbehandelt)	Fungizid behandelte Pflanzen		
		Switch	Folicur	Pronto Plus
µg / g Frischgewicht	9,2	0,6	0,3	0,3
%	100	6,4	3,2	3,2

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich wird, führten die mit Pronto Plus[®] und Folicur[®] behandelten Pflanzen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollpflanzen noch 3,2 % der Ergolinalkaloide. Auf den Blättern beider Pflanzengruppen waren vereinzelte Mycelreste des epibiontischen Pilzes auffindbar (s. Abb. 4.9 a).

Die mit Switch[®] behandelten Pflanzen führten im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen 6,4 % der Ergoline. Auf den Blättern dieser Pflanzen waren ebenfalls Mycelreste erkennbar. Diese kamen jedoch deutlich gehäuft vor, als bei den mit Pronto Plus[®] bzw. Folicur[®] behandelten Pflanzen (s. Abb. 4.9 b).

Die unbehandelten Pflanzen wiesen ihrem hohen Alkaloidgehalt entsprechend eine hohe Mycelkonzentration auf (s. Abb. 4.9 c).

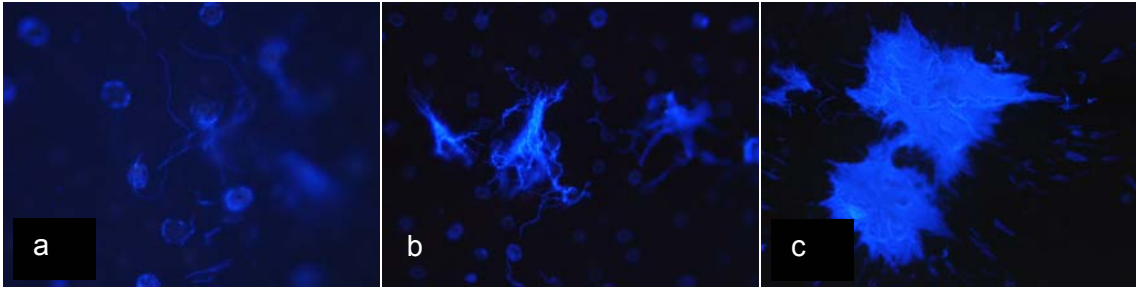


Abbildung 4.9 Pilzmycel auf den Blattoberflächen von *Turbina corymbosa* nach Fungizidbehandlung; **a:** Nach der Behandlung mit Pronto Plus sind nur vereinzelte Mycelreste an den Drüsenschuppen erkennbar; **b:** Nach der Behandlung mit Switch sind noch kleine Mycelgruppierungen sichtbar; **c:** Ohne Behandlung findet man an den meisten Drüsenschuppen die typischen Pilzkolonien. Lichtmikroskopische Aufnahmen (100fach) nach Fluoreszenzanfärbung mit Calcofluor.

Auch im Falle von *Turbina corymbosa* musste die Reproduzierbarkeit der Untersuchungen überprüft werden. Es wurde daher ein weiterer Fungizidversuch eingeleitet.

4.2.3.4 Wiederholung der Fungizidbehandlung von *Turbina corymbosa*

Die 2. Fungizidbehandlung von *T. corymbosa* wurde im Februar 2004 mit 8 Monate alten Pflanzen begonnen (vgl. 3.1.1). Wiederum wurden 4 Pflanzengruppen gebildet. 3 Gruppen wurden mit jeweils einem der 3 Fungizide, Folicur[®], Pronto Plus[®] und Switch[®] (vgl. 4.2.1), in 2wöchigem Abstand (insgesamt 18 Wochen) gespritzt. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe und blieb unbehandelt. Alle Pflanzengruppen wurden im Gewächshaus gehalten. Die Intensität der Fungizidbehandlung (vgl. 3.1.1) beruhte auf den bisherigen Erfahrungen.

Nach 18wöchiger Fungizidbehandlung wurden die 3 behandelten Pflanzengruppen sowie die unbehandelten Pflanzen in gleichen Teilen geerntet und extrahiert (vgl. 3.4.1). Der Ergolinalkaloidgehalt wurde mittels DC (vgl. 3.4.3) und UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) nachgewiesen. Desweiteren wurde das Vorkommen des epibiontischen Pilzes lichtmikroskopisch untersucht (vgl. 3.5.1). In Abbildung 4.10 (DC-Chromatogramm) und Tabelle 4.6 (Photometrische Messung) ist jeweils das Alkaloidvorkommen der unterschiedlich behandelten Pflanzengruppen dargestellt. Der Alkaloidgehalt der verschiedenen Fraktionen wird als Ergonovin angegeben.

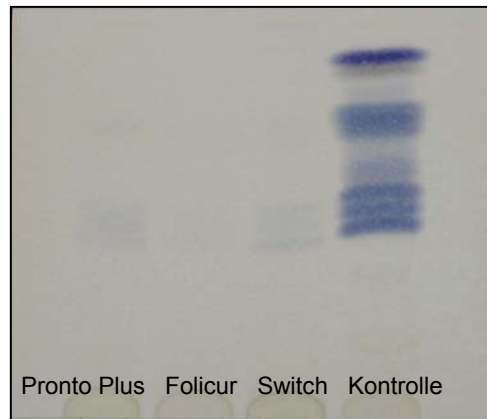


Abbildung 4.10 DC-Chromatogramm der Ergolinalkaloidfraktionen von *Turbina corymbosa* nach dem 2. Fungizidversuch (zur Identifizierung der Alkaloide vgl. 4.2.3.1). Die Extrakte wurden in gleichen Mengen aufgetragen. Der Behandlungserfolg mit Pronto Plus bzw. Switch war identisch (vgl. Tab. 4.6). Die Behandlung mit Folicur führte zur fast vollständigen Eliminierung der Alkaloide (nur als Schatten erkennbar).

Tabelle 4.6 Quantitative Untersuchung der Ergolinalkaloide von *Turbina corymbosa* nach dem 2. Fungizidversuch. Der Gesamtalkaloidgehalt wurde photometrisch als Ergonovin bestimmt. Der Behandlungserfolg mit Pronto Plus bzw. Switch war identisch. Die Behandlung mit Folicur führte zur fast vollständigen Eliminierung der Alkaloide.

Alkaloide	Kontrollpflanzen (unbehandelt)	Fungizid behandelte Pflanzen		
		Switch	Folicur	Pronto Plus
µg / g Frischgewicht	21,7	0,3	0,1	0,3
%	100	1,4	0,5	1,4

Der obigen Tabelle ist zu entnehmen, dass in den unbehandelten Kontrollpflanzen eine mehr als doppelt so hohe Ergolinalkaloidkonzentration nachgewiesen wurde, wie im 1. Fungizidversuch (vgl. Tab. 4.5). Das Mycel auf den Blattoberflächen der Pflanzen war wie gewohnt stark ausgeprägt (s. Abb. 4.9 c).

Die mit Pronto Plus[®] bzw. Switch[®] behandelten Pflanzen führten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollpflanzen noch 1,4 % der Ergolinalkaloide. Auf den Blättern beider Pflanzengruppen waren vereinzelt Mycelreste des epibiontischen Pilzes auffindbar (s. Abb. 4.9 a).

Die Behandlung der Pflanzen mit Folicur[®] führte zur fast vollständigen Eliminierung der Alkaloide. Auf den Blättern konnte kein Pilzmycel nachgewiesen werden.

Spätere Untersuchungen haben gezeigt, dass sämtliche *Turbina*-Stecklinge der 1. Generation (vgl. 4.2.2) von allen 3 behandelten Pflanzengruppen vollständig pilz- und alkaloidfrei waren. Dies galt auch für die Stecklinge der mit Pronto Plus[®] und Folicur[®] behandelten Pflanzen des ersten Fungizidversuchs mit *T. corymbosa* (vgl. 4.2.3.3). Ab einem bestimmten Stadium der Eliminierung schienen Pilzwachstum und Biosynthesetätigkeit nicht erneut aufzuleben.

Vergleicht man die Ergebnisse der 4 dargestellten Fungizidversuche (4.1.1, 4.2.1, 4.2.3.3 und 4.2.3.4) miteinander, so sind Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen Fungizide erkennbar. Diese lassen sich möglicherweise auf das Alter der Pflanzen, die Jahreszeit oder die beiden Pflanzenarten *I. asarifolia* und *T. corymbosa* zurückführen. Die unterschiedliche Wirksamkeit von Switch[®] bei den beiden Pflanzenarten ist besonders signifikant und wird unter 5.3.1 diskutiert. Zudem fällt die hohe Alkaloidkonzentration in den unbehandelten *Turbina*-Pflanzen des 2. Fungizidversuchs auf, welche jahreszeitlich bedingt sein könnte (vgl. 5.7.1). Trotz dieser Unterschiede bestätigen alle Befunde die Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Pilzvorkommen sowohl bei *I. asarifolia* als auch bei *T. corymbosa*. Unabhängig vom identischen Erscheinungsbild der Pilze beider Arten erhielt der Pilz auf *T. corymbosa* die eigene Bezeichnung Tcor-F01. Den Abschluss dieser vergleichenden Analyse bildete die Untersuchung des Ätherischen Öls von behandelten und unbehandelten *Turbina*-Pflanzen.

4.2.3.5 Untersuchung des Ätherischen Öls von *Turbina corymbosa*

Wie bei *Ipomoea asarifolia* sollte überprüft werden, ob der Einsatz von Fungiziden den Sekundärstoffwechsel der Pflanzen generell hemmt oder eine spezifische Wirkung auf die Akkumulation der Ergolinalkaloide hat (vgl. 4.1.2). Nur wenn letzteres der Fall war, konnte die Eliminierung der Alkaloide mit der Abtötung des Pilzes durch die Fungizide in direktem Zusammenhang stehen. Wichtige Sekundärmetabolite von Pflanzen, die ebenso wie Alkaloide antimikrobielle Wirkung haben, sind Ätherisch Öl-Komponenten. Diese wurden exemplarisch untersucht.

Das Ätherische Öl wurde durch Wasserdampfdestillation gewonnen (vgl. 3.4.8) und mittels GC-MS analysiert (vgl. 3.4.9). Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

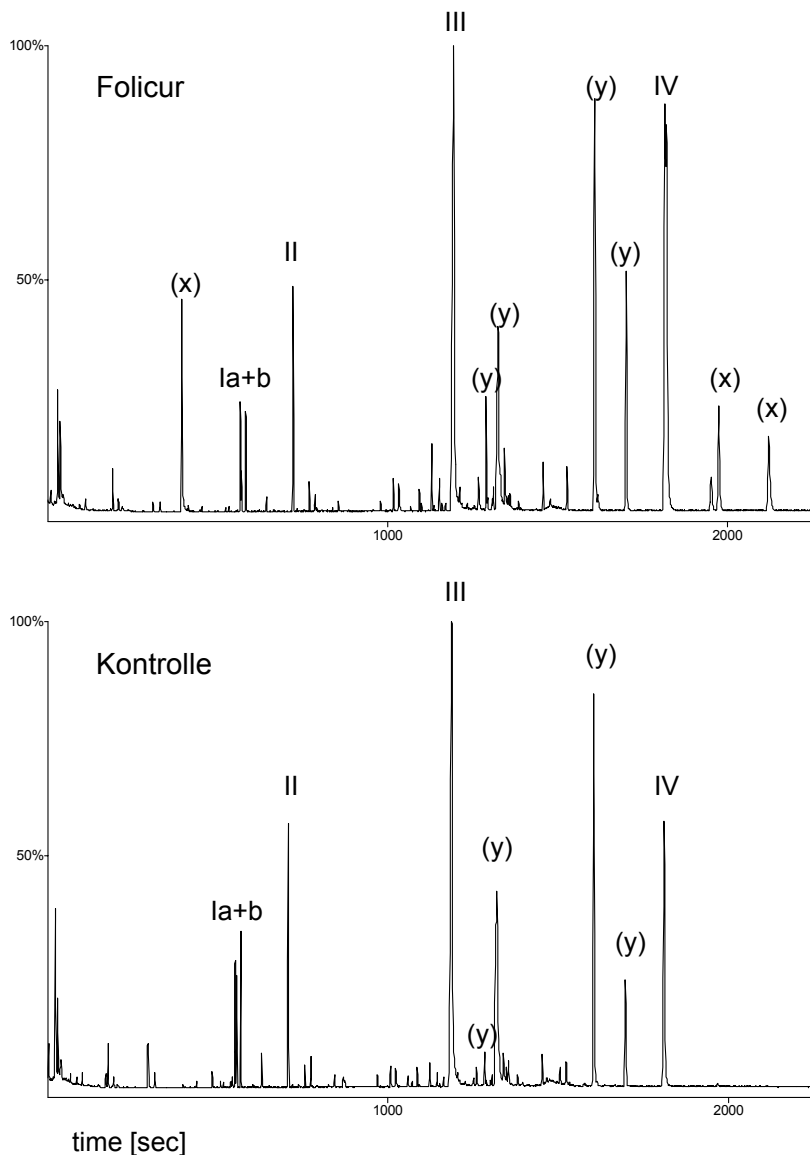


Abbildung 4.11 Gaschromatographie des Ätherischen Öls von *Turbina corymbosa*; **oben:** nach Fungizidbehandlung mit Folicur, **unten:** unbehandelt. **(x):** unbekannte Verbindung in „Folicur“-Fraktion, **(y):** unbekannte Verbindung in beiden Fraktionen, **Ia+b:** Theaspiran (Isomere), **II:** *trans*- α -Bergamoten, **III:** *n*-Hexadecanoicssäure, **IV:** Heptacosan

Vergleicht man die Gaschromatogramme von *Turbina corymbosa* (Abb. 4.11) und *Ipomoea asarifolia* (Abb. 4.3) miteinander, so fällt auf, dass *T. corymbosa* wesentlich mehr Ätherisch Öl-Komponenten enthält, als *I. asarifolia*. In behandelten und unbehandelten Pflanzen wurden als Hauptkomponenten Theaspiran (Isomere 1 und 2), *trans*- α -Bergamoten, *n*-Hexadecanoicssäure, Heptacosan und vier unbekannte terpenoide Verbindungen (y) nachgewiesen. Die Quantitäten unterscheiden sich, meist zugunsten der „Folicur“-Fraktion, geringfügig voneinander. In der „Folicur“-Fraktion

waren drei weitere unbekannte Terpenoide (x) nachweisbar (Massenspektren siehe 8.4). Die ersten Peaks der Chromatogramme sind Lösungsmittelpeaks. Die zahlreichen Nebenkomponten konnten nicht identifiziert werden, sind jedoch in beiden Fraktionen in ähnlichen Konzentrationen vorhanden.

Diese Untersuchung deutet auch bei *T. corymbosa* darauf hin, dass die Fungizidbehandlung nicht den gesamten Sekundärstoffwechsel hemmt, sondern spezifisch die Akkumulation von Ergolinalkaloiden. Der Einsatz von Fungiziden scheint die Ätherisch Öl-Produktion bei beiden Pflanzenarten sogar leicht anzuregen. Die mögliche Ursache für diese Reaktion wird unter 5.3.2 diskutiert.

Die Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und dem Vorkommen des epibiontischen Pilzes konnte sowohl bei *Ipomoea asarifolia*, als auch bei *Turbina corymbosa* nach den beschriebenen Untersuchungen kaum noch angezweifelt werden. Eine letzte Unsicherheit bestand in der Frage, ob die Pilze spezifisch auf den beiden Convolvulaceen-Arten vorkommen oder unspezifisch sind und innerhalb des Institutsgewächshauses verbreitet wurden. Letzteres würde bedeuten, dass die Korrelation rein zufälliger Natur wäre.

4.2.4 Überprüfung der Spezifität der epibiontischen Pilze

Zur Überprüfung der Spezifität von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 wurde Pflanzenmaterial aus externen Quellen erworben, sowie in einer externen Klimakammer (vgl. 2.4.5) wie unten beschrieben angezogen und lichtmikroskopisch untersucht.

4.2.4.1 *Turbina corymbosa* aus dem Botanischen Garten in Mainz

Im Juni 2004 ergab sich die Gelegenheit, die Convolvulaceen-Sammlung des Botanischen Gartens der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz zu besuchen. Unter den zahlreichen Convolvulaceen-Arten befanden sich auch Pflanzen von *Turbina corymbosa*. Mit der freundlichen Genehmigung des Kustos Herrn Dr. R. Omlor wurden einige Blätter dieser Pflanzen zur lichtmikroskopischen Untersuchung entnommen. *Ipomoea asarifolia* war in der Sammlung nicht vertreten. Von *Argyreia nervosa*, *Ipomoea hulubii*, *Ipomoea nil* und *Ipomoea purpurea* wurden zum Vergleich ebenfalls

Blätter mitgenommen. Diese Arten führen nach dem bisherigen Erkenntnisstand keine Ergolinalkaloide in den vegetativen Pflanzenteilen (vgl. 5.8).

Das Ergebnis war erwartungsgemäß:

Auf allen Blättern von *Turbina corymbosa* wurde das typische Pilzmycel in der Nähe der Drüschuppen gefunden (s. Abb. 4.12). Die übrigen Convolvulaceen-Arten waren symptomlos. Diese Arten hatten keine oder kaum Drüschuppen, einige hatten zahlreiche Drüschhaare.

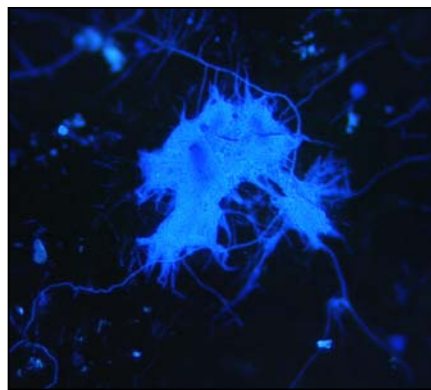


Abbildung 4.12 Typisches Pilzmycel auf den Blattoberflächen von *Turbina corymbosa* aus dem Botanischen Garten in Mainz. Lichtmikroskopische Aufnahme (400fach) nach Fluoreszenzanfärbung mit Calcofluor.

4.2.4.2 Anzucht von Pflanzen aus eigener Samenernte in einer Klimakammer

Ein Teil der 2003 von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* geernteten Samen wurden im März 2004 in einer, speziell für tropische Pflanzen geeigneten, Klimakammer (25 °C, 8 h Licht, 50 % Luftfeuchte) ausgesät. Die Samen wurden sterilisiert (vgl. 3.1.6) und in autoklavierte Erde gesät, um alle Möglichkeiten einer „Pilzverschleppung“ auszuschließen.

Nach 4 Monaten wurden die Blätter der Pflanzen lichtmikroskopisch untersucht (vgl. 3.5.1). Auf den Blättern beider Pflanzenarten war das typische Pilzmycel eindeutig nachweisbar. Damit wurde immer wahrscheinlicher, dass die Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 Samenendophyten sind (vgl. 4.2.2). Untersuchungen hierzu werden in Kapitel 4.3 dargestellt.

4.2.4.3 Anzucht von Pflanzen aus käuflich erworbenen Samen in einer Klimakammer

Im Oktober 2004 wurden käuflich erworbene Samen von *Turbina corymbosa* (vgl. 2.3.1) in einer, speziell für tropische Pflanzen geeigneten, Klimakammer (25 °C, 8 h Licht, 50 % Luftfeuchte) ausgesät. Samen von *Ipomoea asarifolia* waren im Handel nicht erhältlich. Obwohl die *Turbina*-Samen aus einer externen Quelle stammten wurden sie wie unter 4.2.4.2 sterilisiert (vgl. 3.1.6) und in autoklavierte Erde gesät.

Nach 4 Monaten wurden die Blätter der Pflanzen lichtmikroskopisch untersucht (vgl. 3.5.1). Auch auf diesen Blättern war das typische Pilzmycel eindeutig nachweisbar. Da es sich um bisher nicht untersuchte Pflanzen aus externen Samen handelte, wurde ein Teil des Pflanzenmaterials extrahiert (vgl. 3.4.1) und das Ergolinalkaloidvorkommen mittels DC (vgl. 3.4.3) überprüft. Wie erwartet war das gesamte Alkaloidspektrum vorhanden.

Damit konnte an der Spezifität der Epibionten kein Zweifel mehr bestehen. Weitere Untersuchungen haben sich mit ihrer Herkunft und ihrer Verbreitung befasst.

4.3 Untersuchungen zur Pilzherkunft und Pilzübertragung

Die Beobachtung der epibiontischen Lebensweise von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 an den Drüsenschuppen der Blattoberflächen von *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* war hinreichend belegt. Ungeklärt waren jedoch Ursprung und Verbreitung der Pilze, sowie die Möglichkeit ihres fakultativ endophytischen Vorkommens.

4.3.1 Sterile Anzucht von Samenpflanzen

Wie unter 4.2.2 dargestellt wird, sind die Stecklinge behandelter (pilz-/alkaloidfreier) Pflanzen pilz- und alkaloidfrei. Dagegen sind die Sämlinge aus den Samen der behandelten (pilz-/alkaloidfreien) Pflanzen pilz- und alkaloidführend. Die Fungizidbehandlung mit Pronto Plus[®] und Folicur[®] schien nur die vegetativen Teile der Pflanzen zu erreichen, nicht aber die generativen Teile, also die Blüten der Pflanzen.

Dies konnte darauf hinweisen, dass sich die Pilze in den Samen vermehren und somit Samenendophyten sind.

Um diese Theorie weiterzuverfolgen, wurde ein Teil der 2003 bzw. 2004, von pilz- und alkaloidführenden *Ipomoea*- und *Turbina*-Pflanzen geernteten Samen, sterilisiert und auf sterilem Mineralsalzmedium ausgesät (vgl. 3.1.6, s. Abb. 4.13). Grund war die keimfreie Anzucht von Pflanzen und die dadurch verhinderte Infektion von außen. Eine Infektion der Pflanzen mit Iasa-F13 bzw, Tcor-F01 konnte somit nur in den Samen erfolgen.

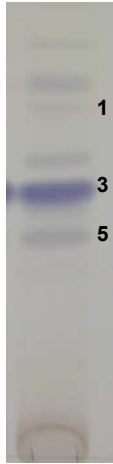
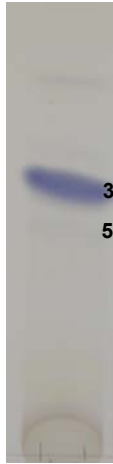
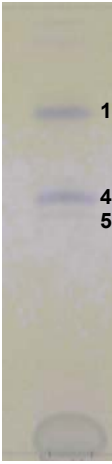
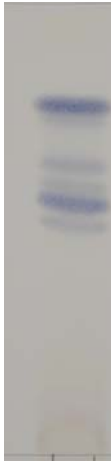


Abbildung 4.13 Sterile Anzucht von Samenpflanzen in MS/2-Medium; **links:** *Turbina corymbosa*, 6 Wochen nach der Aussaat; **rechts:** *Ipomoea asarifolia*, 10 Wochen nach der Aussaat.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einem Kulturraum (vgl. 2.4.4) in weißem Dauerlicht (\varnothing 1960 Lux) bei einer gleichbleibenden Temperatur von 25 °C.

Die Pflanzen wurden jeweils 3 bis 4 Monate nach der Aussaat geerntet, eingefroren und später extrahiert (vgl. 3.4.1). Das Alkaloidvorkommen wurde mittels DC (vgl. 3.4.3) und UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) überprüft. In Tabelle 4.7 ist der Alkaloidgehalt der verschiedenen Fraktionen als Ergonovin (photometrische Messung) angegeben. Die Dünnschichtchromatogramme sollen die Variabilität des Alkaloidspektrums veranschaulichen. Sie sind aus quantitativer Sicht nicht repräsentativ, da die Pflanzenausbeute je nach Wachstum unterschiedlich war (vgl. Tab. 4.7).

Tabelle 4.7 Ergolinalkaloidvorkommen in steril angezogenen Samenpflanzen; Der Gesamtalkaloidgehalt ($\mu\text{g} / \text{g}$ Frischgewicht) wurde photometrisch als Ergonovin bestimmt; Die DC-Chromatogramme veranschaulichen die Variabilität des Alkaloidspektrums. Sie geben keine Auskunft über Quantitäten, da die Extrakte unterschiedlich hoch konzentriert waren (vgl. Erntemenge); 1: Isolysergsäureamid, 2: Elymoclavin, 3: Chanoclavin, 4: Lysergsäureamid, 5: Ergonovin; weitere Verbindungen wurden mangels Referenzsubstanzen nicht identifiziert.

Pflanzen	<i>Ipomoea asarifolia</i>	<i>Ipomoea asarifolia</i>	<i>Turbina corymbosa</i>	<i>Turbina corymbosa</i>
Erntemenge (g): Blätter Stängel	10,5 16,0	20,5 29,5	6,5 8,0	6,5 9,5
Erntzeitpunkt (3-4 Monate nach der Aussaat)	Januar 2004	Februar 2004	April 2004	Juni 2004
Alkaloide ($\mu\text{g} / \text{g}$ Frischgewicht)	1,4	0,4	1,7	5,7
Dünnschichtchromatogramme				

Auffällig war der hohe Chanoclavinanteil (3) in *I. asarifolia* während in *T. corymbosa* Lysergsäureamid (4) und Isolysergsäureamid (1) überwogen.

Von jeder Pflanze wurden einige Blätter zur lichtmikroskopischen Untersuchung (vgl. 3.5.1) verwahrt. Die in Abbildung 4.14 dargestellten Aufnahmen der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 zeigen einen repräsentativen Ausschnitt der unterschiedlichen Myceldichte.

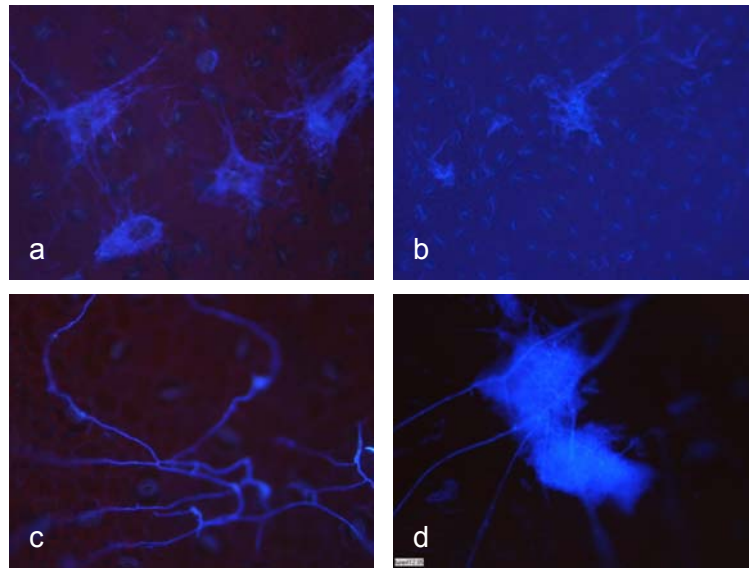


Abbildung 4.14 Repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Myceldichte von *Iasa-F13* bzw. *Tcor-F01* auf den Blattoberseiten steril angezogener Samenpflanzen; **a** und **b**: *Ipomoea asarifolia*, **c** und **d**: *Turbina corymbosa*; Lichtmikroskopische Aufnahmen (200fach) nach Fluoreszenzanfärbung mit Calcofluor.

Das Vorkommen der epibiontischen Pilze und von Ergolinalkaloiden bei steril angezogenen Samenpflanzen wurde mit den oben dargestellten Befunden eindeutig belegt. Da die sterile Anzucht von Pflanzen keimfrei, d.h. ohne Infektionsmöglichkeit von außen erfolgt, konnte kaum noch angezweifelt werden, dass die Pilze als Endophyten in den Samen überdauern.

Allerdings war es nicht möglich, wie in den bisherigen Versuchen, eine Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Myceldichte nachzuweisen. Die in Abbildung 4.14 gezeigten Mycelausschnitte veranschaulichen die Variabilität des Pilzvorkommens. Dieses stimmte jedoch nicht mit den Alkaloidkonzentrationen in Tabelle 4.7 überein. Hier konnte keine Regelmäßigkeit festgestellt werden. Auch die Unregelmäßigkeit der Alkaloidspektren (vgl. DC-Chromatogramme Tab. 4.7) war im Vergleich zu den früheren Experimenten auffällig. Eine Korrelation mit dem Pilzvorkommen war nicht erkennbar.

Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, ob die Pilze zum Wachstum bzw. zur Alkaloidbildung spezielle Bedingungen benötigen, die sie im Erlenmeyerkolben und bei künstlicher Belichtung nur teilweise vorfinden. Eine enge Bindung der Pilze an den pflanzlichen Stoffwechsel wäre hierfür eine Erklärung. Die in Kapitel 4.7 dargestellten Experimente sollten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Die folgenden Untersuchungen haben sich weiter mit Herkunft und Verbreitung der Pilze beschäftigt.

4.3.2 Untersuchungen zur Pilzverbreitung über die vegetativen Pflanzenteile

Trotz Verbreitung der Pilze in den Samen (vgl. 4.3.1) konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine Verbreitung über die vegetativen Pflanzenteile erfolgte. Denkbar war die Übertragung via asexueller bzw. sexueller Sporen oder mittels Mycel.

4.3.2.1 „Attachment-Versuche“

Die Experimente wurden sowohl im Juni 2004 als auch im Juni 2005 mit 3 Monate alten Stecklingspflanzen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* begonnen. Es wurden jeweils eine pilz-/alkaloidfreie und eine pilz-/alkaloidführende Pflanze in einem abgeschlossenen Raum aus Acrylglas zusammengestellt (s. Abb. 4.15). Die beiden Pflanzen wurden so miteinander verschlungen, dass die Blattoberflächen in engem Kontakt standen. Von beiden Pflanzenarten (*Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*) wurden je 4 solcher Pflanzenpaare im Gewächshaus aufgestellt.



Abbildung 4.15 „Attachment-Versuche“ mit *Ipomoea asarifolia*: Je eine pilz-/alkaloidfreie und eine pilz-/alkaloidführende Pflanze wurden in einer Acrylglasrolle so miteinander verschlungen, dass die Blattoberflächen in engem Kontakt standen. Die Rolle wurde oben mit einer atmungsaktiven Folie abgedeckt. Zum Gießen wurde die Rolle unten angehoben. Die Inkubationszeit betrug 18 Woche; die Fotos entstanden nach 12 Wochen Inkubation.

Um Fungizidrückstände bzw. Alkaloid- und Mycelreste bei *T. corymbosa* (vgl. 4.2.3.4) auszuschließen, wurden nur Pflanzen der 2. und 3. Stecklingsgeneration verwendet. Ziel der Versuche war der Übergang der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 von pilz-/alkaloidführenden Pflanzen auf pilz-/alkaloidfreie Pflanzen. Gleichzeitig sollte die mögliche Veränderung des Alkaloidvorkommens in den Pflanzen untersucht werden.

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, führte die 18wöchige Behandlung mit spezifischen Fungiziden zur vollständigen (vgl. 4.1.1 und 4.2.1) bzw. fast vollständigen (vgl. 4.2.3.3 und 4.2.3.4) Eliminierung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01. Dies waren die einzigen Erfahrungswerte bezüglich der Bindung der Pilze an die Pflanzen. Daher wurde zur Übertragung der Pilze von einer Pflanze auf die andere eine Inkubationszeit von 18 Wochen gewählt. In dieser Zeit wurde der Zustand der Pflanzen regelmäßig kontrolliert. Die ersten nekrotischen Blätter entstanden nach 8 bis 10 Wochen. Daher erfolgte die erste lichtmikroskopische Analyse bereits nach 10 Wochen (vgl. 3.5.1). Nach insgesamt 18 Wochen wurden die Pflanzen in gleichen Teilen geerntet und extrahiert (vgl. 3.4.1). Das Alkaloidvorkommen wurde mittels DC (vgl. 3.4.3) und UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) überprüft. Von jeder Pflanze wurden einige Blätter zur zweiten lichtmikroskopischen Untersuchung (vgl. 3.5.1) verwahrt.

Bei der ersten mikroskopischen Analyse nach 10 Wochen zeigte sich auf einigen Blättern der pilz-/alkaloidfreien *Ipomoea*-Pflanzen undeutlich ein hauchfeines Mycel. Dieses war jedoch nicht eindeutig als das typische Mycel des Epibionten identifizierbar. Nach 18 Wochen wurde auf keinem der Blätter Mycel detektiert. Möglicherweise konnte sich der Pilz nach einem kurzen Versuch nicht etablieren. Auf den Blättern der pilz-/alkaloidführenden Pflanzen war das typische Mycel jederzeit eindeutig nachweisbar.

In den pilz-/alkaloidfreien Pflanzen wurden weder mittels DC-Chromatographie noch mittels UV-Spektroskopie Ergolinalkaloide nachgewiesen. In allen pilz-/alkaloidführenden Pflanzen war das gesamte Alkaloidspektrum nachweisbar.

Die Versuche haben gezeigt, dass trotz des engen Kontaktes von pilz-/alkaloidfreien und pilz-/alkaloidführenden Pflanzen keine Pilzübertragung via Sporen oder Mycel stattfindet. Das Ergebnis war aufgrund von Literaturhinweisen, bezüglich der Vermehrung Ergolinalkaloid-bildender Pilze auf Poaceen, nicht unerwartet (vgl. 5.1.1). Das Vorkommen von Sporen bzw. anderen Vermehrungsstrukturen, konnte lichtmikroskopisch bisher nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskop sollten dies genauer überprüfen.

4.3.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskop (vgl. 3.5.2) wurden sowohl mit *Turbina corymbosa* als auch mit *Ipomoea asarifolia* durchgeführt. Sie bestätigten in beiden Fällen zunächst einige lichtmikroskopische Beobachtungen, wie die Drüsenassoziation der Pilze und ihre Neigung zur Koloniebildung (s. Abb. 4.16). Desweiteren verdeutlichten sie ein weiteres Mal die Ähnlichkeit des Pilzwachstums bei den beiden Pflanzenarten.

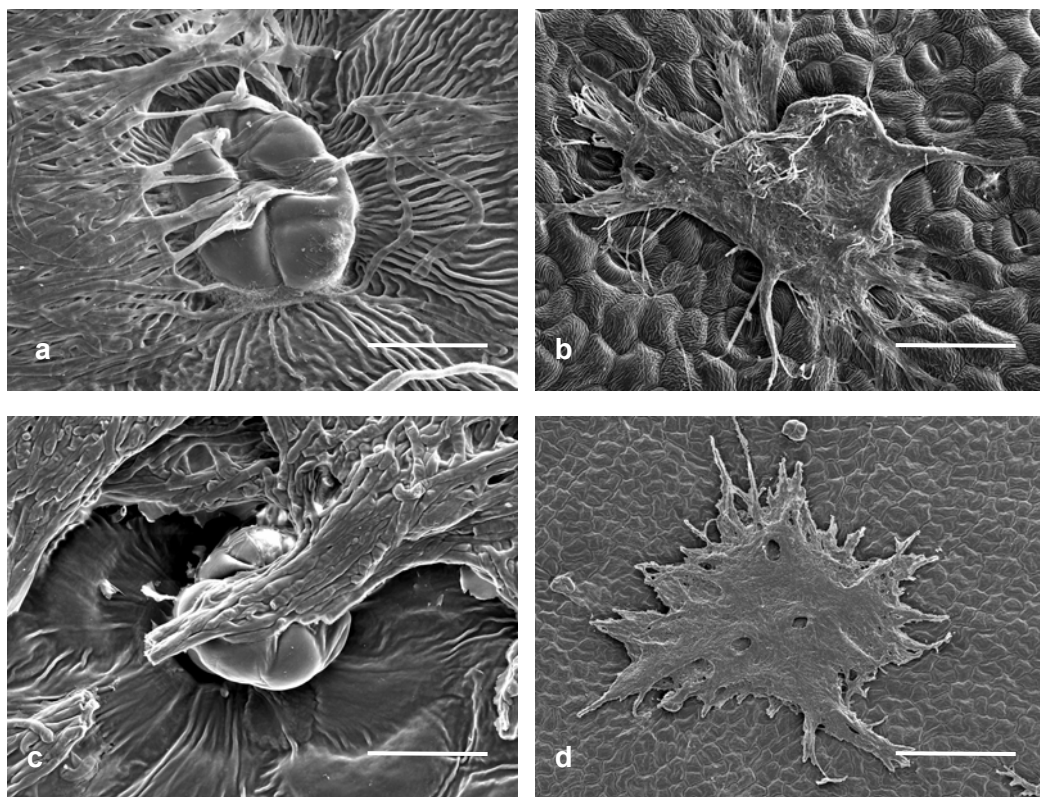


Abbildung 4.16 REM-Aufnahmen vom Mycel der Pilze *Iasa-F13* bzw. *Tcor-F01*; **a** und **b**: Blattoberfläche von *Ipomoea asarifolia*, **a**: Drüsenschuppe mit Mycel, **b**: typische Koloniebildung; **c** und **d**: Blattoberfläche von *Turbina corymbosa*, **c**: Drüsenschuppe mit Mycel (Mycel durch Präparation gerissen), **d**: typische Koloniebildung; Balken: a und c = 20 μm ; b und d = 100 μm

Die eigentliche Intention der REM-Analyse war jedoch die Suche nach Vermehrungs- bzw. Überdauerungsstrukturen der Epibionten. Hierbei wurde sowohl nach Organen der vegetativen Phase, als auch nach Organen der fruktifikativen Phase gesucht. Organe der vegetativen Phase sind einerseits Überdauerungsorgane wie Chlamydo-sporen oder Sklerotien, andererseits Ausbreitungsorgane wie

Infektionshyphen, Synnemata oder Stromata. Organe der fruktifikativen Phase sind asexuelle oder sexuelle Sporangienträger bzw. Fruchtkörper mit den entsprechenden exogenen oder endogenen Sporen. Funktion und Aussehen dieser Pilzorgane werden in Tabelle 4.8 erläutert.

Tabelle 4.8 Pilzorgane, die der Vermehrung, Ausbreitung und Überdauerung dienen.

Pilzorgan	Funktion	Aussehen
Chlamydosporen	Überdauern	Umgewandelte Hyphenzellen, die zu dickwandigen Organen werden.
Sklerotien	Überdauern	Dichtes Hyphengeflecht, das ein Pseudoparenchym bildet.
Infektionshyphen	Infektion	Hyphen, die in den Wirt eindringen.
Synnemata	Ausbreitung, Zunahme von Biomasse	Hyphen, die sich in Strängen neben- und übereinander lagern.
Stromata	Ausbreitung, Zunahme von Biomasse	Polsterähnliches Geflecht aus Hyphen, in welchem Fruchtkörper der asexuellen oder sexuellen Fruktifikation eingebettet sind.
Konidienträger (Konidien)	Asexuelle Vermehrung	Differenzierte Hyphen, an deren Enden exogen Konidien entstehen.
Sporangienträger (Sporangiosporen)	Asexuelle Vermehrung	Differenzierte Hyphen, an deren Enden Sporangien als Anschwellung entstehen; Sporangiosporenbildung endogen in den Sporangien.
Ascomata (Ascosporen)	Sexuelle Vermehrung	Fruchtkörper der sexuellen Phase der Ascomyceten; Ascosporenbildung endogen in einem Ascus.
Basidiomata (Basidiosporen)	Sexuelle Vermehrung	Fruchtkörper der sexuellen Phase der Basidiomyceten; Basidiosporenbildung exogen an einer Basidie.
Zygosporangien (Zygosporen)	Sexuelle Vermehrung	Fruchtkörper der sexuellen Phase der Zygomyceten; Zygosporenbildung endogen in einem Zygosporangium.

In Abbildung 4.17 werden die Strukturen gezeigt, die im Rahmen der REM-Analyse entdeckt wurden.

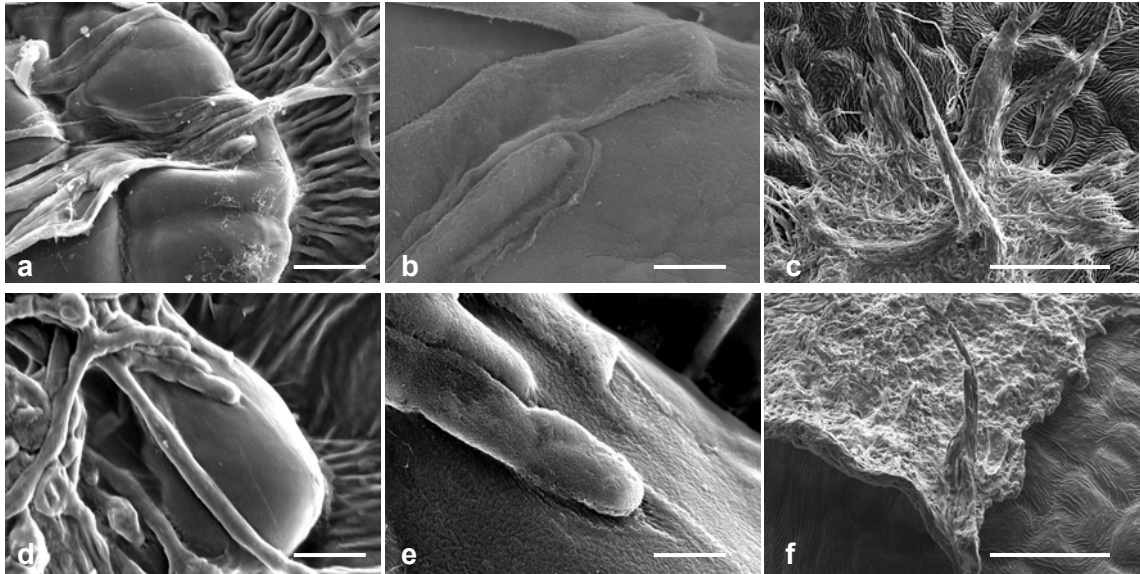


Abbildung 4.17 REM-Aufnahmen vom Mycel der Pilze *Iasa-F13* bzw. *Tcor-F01*; **a bis c**: Blattoberfläche von *Ipomoea asarifolia*; **d bis f**: Blattoberfläche von *Turbina corymbosa*; **a und d**: Möglicherweise Appressorien auf Drüsenschuppen (siehe Text); **b und e**: Nahaufnahme der möglichen Appressorien; **c und f**: Synnemata; Balken: **a und d** = 5 μm , **b und e** = 1 μm , **c und f** = 50 μm

Abbildung 4.17 zeigt Strukturen der Pilze *Iasa-F13* bzw. *Tcor-F01*, auf den Blattoberflächen von *Ipomoea asarifolia* (a bis c) bzw. *Turbina corymbosa* (d bis f).

In den Abbildungen c und f sind sogenannte Synnemata zu sehen (vgl. Tab. 4.8). Diese aufgerichteten, zusammengelagerten Hyphenstränge dienen i.d.R. der Ausdehnung des Pilzes. An den Enden von Synnemata können aber auch Konidien (asexuelle Sporen) entstehen. Die Enden der hier dargestellten Synnemata sind abgebrochen und haben möglicherweise Konidien getragen.

Die übrigen Abbildungen zeigen vermutlich Appressorien. Appressorien sind zu Haftscheiben umgewandelte Hyphenenden, die eine Infektion einleiten: Nach der Keimung einer Spore entsteht ein Keimschlauch, der mit einem Appressorium endet. Dieses Appressorium haftet mit hohem Druck (Turgordruck der Pilzzellen) auf der Pflanzenoberfläche, so dass Infektionshyphen (vgl. Tab. 4.8) die Widerstände der pflanzlichen Kutikula überwinden und in diese eindringen können (vgl. Abb. 4.18).

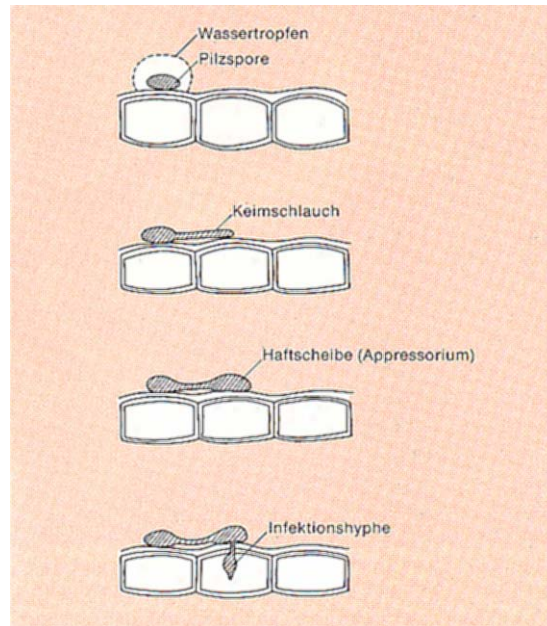


Abbildung 4.18 Infektionsvorgang: Sporenkeimung, Ausbildung eines Appressoriums und Eindringen des Pilzes durch die unverletzte Kutikula (aus Sachweh 1987).

Das Vorkommen von Appressorien impliziert demnach das Vorkommen von Sporen sowie von penetrierenden Hyphen. Außer einiger *Penicillium*-Sporen wurden trotz mehrfacher Suche auf den Blattoberflächen beider Pflanzenarten keine Sporen gefunden. Zum Auffinden möglicher Penetrationsstellen wurde der Pilz Iasa-F13 mittels Ultraschallbehandlung von den Blattoberflächen abgelöst (vgl. 3.4.14.2). Abbildung 4.19 zeigt REM-Aufnahmen der darunter liegenden Epidermis.

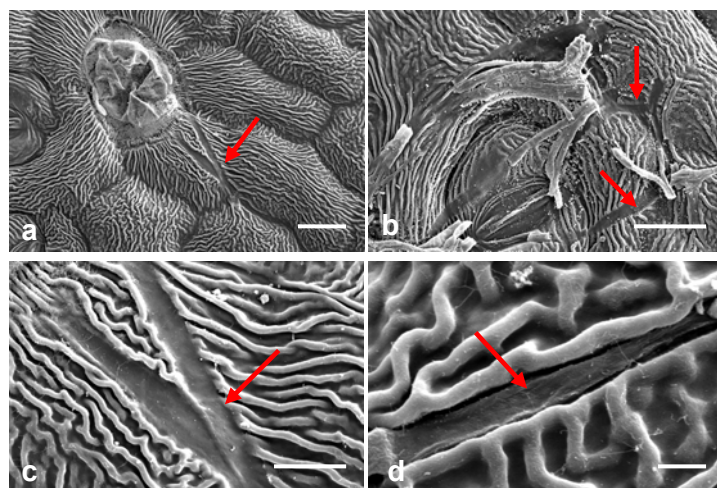


Abbildung 4.19 REM-Aufnahmen der Blattoberfläche von *Ipomoea asarifolia* nach Ultraschallbehandlung: Das Mycel des Pilzes Iasa-F13 löst sich von der Blattoberfläche und hinterlässt deutliche Spuren in der Kutikula (Pfeile). Balken: a und b = 20 μm ; c = 5 μm ; d = 2 μm

Wie in Abbildung 4.19 ersichtlich ist, konnten keine Penetrationsstellen in der pflanzlichen Epidermis gefunden werden. Dennoch scheint der Pilz sehr intensiv an die Pflanzenoberfläche gebunden zu sein. Nach der Ultraschallbehandlung löst sich das Mycel von der Blattoberfläche und hinterlässt deutliche Spuren in der Kutikula (s. Abb. 4.19 Pfeile). Die mögliche Bedeutung solcher Beobachtungen wird unter 5.4.1 diskutiert.

Trotz fehlender Hinweise auf das Eindringen der epibiontischen Pilze in die Pflanzen, konnte ihr endophytisches Vorkommen nicht ausgeschlossen werden. Desweiteren war bisher nicht geklärt, ob eventuell ein weiterer, vielleicht endophytischer, Organismus an der Ergolinalkaloidbildung beteiligt war. Die folgenden Untersuchungen haben sich mit einer möglichen inter- bzw. intrazellulären Pilzverbreitung beschäftigt.

4.3.2.3 Pfropfversuche

Die Experimente wurden sowohl im Juni 2004 als auch im Juni 2005 mit 3 Monate alten Stecklingspflanzen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* begonnen. Es wurden je eine pilz-/alkaloidfreie und eine pilz-/alkaloidführende Pflanze durch Pfropfung zum Verwachsen gebracht (s. Abb. 4.20).



Abbildung 4.20 Gärtnerisches Pfropfen: Der Spross zweier Pflanzen wird gespalten. Die eine Pflanze wird als Reis in die zweite Pflanze (Unterlage) eingesetzt (s. Abb. 4.21). Die Pfropfstelle wird verbunden (A). Nach einigen Wochen wird das Band entfernt und das Reis von seiner Ursprungspflanze getrennt (B). Das Reis wächst nun auf der Unterlage weiter; die Unterlage liefert Wasser und Nährstoffe (C).

Dabei wurden einerseits pilz-/alkaloidfreie Pflanzen als sog. Reiser auf pilz-/alkaloidführende Unterlagen gepfropft



Abbildung 4.21 a Aus Sachweh 1987 (modifiziert)

und andererseits pilz-/alkaloidführende Reiser auf pilz-/alkaloidfreie Unterlagen.



Abbildung 4.21 b Aus Sachweh 1987 (modifiziert)

Von beiden Pflanzenarten (*Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*) wurden je 4 solcher Pflanzenpaare im Gewächshaus aufgestellt.

Um Fungizidrückstände bzw. Alkaloid- und Mycelreste bei *T. corymbosa* (vgl. 4.2.3.4) auszuschließen, wurden nur Pflanzen der 2. und 3. Stecklingsgeneration verwendet.

Ziel der Versuche war es herauszufinden, ob sich die Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 inter- bzw. intrazellulär verbreiten. Ein Übergang der Pilze von pilz-/alkaloidführenden auf pilz-/alkaloidfreie Pflanzen wäre, im Falle ihres endophytischen Vorkommens, aufgrund der Verwachsung der Pflanzen durchaus denkbar. Gleichzeitig sollte die mögliche Veränderung des Alkaloidvorkommens in den Pflanzen untersucht werden. Denkbar wäre die Verteilung der Alkaloide über den Transpirationsstrom. Auf diese Weise könnten die Alkaloide auch ohne Übergang der Pilze zu den pilz-/alkaloidfreien Pflanzen gelangen.

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, führte die 18wöchige Behandlung mit spezifischen Fungiziden zur vollständigen (vgl. 4.1.1 und 4.2.1) bzw. fast vollständigen (vgl. 4.2.3.3 und 4.2.3.4) Eliminierung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01. Dies waren die einzigen Erfahrungswerte bezüglich der Bindung der Pilze an die Pflanzen. Daher wurde nach dem Verwachsen von Reis und Unterlage eine Inkubationszeit von 18 Wochen gewählt. In dieser Zeit wurde der Zustand der Pflanzen regelmäßig kontrolliert. Die verwachsenen Pflanzen waren durchweg in guter Verfassung. In Anlehnung an die „Attachment-Versuche“ (vgl. 4.3.2.1) erfolgte die erste lichtmikroskopische Analyse (vgl. 3.4.1) nach 10 Wochen. Nach insgesamt 18 Wochen wurden Reis und Unterlage jeder Pflanze in gleichen Teilen geerntet und extrahiert (vgl. 3.4.1). Das Alkaloidvorkommen wurde mittels DC (vgl. 3.4.3) und UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) überprüft. Von Reisern und Unterlagen wurden jeweils einige Blätter zur zweiten lichtmikroskopischen Untersuchung (vgl. 3.5.1) verwahrt.

Das Ergebnis war einheitlich: Alle, vor Beginn der Versuche, pilz- und alkaloidführenden Reiser und Unterlagen waren weiterhin pilz- und alkaloidführend. Alle vor Beginn der Versuche pilz- und alkaloidfreien Reiser und Unterlagen waren weiterhin pilz- und alkaloidfrei. Auch in der lichtmikroskopischen Untersuchung nach 10 Wochen ließ sich, im Unterschied zu den „Attachment-Versuchen“, auf den pilz-/alkaloidfreien Pflanzenteilen kein Pilzmycel nachweisen.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Alkaloidverteilung mittels Transpirationsstrom nicht stattfindet. Ein diesbezügliches Beispiel in der Literatur wird unter 5.5 dargestellt. Desweiteren war keine inter- bzw. intrazelluläre Verbreitung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 erkennbar. Allerdings wurde mittels Lichtmikroskopie das Auftreten der Pilze auf den Blattoberflächen untersucht. Studien mittels Transmissionselektronenmikroskop sollten das endophytische Vorkommen der Epibionten oder eines anderen Organismus` überprüfen.

4.3.2.4 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskop (vgl. 3.5.3) wurden mit *Ipomoea asarifolia* durchgeführt. Intention war die Suche nach Hinweisen auf endophytische Organismen. In Abbildung 4.22 werden die gefundenen Strukturen gezeigt.

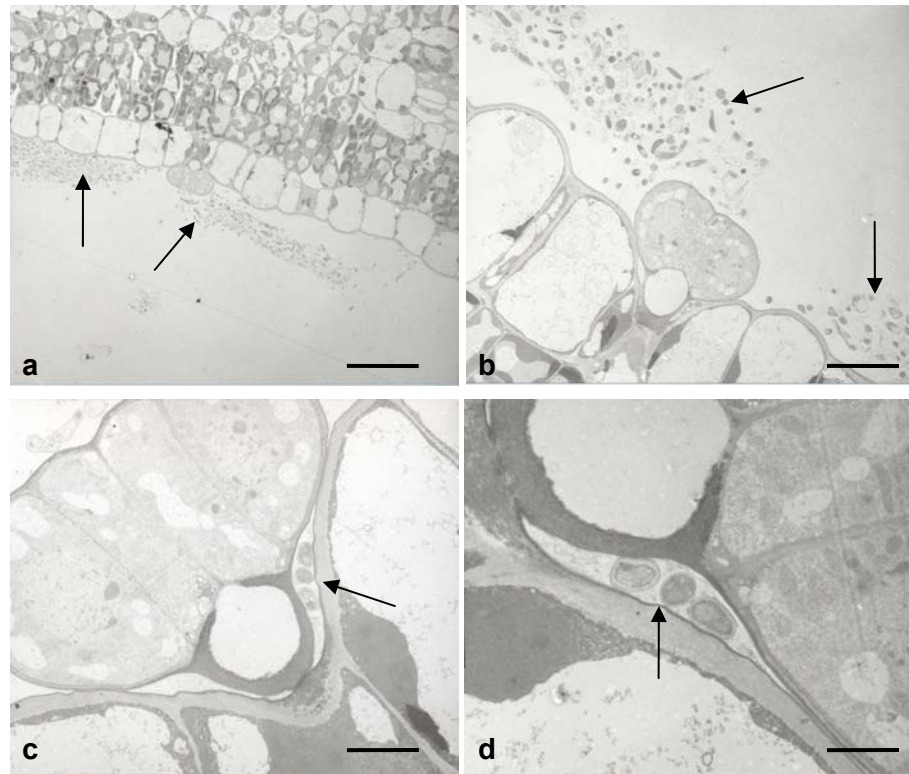


Abbildung 4.22 TEM-Aufnahmen der Blattzellen von *Ipomoea asarifolia* mit Pilzmycel; **a** von oben: Schwammparenchym, Palisadenparenchym, Epidermis mit Drüsenschuppe und aufliegendem Pilzmycel (Pfeile); **b**: Epidermis mit Drüsenschuppe und aufliegendem Pilzmycel (Pfeile); **c**: Pilzmycel zwischen der Stielzelle einer Drüsenschuppe und einer Epidermiszelle (Pfeil); **d**: Nahaufnahme von c; Balken: a = 20 μm ; b = 10 μm ; c = 5 μm ; d = 2 μm

Abbildung 4.22 zeigt TEM-Aufnahmen der Blattzellen von *Ipomoea asarifolia* mit Pilzmycel. In den Abbildungen a und b ist das Mycel von Iasa-F13 auf der Epidermis in Drüsenschuppennähe zu sehen (Pfeile). Endophytische Strukturen wurden in den zahlreichen Untersuchungen nicht gefunden. Die in den Parenchymzellen erkennbaren Strukturen sind Chloroplasten. Interessant war das häufige Vorkommen von Mycel zwischen den Stielzellen der Drüsenschuppen und den Epidermiszellen (c und d, Pfeil).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass vermutlich eine Vermehrung der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 in den Samen der Pflanzen erfolgt. Weitere Vermehrungsformen waren nicht nachweisbar. Das Vorkommen endophytischer Organismen in den Blättern der Pflanzen konnte als unwahrscheinlich gelten. Dennoch wird in den Abbildungen c und d deutlich, dass das Pilzmycel in sehr engem Kontakt zu den Drüsenschuppen steht. Ein fakultatives Eindringen der epibiontischen Pilze war nach wie vor nicht auszuschließen (vgl. 5.4.1).

Parallel zu den oben beschriebenen Versuchen wurde, im Rahmen zweier weiterer Doktorarbeiten, die Identität der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 sowie ihre Beteiligung an der Ergolinalkaloid Biosynthese auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Dazu war ein isoliertes Pilzmycel notwendig. Schon in früheren Untersuchungen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Möglichkeit gefunden, die Pilze zu isolieren.

4.4 Isolierung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 und Versuch der Pilzanzucht

Ein bisher noch nicht erwähntes Phänomen ist die enorme Pilzbesiedelung im Inneren junger Blattknospen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*. Das Mycel von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 ist hier mit bloßem Auge deutlich sichtbar (s. Abb. 4.23).

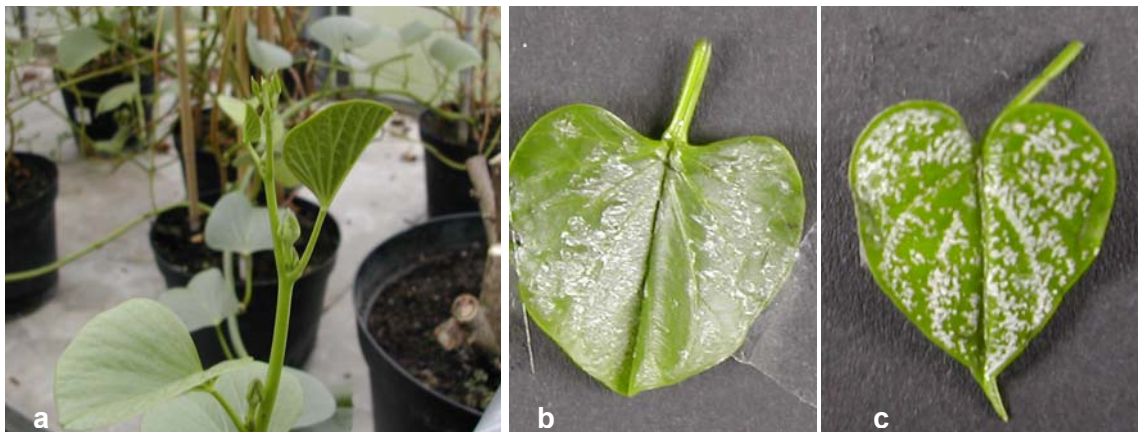


Abbildung 4.23 Junge Blattknospen; **a:** Geschlossene Blattknospe von *Ipomoea asarifolia*; **b:** Geöffnete Blattknospe von *Ipomoea asarifolia* mit Pilzmycel; **c:** Geöffnete Blattknospe von *Turbina corymbosa* mit Pilzmycel.

Die in den Abbildung 4.23 b und c gezeigte Myceldichte ist eine Besonderheit der jungen Blattknospen. Auf den ausgewachsenen Blättern ist das Mycel, mit wenigen Ausnahmen bei *T. corymbosa*, nur mikroskopisch sichtbar. Eine weitere Besonderheit der Blattknospen ist das geringe Infektionsrisiko durch fremde Sporen, da die Blätter noch fest verschlossen sind (s. Abb. 4.23 a). Diese Umstände ermöglichten eine Isolierung der epibiontischen Pilze.

Zur Pilzisolierung wurden die jungen Blattknospen von *I. asarifolia* bzw. *T. corymbosa* mit desinfizierten Händen (vgl. 2.4.2) vorsichtig geöffnet. Die Pilze wurden mit einem sterilisierten Spatel aus dem Inneren der jungen Blattknospen abgeschabt. Von 5 g Blattknospen konnten etwa 0,2 bis 0,3 g Mycel gewonnen werden.

Um die Pilzausbeute zu erhöhen, wurden Anzuchtversuche auf diversen Nährmedien (vgl. Tab. 2.6) durchgeführt. Einerseits wurde das Mycel wie oben beschrieben abgeschabt und mittels sterilisiertem Spatel auf die Agarplatten aufgebracht. Andererseits wurden die geöffneten Blattknospen mit der Innenseite vorsichtig auf die Agarplatten gedrückt und anschließend sofort wieder entfernt. Die Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und teilweise bei Raumtemperatur, teilweise bei 25 °C im Trockenschrank aufbewahrt. Die Platten wurden täglich kontrolliert.

Die Auswahl der Nährmedien erfolgte nach unterschiedlichen Kriterien (vgl. Tab. 4.9). Hauptsächlich boten sich Medien an, die für Ergolinalkaloid-bildende Pilze geeignet waren. Ein weiteres Auswahlkriterium war die Drüsenassoziation von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 und die damit verbundene Nähe zu den lipophilen Sekreten der Pflanzen. Ferner wurden Medien gewählt, die verschiedene Sekundärmetabolite der Pflanzen enthalten. Alle weiteren Nährmedien waren Standardmedien, die sich häufig bewährt haben.

Tabelle 4.9 Auswahlkriterien für Nährmedien zur Anzucht von *Iasa-F13* bzw. *Tcor-F01*

Nährmedien	Auswahlkriterien
Isolierungsmedium (Petrini et al. 1992)	bewährtes Standardmedium
Wachstumsmedium (Schulz et al. 1993)	bewährtes Standardmedium
Glucose-Citrat Agar (White, unveröffentlicht)	geeignet für Ergolinalkaloid-bildende Pilze
Paraffin Agar (White, Owens 1992)	geeignet für Ergolinalkaloid-bildende Pilze; lipophile Eigenschaft
Stärke-Milch Agar (White 1993)	geeignet für Ergolinalkaloid-bildende Pilze; Vorkommen von Stärke
Trypton-Glucose Agar (Lam et al. 1995)	geeignet für Ergolinalkaloid-bildende Pilze
Hefeextrakt Agar (Davis et al. 1986)	geeignet für Ergolinalkaloid-bildende Pilze

Flüssigmedium M102 (Rykard et al. 1982)	bewährtes Standardmedium
Kirsch Agar (CBS-Rezeptur)	Vorkommen von Fructose und Flavonoiden
Mais- bzw. Hafermehl Agar (Leuchtmann, Clay 1996)	geeignet für Ergolinalkaloid-bildende Pilze
Kartoffel-Karotten Agar (Leach 1962)	Vorkommen von Stärke und Carotinoiden

In den zahlreichen Anzuchtversuchen zeigte sich, dass die epibiontischen Pilze auf künstlichem Nährmedium nicht wachsen. In einigen Versuchen mit Paraffinagar gelang es, die Pilze ohne Verunreinigung auf dem Agar zu erhalten. Allerdings war zu keiner Zeit ein Wachstum erkennbar. In den meisten Fällen wurden die Pilze von auskeimenden *Penicillium*-Sporen überwachsen und im Keim erstickt. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich die *Penicillium*-Sporen an den Rändern der Blattknospen befinden. Ein kurzes Eintauchen der geschlossenen Blattknospen in Ethanol (96 %) half manchmal, diese Sporen zu beseitigen. Das Wachstum von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 konnte jedoch nicht erreicht werden. Ein weiterer Versuch war der Einsatz von Pflanzenhomogenat in Agar. Dazu wurden 10 g Blattmaterial von *I. asarifolia* bzw. *T. corymbosa* mittels Stabmixer (Braun, Küchengeräte) in 1 l Wasser homogenisiert, mit 15 g Agar versetzt und autoklaviert (vgl. 2.4.2). Die Anzucht von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 erfolgte wie oben beschrieben. Auch in diesem Versuch wurde ausschließlich das Wachstum von *Penicillium* beobachtet.

Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurde zudem versucht, die Pilze auf Kartoffel-Dextrose Agar und auf Malzmedium anzuziehen. Dabei wurden die gleichen Beobachtungen gemacht.

Das Ergebnis unterstützt erneut die schon unter 4.3.1 vermutete Abhängigkeit der Pilze vom pflanzlichen Stoffwechsel. Untersuchungen hierzu werden in Kapitel 4.7 beschrieben.

Die im Folgenden zusammengefassten molekularbiologischen Untersuchungen sowie der Inokulationsversuch (4.6) erfolgten mit dem abgeschabten Pilzmycel.

4.5 Zusammenfassung molekularbiologischer Ergebnisse zweier weiterer Doktorarbeiten zum Verständnis der vorliegenden Arbeit

Von Apothekerin Anne Markert und Diplom-Pharmazeutin Mahalia Ahimsa-Müller wurden parallel zu dieser Arbeit zwei weitere Doktorarbeiten zum Thema „Ergolinalkaloide und Pilzvorkommen in Convolvulaceen“ angefertigt.

Im Rahmen molekularbiologischer Untersuchungen wurde der Pilz Iasa-F13 mittels Sequenzierung der 18S-rDNA sowie der Internal-Transcribed-Spacer(ITS)-Regionen als Clavicipitaceen-Pilze identifiziert. Zudem konnte das einleitende Gen der Ergolinalkaloid-Biosynthese, das sog. dmaW-/cpd1-Gen, vollständig aus dem Pilz isoliert und sequenziert werden. Die Details wurden in Steiner et al. (2006) publiziert.

Gleiche Untersuchungen wurden mit dem Pilz Tcor-F01 durchgeführt. Es bestätigte sich, dass Iasa-F13 und Tcor-F01 eng miteinander verwandt sind. Die dmaW-/cpd1-Gensequenzen haben eine Ähnlichkeit von 92%, während die ITS-Regionen sowie die 18S-rDNA zu 100% übereinstimmen (Ahimsa-Müller et al. unveröffentlicht).

Mittels Single strand conformation polymorphism (SSCP) pilzlicher DNA aus den Blättern von *I. asarifolia* wurden neben dem Pilz Iasa-F13 geringe Mengen weiterer Pilze detektiert (Steiner et al. 2006). In pilzlicher DNA aus steril angezogenen Pflanzen bzw. Kalluskulturen von *I. asarifolia* ist jedoch ausschließlich eine Bande des Pilzes Iasa-F13 sichtbar.

Desweiteren wurden aus *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* zahlreiche Pilze isoliert, die aufgrund der Isolierungsmethode als Endophyten galten (vgl. 3.3.1). Da mittels TEM (vgl. 4.3.2.4) keine endophytischen Organismen gefunden wurden, lag die Vermutung nahe, dass auf den Pflanzen Pilzsporen überdauern, die der Oberflächensterilisation (vgl. 3.3.1) teilweise standhalten und auf Nährmedium auskeimen. Lichtmikroskopische Untersuchungen von *I. asarifolia* und *T. corymbosa* haben gezeigt, dass an den Blatträndern zahlreiche Pilzsporen vorkommen (vgl. auch 4.4).

Um die Bedeutung der isolierten Pilze zu überprüfen, wurden diese zum Teil identifiziert. Durch den Vergleich der 18S-rDNA sowie der Internal-Transcribed-Spacer(ITS)-Regionen isolierter und bekannter Pilze wurden die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse rekonstruiert (vgl. Steiner et al. 2006). Die neuen Sequenzen wurden in eine Internetdatenbank eingeladen.

Zum Sequenzvergleich diente das Programm „Blast-Search“ des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Basierend auf den Ergebnissen der phylogenetischen Untersuchungen wurden einige Pilzisolat im Rahmen dieser Arbeit für Inokulationsversuche ausgewählt.

4.6 Inokulationsversuche

Die Experimente wurden sowohl im Juni 2004 als auch im Juni 2005 mit 3 Monate alten pilz-/alkaloidfreien Stecklingspflanzen (vgl. 3.1.2) von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* begonnen. Um Fungizidrückstände bzw. Alkaloid- und Mycelreste bei *T. corymbosa* (vgl. 4.2.3.4) auszuschließen, wurden nur Pflanzen der 2. und 3. Stecklingsgeneration verwendet. Diese Pflanzen wurden künstlich mit diversen Pilzen infiziert.

Die Pilze waren teils eigene Isolate (vgl. Tab. 2.11) und teils bekannte Ergolinalkaloidbildner aus externen Quellen (vgl. Tab. 2.12). Die eigenen Isolate wurden aufgrund der phylogenetischen Untersuchungen (vgl. 4.5) exemplarisch ausgewählt. Neben den Clavicipitaceen-Pilzen war der Pilz Iasa-F09 (*Penicillium roquefortii*) besonders interessant, da er als Indolalkaloidbildner bekannt ist (Scott et al. 1976). Seine Fähigkeit, in vitro Indolalkaloide zu bilden, wurde in früheren Untersuchungen bereits überprüft (vgl. Dissertation J. Groß, 2004). Da die Pilzisolat von *Ipomoea asarifolia* stammten, erfolgten die Inokulationen ausschließlich mit dieser Pflanzenart. Die epibiontischen Pilze bildeten eine Ausnahme und werden unten gesondert aufgeführt. Die Pilze aus externen Quellen (*Balansia obtecta* und *Claviceps purpurea*) dienten als Kontrollvergleich.

Die als Dauerkulturen konservierten Pilze (vgl. 3.3.3) wurden auf Wachstumsmedium (vgl. Tab. 2.6) angezogen. Zur Inokulation von 10 Blättern einer Pflanze wurden je Pilz

200 mg gewachsenes Mycel in 3 ml Wasser suspendiert und in die Blattlamina injiziert bzw. auf diese aufgebracht. Im Folgenden ist das Inokulationsschema aufgeführt.

Eigene Pilzisolat (Nomenklatur siehe Tabelle 2.11):

Pflanze 1: Iasa-F09

Pflanze 2: Iasa-F03, Iasa-F06, Iasa-F08, Iasa-F09, Iasa-F10, Iasa-F12

Pflanze 3: Iasa-F03, Iasa-F08, Iasa-F10, Iasa-F12

Pflanze 4: Iasa-F06, Iasa-F08, Iasa-F09, Iasa-F10

Pflanze 5: Iasa-F06, Iasa-F08, Iasa-F09, Iasa-F12

Ergolinalkaloid-bildende Pilze aus externen Quellen (Herkunft siehe Tabelle 2.12):

Pflanze 6: *Balansia obtecta*

Pflanze 7: *Claviceps purpurea*

Das Pilzmycel von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 wurde unmittelbar vor der Inokulation aus den Blattknospen der beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* abgeschabt (vgl. 4.4). Zur Inokulation von 10 Blättern einer Pflanze wurden 200 mg abgeschabtes Mycel (ca. 5 g Blattknospen) in 3 ml Wasser suspendiert und in die Blattlamina injiziert bzw. auf diese aufgebracht. Von beiden Pflanzenarten wurden je 4 pilz-/alkaloidfreie Pflanzen künstlich infiziert.

Das Ziel der Versuche war die Etablierung der Pilze sowie die mögliche Neubildung von Ergolinalkaloiden. Damit sollte überprüft werden, ob neben den Epibionten eventuell weitere Organismen bei der Ergolinalkaloidbildung in den Pflanzen eine Rolle spielen. Desweiteren war interessant ob Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 auf diesem Wege übertragbar waren. Bisherige Versuche haben gezeigt, dass die Pilze über die vegetativen Pflanzenteile nicht verbreitet werden konnten (vgl. 4.3.2.1 und 4.3.2.3).

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, führte die 18wöchige Behandlung mit spezifischen Fungiziden zur vollständigen (vgl. 4.1.1 und 4.2.1) bzw. fast vollständigen (vgl. 4.2.3.3 und 4.2.3.4) Eliminierung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01. Dies waren die einzigen Erfahrungswerte bezüglich der Bindung der Pilze an die Pflanzen. Daher wurde eine Inkubationszeit von 18 Wochen gewählt. In dieser Zeit wurde der Zustand der Pflanzen regelmäßig kontrolliert. Die mit den Pilzen aus externen Quellen angeimpften Pflanzen Nr. 6 und 7 haben schon nach 4 bis 5 Wochen sämtliche Blätter verloren. Auf den abgeworfenen nekrotischen Blättern wurden lichtmikroskopisch keine Pilze gefunden.

Alle weiteren Pflanzen waren durchweg in gutem Zustand. In Anlehnung an die „Attachment-Versuche“ (vgl. 4.3.2.1) erfolgte die erste lichtmikroskopische Analyse (vgl. 3.5.1) nach 10 Wochen. Nach insgesamt 18 Wochen wurden die Pflanzen in gleichen Teilen geerntet und extrahiert (vgl. 3.4.1). Das Alkaloidvorkommen wurde mittels DC (vgl. 3.4.3) und UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) überprüft. Von jeder Pflanze wurden einige Blätter zur zweiten lichtmikroskopischen Untersuchung (vgl. 3.5.1) verwahrt.

Das Ergebnis der lichtmikroskopischen Analysen war bei den Pflanzen Nr. 1, 2, 4 und 5 einheitlich: Sowohl nach 10 Wochen, als auch nach 18 Wochen waren die Pflanzen dicht mit *Penicillium* besiedelt (s. Abb. 4.24). Die Pflanze Nr. 3 blieb ohne Pilzbesiedelung. Alle mit Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 inokulierten Pflanzen der beiden Pflanzenarten *I. asarifolia* bzw. *T. corymbosa* blieben ebenfalls symptomlos. In keiner der untersuchten Pflanzen waren Ergolinalkaloide detektierbar.

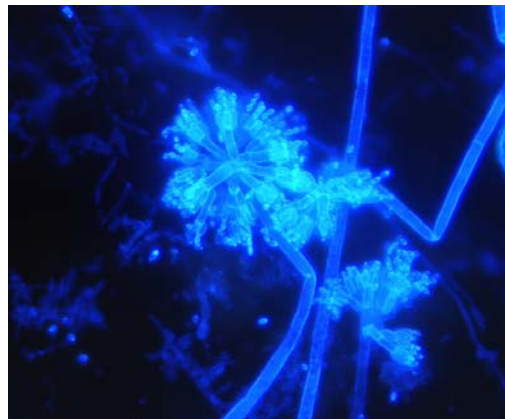


Abbildung 4.24 Typische Pinselform der Konidien von *Penicillium* auf der Blattoberfläche von *Ipomoea asarifolia* nach Inokulation (vgl. Text); Lichtmikroskopische Aufnahme (1000fach) nach Fluoreszenzanfärbung mit Calcofluor.

Auffällig war, dass sich auf allen Pflanzen, die mit Iasa-F09 (*Penicillium roquefortii*) inokuliert wurden, *Penicillium* etablieren konnte. Wie oben erwähnt, galt Iasa-F09 aufgrund seiner Fähigkeit, Indolalkaloide zu bilden, als besonders interessant. Eine Alkaloidbildung in den Pflanzen ist jedoch nicht erfolgt. Vermutungen und Beobachtungen zu diesem Ergebnis werden unter 5.6 diskutiert.

Die mit *Balansia obtecta* und *Claviceps purpurea* inokulierten Pflanzen Nr. 6 und 7 haben dem Zugriff der Pilze auf das Blattgewebe nicht standgehalten. Die Pilze

gehören zur Familie der Clavicipitaceen und sind damit Verwandte von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01. Allerdings sind beide Pilze Endophyten und besiedeln monokotyle Poaceen. Das mit Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 erzielte Ergebnis war erwartungsgemäß. Zum Einen haben bisherige Untersuchungen gezeigt, dass sich die Pilze nicht über die vegetativen Pflanzenteile verbreiten lassen (vgl. 4.3.2.1 und 4.3.2.3), zum Anderen stimmen die Beobachtungen mit Literaturhinweisen zu Untersuchungen an Clavicipitaceen-Pilzen überein (vgl. 5.4.2).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bisher nur die Clavicipitaceen-Pilze als potenzielle Ergolinalkaloidproduzenten in den Convolvulaceen in Frage kommen. Diese Pilze sind zudem die einzigen, die ohne experimentelle Infektion mikroskopisch auf den Pflanzen nachgewiesen werden konnten. Wie bereits unter 4.5 vermutet, scheinen weitere Pilzisolat aus Sporenablagerungen zu stammen. Diese Vermutung wird unter Berücksichtigung der molekularbiologischen Ergebnisse in Kapitel 5.6 diskutiert.

Nachdem nun detailliert untersucht worden war, ob die epibiontischen Pilze für die Ergolinalkaloidbildung in den Pflanzen verantwortlich bzw. mitverantwortlich sind, haben sich weitere Experimente mit den „Bedürfnissen“ der Pilze beschäftigt.

4.7 Versuche zur Bindung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 an den pflanzlichen Stoffwechsel

Die spezifische Bindung der Clavicipitaceen-Pilze an die Pflanzen war ein bisher ungeklärtes Phänomen. Alles deutete darauf hin, dass die Pilze bestimmte pflanzliche Eigenschaften für ihr Wachstum und ihre Produktivität benötigen. In Kapitel 4.3.1 wurde gezeigt, dass unter sterilen Bedingungen zwar Pilz- und Alkaloidvorkommen miteinander korrelieren, nicht aber Pilz- und Alkaloidquantität. Desweiteren sind die „in vitro-Anzucht“ (vgl. 4.4) sowie die experimentelle Übertragung (vgl. 4.3.2.1, 4.3.2.3 und 4.6) der Pilze anscheinend nicht möglich. Die Symbiose zwischen Pflanze und Pilz scheint auf ganz sensiblen Grundlagen aufzubauen. Aufgabe der folgenden Experimente war die nähere Bestimmung dieser grundlegenden Faktoren.

4.7.1 Untersuchungen zum Einfluss von pflanzlichen Wachstumsfaktoren

Die Experimente wurden im Juni 2005 mit 3 Monate alten Stecklingspflanzen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* begonnen. Es wurden ausschließlich pilz- und alkaloidführende Pflanzen eingesetzt. Die Versuche sollten zeigen, ob die Veränderung von Licht- bzw. Nährstoffangebot Einfluss auf die Pflanze-Pilz-Interaktionen hat.

4.7.1.1 Veränderung des Lichtangebots

Je 4 pilz-/alkaloidführende Pflanzen der beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* wurden im Gewächshaus aufgestellt und mit Polyesternetzen dauerhaft schattiert. Weitere 4 Pflanzen beider Arten wurden im Tageslicht des gleichen Gewächshauses aufgestellt. Sie waren zu keiner Zeit schattiert. Zur Messung der Lichtintensität stand ein Luxmeter zur Verfügung. In Tabelle 3.1 sind die durchschnittlichen Messwerte zu unterschiedlichen Zeiten aufgeführt.

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, führte die 18wöchige Behandlung mit spezifischen Fungiziden zur vollständigen (vgl. 4.1.1 und 4.2.1) bzw. fast vollständigen (vgl. 4.2.3.3 und 4.2.3.4) Eliminierung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01. Dies waren die einzigen Erfahrungswerte bezüglich der Bindung der Pilze an die Pflanzen. Daher wurde wiederum eine Inkubationszeit von 18 Wochen gewählt. In dieser Zeit wurde der Zustand der Pflanzen regelmäßig kontrolliert. Sowohl im Licht, als auch im Schatten waren alle Pflanzen der beiden Arten zunächst in gutem Zustand. Die *Turbina*-Pflanzen wuchsen im Schatten allerdings deutlich schneller und kräftiger, als die *Ipomoea*-Pflanzen. Nach etwa 10 Wochen blieben die *Ipomoea*-Pflanzen auffällig im Wuchs zurück und wurden anfällig für Blattläuse. Die Pflanzen überdauerten in mäßigem Zustand. Die *Turbina*-Pflanzen waren dagegen bis zum Schluss in auffällig gutem Zustand. Nach 18 Wochen wurden alle Pflanzen in gleichen Teilen geerntet und extrahiert (vgl. 3.4.1). Die Einwaage betrug jeweils 10 g Stängel und 10 g Blätter. Das Alkaloidvorkommen wurde mittels DC (vgl. 3.4.3), UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) und HPLC-MS (vgl. 3.4.5) überprüft. Von jeder Pflanze wurden einige Blätter zur lichtmikroskopischen Untersuchung (vgl. 3.5.1) verwahrt.

Die Ergebnisse werden mit den Ergebnissen der Veränderung des Nährstoffangebots (4.7.1.2) unter 4.7.1.3 dargestellt.

4.7.1.2 Veränderung des Nährstoffangebots

Die Pflanzen wurden in unterschiedlicher Intensität mit dem Langzeitdünger Plantosan® (vgl. 2.1.3) versorgt.

Je 4 pilz-/alkaloidführende Pflanzen der beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* wurden bei Versuchsbeginn mit 2 g Plantosan® pro Topf (1 g/l Substrat) gedüngt. Anschließend wurden sie 2mal alle 8 Wochen ohne zusätzliche Düngung umgetopft. Weitere 4 Pflanzen beider Arten wurden ebenfalls bei Versuchsbeginn mit 2 g Plantosan® pro Topf (1 g/l Substrat) gedüngt. Zusätzlich wurden sie 2mal alle 8 Wochen beim Umtopfen mit 3,5 g Plantosan® pro Topf (1,5 g/l Substrat) gedüngt (vgl. Tab. 3.2). Die Pflanzen wurden im Gewächshaus aufgestellt. Im Gegensatz zu den „Lichtpflanzen“ (vgl. 4.7.1.1) standen sie aufgrund eines Baumes nachmittags im Schatten.

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, führte die 18wöchige Behandlung mit spezifischen Fungiziden zur vollständigen (vgl. 4.1.1 und 4.2.1) bzw. fast vollständigen (vgl. 4.2.3.3 und 4.2.3.4) Eliminierung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01. Dies waren die einzigen Erfahrungswerte bezüglich der Bindung der Pilze an die Pflanzen. Daher wurde wiederum eine Inkubationszeit von 18 Wochen gewählt. In dieser Zeit wurde der Zustand der Pflanzen regelmäßig kontrolliert. Alle Pflanzen der beiden Arten waren durchweg in gutem Zustand. Auffällig war das schnelle und kräftige Wachstum der *Turbina*-Pflanzen ohne zusätzliche Nährstoffversorgung. Nach 18 Wochen wurden alle Pflanzen in gleichen Teilen geerntet und extrahiert (vgl. 3.4.1). Die Einwaage betrug jeweils 10 g Blätter und 10 g Stängel. Das Alkaloidvorkommen wurde mittels DC (vgl. 3.4.3), UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) und HPLC-MS (vgl. 3.4.5) überprüft. Von jeder Pflanze wurden einige Blätter zur lichtmikroskopischen Untersuchung (vgl. 3.5.1) verwahrt.

Die Ergebnisse werden mit den Ergebnissen der Veränderung des Lichtangebots (4.7.1.1) unter 4.7.1.3 dargestellt.

4.7.1.3 Ergebnisse zur Veränderung von Licht- und Nährstoffangebot

Der Vergleich des Gesamtalkaloidgehalts der verschiedenen Versuchsgruppen aus 4.7.1.1 und 4.7.1.2 erfolgte mittels UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) und wird in Abbildung 4.25 in Form eines Säulendiagramms dargestellt.

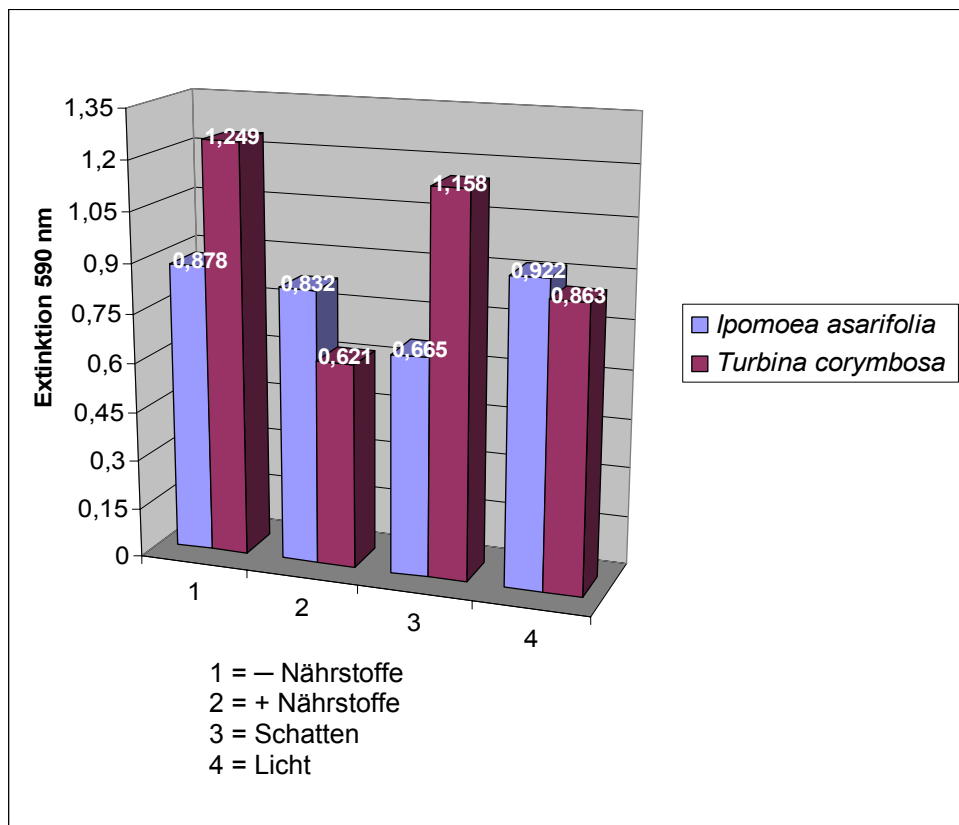


Abbildung 4.25 Photometrische Messung nach einer Methode von Van Urk: Darstellung der Alkaloidproduktion (ausgedrückt als Extinktion bei 590 nm) in den Versuchsgruppen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* nach Veränderung des Licht- bzw. Nährstoffangebots (vgl. Text); **blaue Säulen:** *Ipomoea asarifolia*, **rote Säulen:** *Turbina corymbosa*; **1:** ohne zusätzliche Nährstoffversorgung, **2:** mit zusätzlicher Nährstoffversorgung, **3:** Schatten, **4:** Licht.

Wie dem Säulendiagramm zu entnehmen ist, ist die Alkaloidproduktion innerhalb der Versuchsgruppen von *Ipomoea asarifolia* weniger unterschiedlich, als innerhalb der Versuchsgruppen von *Turbina corymbosa*.

Bei *I. asarifolia* ist eine geringere Alkaloidproduktion in den „Schattenpflanzen“ (vgl. 4.7.1.1) erkennbar.

Dagegen fallen bei *T. corymbosa* die „Schattenpflanzen“ (vgl. 4.7.1.1) sowie die Pflanzen ohne zusätzliche Nährstoffversorgung (vgl. 4.7.1.2) durch besonders hohen Alkaloidgehalt auf. Die geringste Alkaloidproduktion erfolgte in den mit zusätzlichen Nährstoffen versorgten *Turbina*-Pflanzen (vgl. 4.7.1.2).

Bei ständiger Lichtzufuhr ohne jeglichen Schatten (vgl. 4.7.1.1) ist die Alkaloidproduktion in den beiden Pflanzenarten ähnlich.

Ein weiterer Vergleich des Alkaloidvorkommens erfolgte mittels DC (vgl. 3.4.3). In Abbildung 4.26 sind die DC-Chromatogramme der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt.

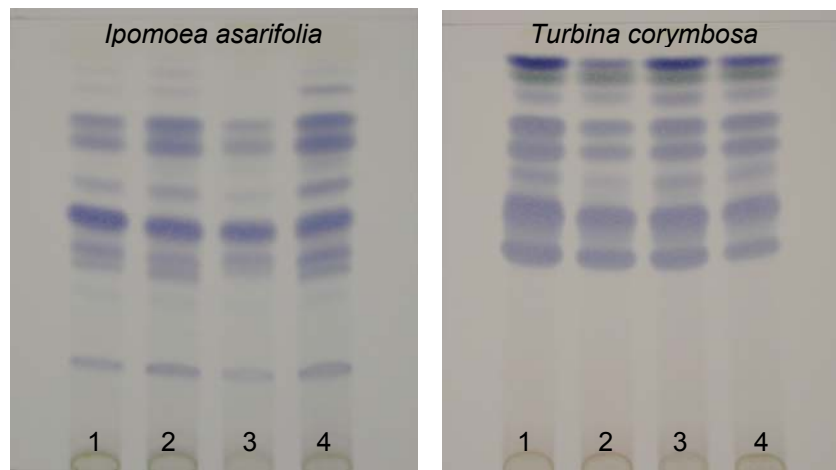


Abbildung 4.26 DC-Chromatogramme der Ergolinalkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (je 100 µl) nach Veränderung des Licht- bzw. Nährstoffangebots (vgl. Text); zur Identifizierung der Alkaloide vgl. 4.2.3.1; 1: ohne zusätzliche Nährstoffversorgung, 2: mit zusätzlicher Nährstoffversorgung, 3: Schatten, 4: Licht.

Die aus der photometrischen Messung hervorgehenden Tendenzen sind auch in den DC-Chromatogrammen sichtbar. Bei *I. asarifolia* ist das geringe Alkaloidvorkommen in den „Schattenpflanzen“ deutlich erkennbar. Bei *T. corymbosa* fällt vor allem der hohe Alkaloidgehalt in den Pflanzen ohne zusätzliche Nährstoffversorgung auf.

Insgesamt zeigen die Chromatogramme, dass in jeder Versuchsgruppe, unabhängig von der Quantität, alle bekannten Alkaloide vorkommen (vgl. 4.2.3.1). Die detaillierte Untersuchung der einzelnen Alkaloide erfolgte mittels HPLC-MS (s. unten).

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen (vgl. 3.5.1) zum Vorkommen der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 auf den Pflanzen haben Folgendes ergeben:

Bei *I. asarifolia* war die schwache Pilzbesiedelung der „Schattenpflanzen“ im Vergleich zu den „Lichtpflanzen“ auffällig. Bei *T. corymbosa* sind die Pflanzen ohne zusätzliche Nährstoffversorgung durch besonders starke Pilzbesiedelung aufgefallen. Alle weiteren Pflanzengruppen waren wie gewohnt besiedelt (vgl. Abb. 4.4 und 4.7 b).

In Tabelle 4.10 wird die Korrelation von Pilzvorkommen, Gesamtalkaloiden und Pflanzenzustand (vgl. 4.7.1.1 und 4.7.1.2) zusammengefasst und verglichen.

Tabelle 4.10 Vergleich von Alkaloidvorkommen, Pilzbesiedelung und Pflanzenzustand der Versuchsgruppen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* nach Veränderung des Licht- bzw. Nährstoffangebots (vgl. Text).

Versuchsgruppe	Alkaloidvorkommen 1: niedrig 2: durchschnittlich 3: hoch	Pilzbesiedelung 1: schwach 2: durchschnittlich 3: stark	Pflanzenzustand 1: mäßig 2: gut 3: sehr gut
<i>Ipomoea asarifolia</i> – Nährstoffe	2	2	2
<i>Ipomoea asarifolia</i> + Nährstoffe	2	2	2
<i>Ipomoea asarifolia</i> Schatten	1	1	1
<i>Ipomoea asarifolia</i> Licht	2	2	2
<i>Turbina corymbosa</i> – Nährstoffe	3	3	3
<i>Turbina corymbosa</i> + Nährstoffe	1	2	2
<i>Turbina corymbosa</i> Schatten	3	2	3
<i>Turbina corymbosa</i> Licht	2	2	2

Anmerkung: Die Bewertungsskala von 1 bis 3 wurde zur Vereinfachung des Vergleichs gewählt. Genauere Angaben werden im Text gemacht.

Der tabellarische Vergleich von Alkaloidgehalt, Pilzvorkommen und Zustand der Pflanzen macht die Korrelation dieser 3 Größen deutlich. Bei *I. asarifolia* ist in jeder Versuchsgruppe eine 100 %ige Korrelation der 3 Größen vorhanden. Bei *T. corymbosa* gibt es zwei Abweichungen: Die Pflanzen mit zusätzlicher Nährstoffversorgung führen trotz durchschnittlicher Pilzbesiedelung und gutem Pflanzenzustand nur wenig Alkaloide. Die „Schattenpflanzen“ führen überdurchschnittlich viele Alkaloide bei sehr gutem Pflanzenwachstum, sind jedoch nur durchschnittlich mit Pilz besiedelt. Die Abweichungen beschränken sich in beiden Fällen auf eine Größe und eine Ziffer der Bewertungsskala, so dass auch bei *T. corymbosa* deutliche Korrelationen erkennbar sind.

Um noch detailliertere Auskünfte über die Zusammenhänge zu bekommen, wurde das Vorkommen einzelner Alkaloide mittels HPLC-MS untersucht. In den Abbildungen 4.27 (*I. asarifolia*) und 4.28 (*T. corymbosa*) werden die Alkaloidfraktionen in Form von sog. Multiple-Ion-Chromatogrammen miteinander verglichen.

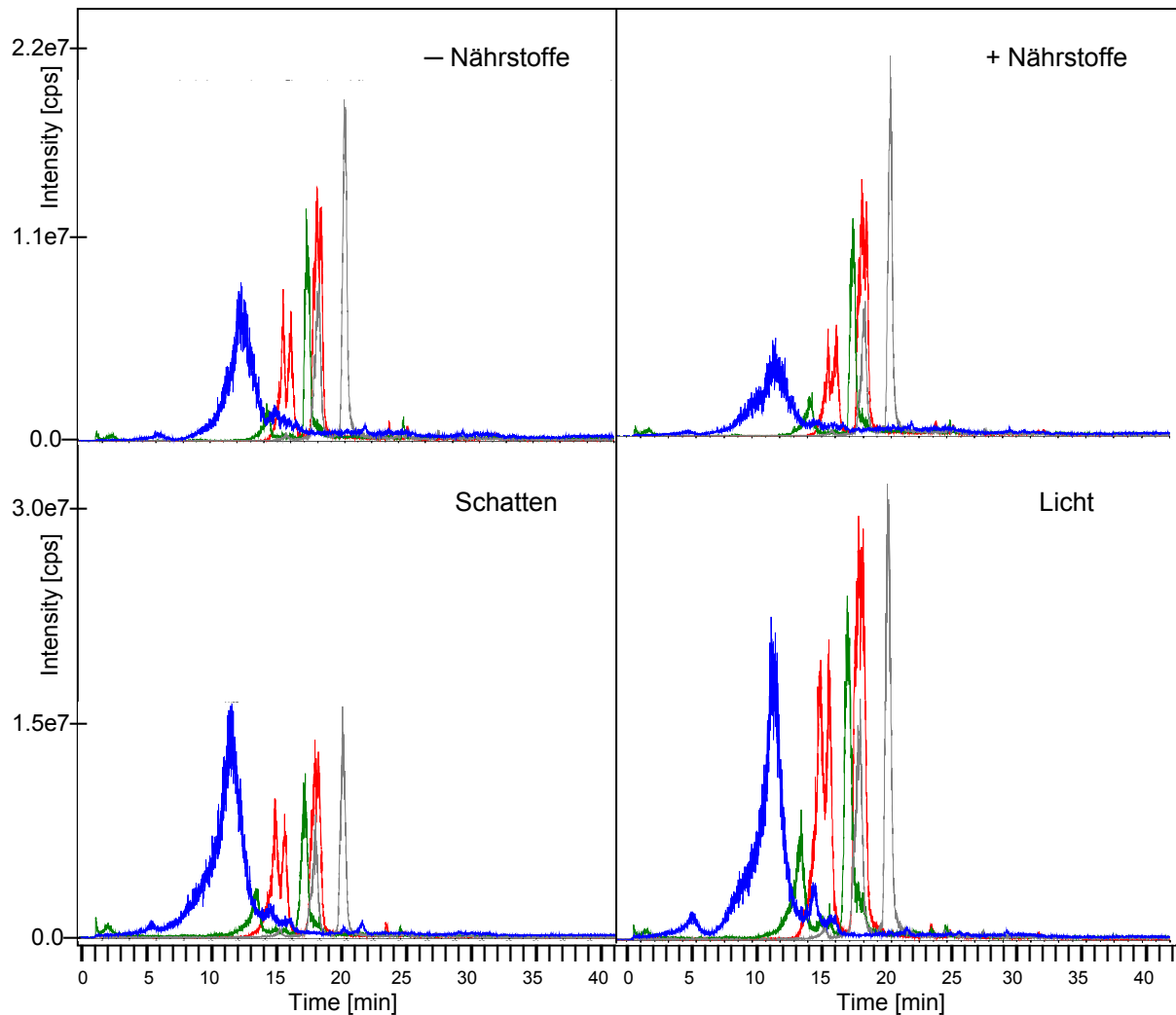
Ipomoea asarifolia

Abbildung 4.27 HPLC-MS Messung (DAD zwischen 275 und 315 nm) der Ergolinalkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia* (je 20 μ l) nach Veränderung des Licht- bzw. Nährstoffangebots (vgl. Text); Darstellung in Form von Multiple-Ion-Chromatogrammen; **blau** (11 min): Chanoclavin, **grün** (13,5 min): Lysergsäureamid, **grün** (17 min): Isolysergsäureamid, **rot** (14,5 min): Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (15,5 min): Isolysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (17,5 und 18,5 min): weitere Isoformen von Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **grau** (20 min): Ergonovin, **grau** (18 min): Isoform von Ergonovin.

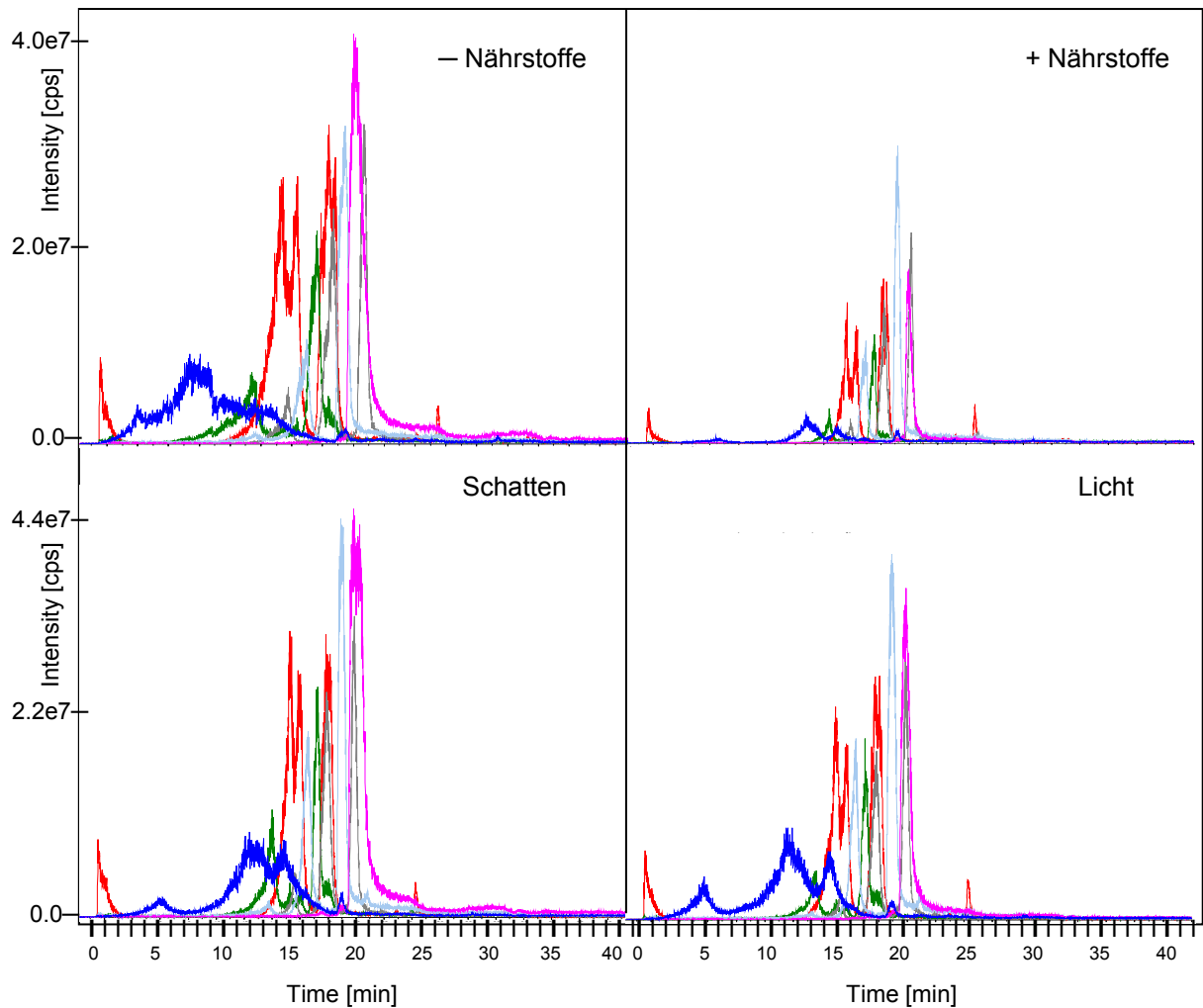
Turbina corymbosa

Abbildung 4.28 HPLC-MS Messung (DAD zwischen 275 und 315 nm) der Ergolinalkaloidfraktionen von *Turbina corymbosa* (je 20 μ l) nach Veränderung des Licht- bzw. Nährstoffangebots (vgl. Text); Darstellung in Form von Multiple-Ion-Chromatogrammen; **blau** (11 min): Chanoclavin, **blau** (5,5 und 14,5 min): unbekannt, **grün** (13,5 min): Lysergsäureamid, **grün** (17 min): Isolysergsäureamid, **rot** (14,5 min): Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (15,5 min): Isolysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (17,5 und 18,5 min): weitere Isoformen von Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **grau** (20 min): Ergonovin, **grau** (18 min): Isoform von Ergonovin, **hellblau** (19 min): Elymoclavin, **hellblau** (16,5 min): Isoform von Elymoclavin, **pink** (20 min): Agroclavin.

Die Abbildungen 4.27 und 4.28 zeigen Multiple-Ion-Chromatogramme der Ergolinalkaloidfraktionen von *I. asarifolia* bzw. *T. corymbosa* nach Veränderung von Licht- bzw. Nährstoffangebot. Die Messung erfolgte mittels HPLC-MS (vgl. 3.4.5), wie unter 4.2.3.1 beschrieben. In den Multiple-Ion-Chromatogrammen wird die Intensität des Gesamtzerfalls der Ergolinalkaloidmoleküle dargestellt. Dazu wurden die Zerfallsprodukte (Molekülionen) im Anschluss an die Messung durch Eingabe der Molekulargewichte (vgl. Tab. 4.4) in die Auswertungssoftware (vgl. 3.4.5) extrahiert. Die Alkaloide sind farblich voneinander zu unterscheiden. Der Farbenschlüssel befindet sich unter den Abbildungen. Die Darstellungen sollen das quantitative Verhältnis der Alkaloide zueinander und die daraus entstehenden „Alkaloidmuster“ zeigen.

In allen Alkaloidfraktionen von *I. asarifolia* und *T. corymbosa* ist das Verhältnis von Lysergsäureamid und Isolysergsäureamid (grüne Peaks), von Ergonovin und seiner Isoform (graue Peaks) sowie von Lysergsäure α -hydroxyethylamid, Isolysergsäure α -hydroxyethylamid und den unbekanntenen Isoformen (rote Peaks) relativ beständig.

Bei den *Ipomoea*-Fraktionen des Nährstoffversuchs (vgl. 4.7.1.2) ist der Anteil der beiden Alkaloide Lysergsäure α -hydroxyethylamid (rot 14,5 min) und Isolysergsäure α -hydroxyethylamid (rot 15,5 min) verhältnismäßig niedrig, dies allerdings zugunsten von Ergonovin (grau 18 min). Die Biosynthese der Lysergsäureamide erfolgt offensichtlich in einem geregelten Verhältnis, unabhängig vom Gesamtalkaloidgehalt.

Die Clavinalkaloide Chanoclavin (blau 11 min), Elymoclavin (hellblau 19 min) und Agroclavin (pink 20 min) unterliegen dagegen größeren Schwankungen.

In der *Ipomoea*-Fraktion der „Schattenpflanzen“ (vgl. 4.7.1.1) ist der Chanoclavinanteil besonders hoch. In der Fraktion mit zusätzlicher Nährstoffversorgung (vgl. 4.7.1.2) ist er dagegen, im Vergleich zu den Lysergsäureamiden, verhältnismäßig niedrig. Elymoclavin und Agroclavin wurden in den Ergolinalkaloidfraktionen von *I. asarifolia* nicht detektiert.

In den *Turbina*-Fraktionen wurde nur sehr wenig Chanoclavin detektiert. Dagegen sind die Anteile von Elymoclavin und Agroclavin besonders hoch. Das Verhältnis dieser beiden Alkaloide scheint keiner Regelmäßigkeit zu unterliegen.

Als mögliche Regelmäßigkeit kann der hohe Chanoclavinanteil in der „Schattenpflanzen“-Fraktion von *I. asarifolia* und der hohe Elymoclavinanteil in der Fraktion mit zusätzlicher Nährstoffversorgung von *T. corymbosa* gedeutet werden. Beide Fraktionen enthalten besonders wenig Gesamtalkaloide (s. Abb. 4.25).

Abschließend kann festgehalten werden, dass zwischen Alkaloidvorkommen, Pilzbesiedelung und Pflanzenwachstum eindeutige Zusammenhänge bestehen (vgl. Tab. 4.10). Die künstliche Beeinflussung pflanzlicher Ressourcen verändert die Stoffwechselaktivität der Pflanzen. Diese hat offensichtlich eine limitierende bzw. anregende Wirkung auf Pilzwachstum und Biosynthesetätigkeit. Die Änderung der Biosynthesetätigkeit äußert sich hauptsächlich in der Veränderung des Gesamtalkaloidgehalts (s. Abb. 4.25), weniger im Verhältnis der Einzelalkaloide. Gewisse Schwankungen sind bei der Biosynthese der Clavinalkaloide erkennbar (s. Abb. 4.27 und 4.28).

Die Bedeutung des pflanzlichen Stoffwechsels für Pilzwachstum und Biosyntheseaktivität wird in Kapitel 5.7.1 diskutiert.

4.7.2 Untersuchung von Pilz- und Alkaloidvorkommen in pflanzlichen Zellkulturen

Die Anlage von sterilen Kallus- und Suspensionskulturen war sowohl für *Ipomoea asarifolia*, als auch für *Turbina corymbosa* etabliert (vgl. 3.2.1). Im Rahmen der Doktorarbeit von Y. Hussein (2003) wurde bereits festgestellt, dass die Zellkulturen beider Pflanzenarten keine Alkaloide enthalten. Für den Zusammenhang von Pilzvorkommen, Alkaloidgehalt und Stoffwechsel der Pflanzen war es nun interessant, das Vorkommen der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 in den Zellen zu überprüfen.

Von *I. asarifolia* wurden 4 Zellproben lichtmikroskopisch untersucht (vgl. 3.5.1). Von *T. corymbosa* standen aufgrund einer *Penicillium*-Infektion zur Zeit der Untersuchung keine Kallus- bzw. Suspensionskulturen zur Verfügung.

In 3 von 4 Zellproben wurden wenige Pilzhyphen gefunden, die dem Pilz Iasa-F13 ähnelten (s. Abb. 4.29). Zudem wurden die Internal-Transcribed-Spacer(ITS)-Regionen des Pilzes von Diplom-Pharmazeutin Mahalia Ahimsa-Müller im Rahmen ihrer Doktorarbeit in den Zellkulturen detektiert (vgl. Steiner et al. 2006).

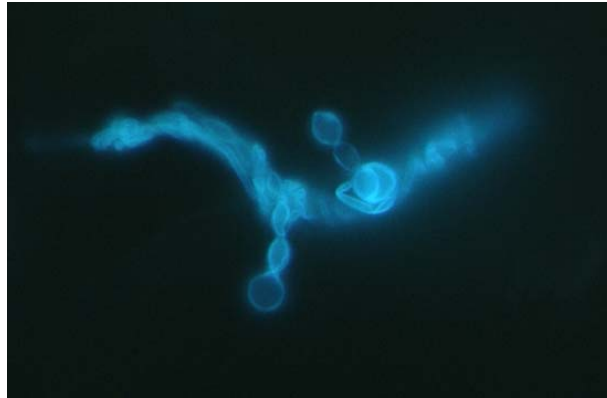


Abbildung 4.29 Pilzzellen in einer sterilen Zellkultur von *Ipomoea asarifolia*; Lichtmikroskopische Aufnahme (1000fach) nach Fluoreszenzanfärbung mit Calcofluor.

Der Pilz Iasa-F13 ist somit in den künstlich gewachsenen Zellen der Pflanzen vorhanden. Er ist detektierbar, zeigt jedoch keine typischen Charakteristika wie Kolonienbildung und Alkaloidproduktion. Da der Energiehaushalt vereinzelter Zellen wesentlich einfacher ist, als der eines vollständigen Organismus spricht dies ein weiteres Mal für die Abhängigkeit der epibiontischen Pilze von der pflanzlichen Physiologie. Auch biochemische, anatomische und morphologische Voraussetzungen können eine Rolle spielen.

4.7.3 Veränderung des Lichtspektrums bei der Anzucht steriler Pflanzen

In Kapitel 4.3.1 wird bereits die Anzucht steriler Pflanzen beschrieben. Dabei zeigte sich, dass die Pflanzen trotz keimfreier Anzucht pilz- und alkaloidführend waren. Allerdings war es nicht möglich, auch nur annähernd eine Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Myceldichte nachzuweisen. Dies warf die Frage auf, ob den epibiontischen Pilzen im Erlenmeyerkolben bestimmte pflanzliche Eigenschaften fehlten. Im Falle einer engen Bindung der Pilze an den pflanzlichen Stoffwechsel wäre dies durchaus denkbar. Vermutet wurde ein Zusammenhang mit dem Lichtspektrum des künstlichen Lichts. Bisher wurden Standardleuchten mit weißem Dauerlicht eingesetzt (vgl. 2.4.4). Pflanzen benötigen jedoch hauptsächlich Licht aus dem roten und blauen Spektralbereich. Dieses Licht ist den photobiologischen Prozessen besonders gut angepasst und fördert dadurch das Pflanzenwachstum. Daher wurde die Anzucht steriler Pflanzen in einem solchen Licht eingeleitet (vgl. 2.4.4).

Hierfür bot sich die bereits etablierte Methode der Pflanzenregeneration an (vgl. 3.2.2). Wie unter 4.7.2 dargestellt, enthalten die Kalluskulturen von *I. asarifolia* und *T. corymbosa* keine Alkaloide (vgl. Dissertation Y. Hussein 2003), aber sie enthalten den Clavicipitaceen-Pilz (vgl. Steiner et al. 2006). Daher war es nun interessant, ob sich aus dem Zellgewebe Pflanzen regenerieren ließen, die sowohl Alkaloide als auch Pilz enthielten.

Das Ergebnis war positiv: Ergolinalkaloide und Mycel waren deutlich nachweisbar. Dies zeigte, dass für die Alkaloidbildung eine intakte Pflanze notwendig ist (vgl. 5.7.3).

Die weiteren Untersuchungen haben die Korrelation von Alkaloidgehalt und Pilzdichte überprüft: Zur Regeneration steriler Pflanzen wurde auf steriles Pflanzenmaterial von *Ipomoea asarifolia* zurückgegriffen (vgl. 3.1.6); die Regeneration von *Turbina*-Pflanzen ist bisher nicht gelungen. Die Anzucht erfolgte in einem Kulturraum (vgl. 2.4.4) in rot-blauem Dauerlicht (Ø 2670 Lux) bei einer gleichbleibenden Temperatur von 25 °C. Die unter diesen Bedingungen herangewachsenen Pflanzen wurden dann, zur Erhöhung der Pflanzenausbeute, mittels Stecklingsanzucht vermehrt.



Abbildung 4.30 Regeneration von *Ipomoea asarifolia* aus sterilen Blatt- und Stängelstücken (vgl. 3.2.2); **a**: aufgelegte Pflanzenteile und Bildung des ersten Kallus; **b**: differenzierter Kallus; **c**: Spross- und Wurzelbildung.

Das Wachstum der Pflanzen wurde durch das rot-blaue Lichtspektrum sichtbar beschleunigt. Die meisten Pflanzen waren in durchschnittlich gutem Zustand. Einige Pflanzen entwickelten, im Vergleich zu anderen Sterilpflanzen, ungewöhnlich große Blätter. Sowohl regenerierte Pflanzen, als auch Stecklinge wurden geerntet, sobald sie etwa 15 bis 20 cm groß und gut beblättert waren. Die besonders wüchsigen Pflanzen und die durchschnittlich wachsenden Pflanzen wurden getrennt eingefroren und später extrahiert (vgl. 3.4.1). Zur Extraktion wurden drei gleich große Gruppen gebildet: 2 Gruppen mit durchschnittlich gewachsenen Pflanzen und 1 Gruppe mit besonders

wüchsigen Pflanzen. Die Einwaage betrug jeweils 9 g Blätter und 28 g Stängel. Das Alkaloidvorkommen wurde mittels UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) und HPLC-MS (vgl. 3.4.5) überprüft. Von jeder Gruppe wurden 10 Blätter zur lichtmikroskopischen Untersuchung (vgl. 3.5.1) verwahrt.

Der Vergleich des Gesamtalkaloidvorkommens der verschiedenen Pflanzengruppen erfolgte mittels UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) und wird in Abbildung 4.31 in Form eines Säulendiagramms dargestellt.

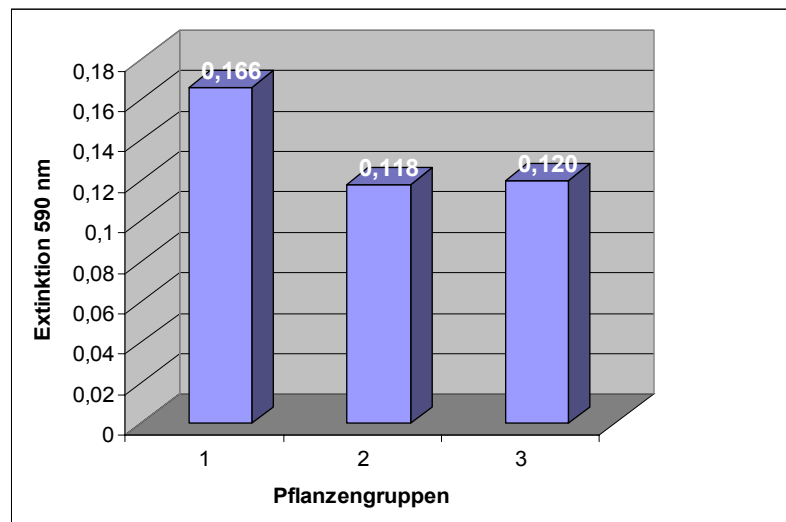


Abbildung 4.31 Photometrische Messung nach einer Methode von Van Urk: Darstellung der Alkaloidproduktion (ausgedrückt als Extinktion bei 590 nm) in den 3 Gruppen regenerierter Pflanzen von *Ipomoea asarifolia* (vgl. Text). **Gruppe 1:** Pflanzen von überdurchschnittlicher Qualität; **Gruppen 2 und 3:** Pflanzen von durchschnittlicher Qualität.

Wie dem Säulendiagramm zu entnehmen ist, ist das Gesamtalkaloidvorkommen in den durchschnittlich gewachsenen Pflanzen (Gruppen 2 und 3) fast identisch. Die überdurchschnittlich gewachsenen Pflanzen (Gruppe 1) enthalten etwa 30 % mehr Alkaloide.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen ergaben Folgendes: Bei Gruppe 1 waren auf 9 von 10 Blättern zahlreiche Pilzkolonien vorhanden, die mit Abbildung 4.14 a vergleichbar sind, 1 Blatt war unbesiedelt. Bei Gruppe 2 waren auf 8 von 10 Blättern kleine, weniger wüchsige Pilzkolonien vorhanden, die mit Abbildung 4.14 b zu vergleichen sind, 2 Blätter waren unbesiedelt. Bei Gruppe 3 waren alle Blätter, wie in Abbildung 4.14 b, dünn besiedelt.

Diese Befunde lassen eine deutliche Korrelation von Pflanzenwachstum, Alkaloidvorkommen und Pilzbesiedelung erkennen. Der Einfluss des Lichtspektrums auf die Stoffwechselfvorgänge der Pflanzen scheint für Wachstum und Produktionsfähigkeit des Pilzes von Bedeutung zu sein. Um noch detailliertere Auskünfte über die Zusammenhänge zu bekommen, wurden die Einzelalkaloide mittels HPLC-MS untersucht. In der Abbildung 4.32 werden die Alkaloidfraktionen in Form von sog. Multiple-Ion-Chromatogrammen miteinander verglichen.

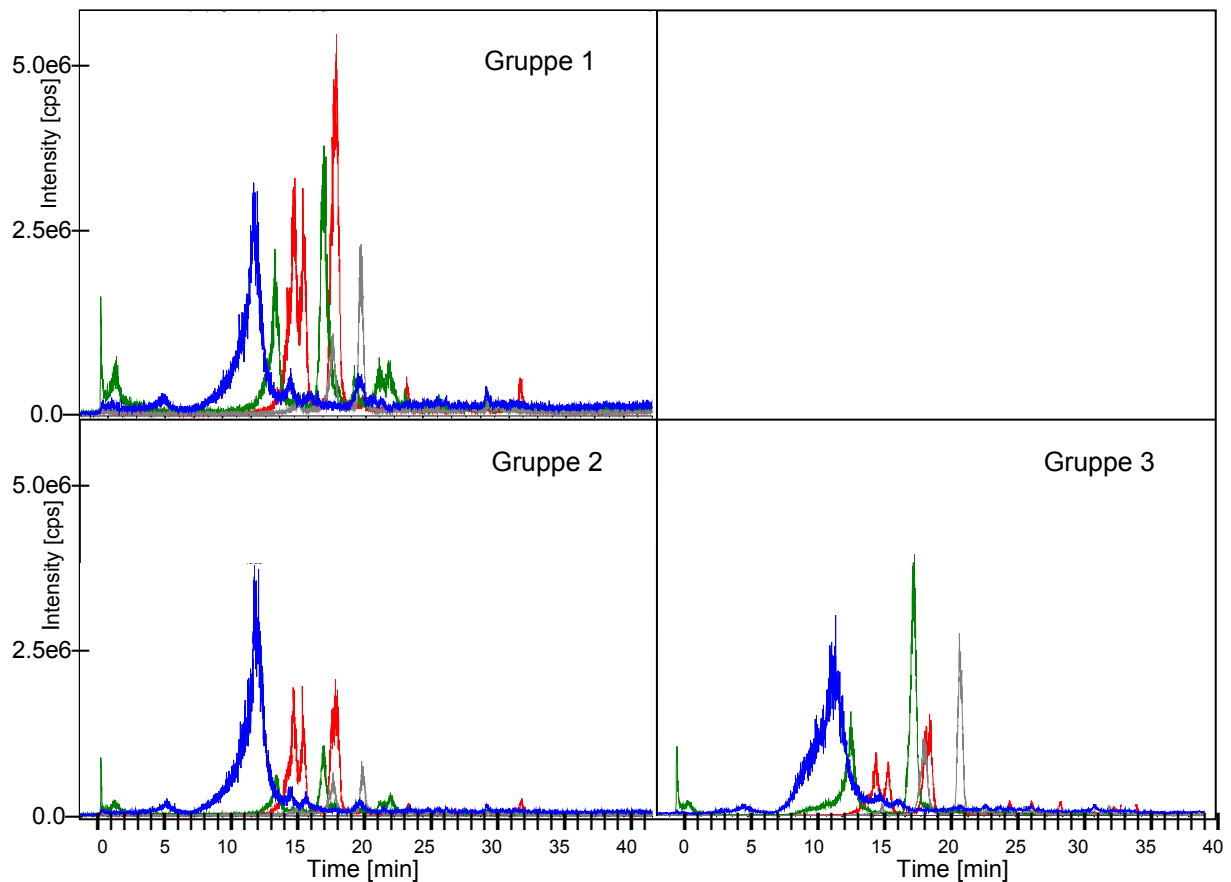


Abbildung 4.32 HPLC-MS Messung (DAD zwischen 275 und 315 nm) der Ergolinalkaloidfraktionen regenerierter Pflanzen von *Ipomoea asarifolia* (je 20 μ l) (vgl. Text); Darstellung in Form von Multiple-Ion-Chromatogrammen; **blau** (11 min): Chanoclavin, **grün** (Gruppen 1 und 2: 13,5 min, Gruppe 3: 12,5 min): Lysergsäureamid, **grün** (17 min): Isolysergsäureamid, **rot** (14,5 min): Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (15,5 min): Isolysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (18 und 18,5 min): weitere Isoformen von Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **grau** (Gruppen 1 und 2: 20 min, Gruppe 3: 20,5 min): Ergonovin, **grau** (18 min): Isoform von Ergonovin; Die Zeitverschiebungen sind durch Druckschwankungen während der Messung entstanden.

Die Abbildung 4.32 zeigt Multiple-Ion-Chromatogramme der Ergolinalkaloidfraktionen regenerierter Pflanzen von *I. asarifolia*. Die Messung erfolgte mittels HPLC-MS (vgl. 3.4.5), wie unter 4.2.3.1 beschrieben. In den Multiple-Ion-Chromatogrammen wird die Intensität des Gesamtzerfalls der Ergolinalkaloidmoleküle dargestellt. Dazu wurden die Zerfallsprodukte (Molekülionen) im Anschluss an die Messung durch Eingabe der Molekulargewichte (vgl. Tab. 4.4) in die Auswertungssoftware (vgl. 3.4.5) extrahiert. Die Alkaloide sind farblich voneinander zu unterscheiden. Der Farbenschlüssel befindet sich unter der Abbildung. Die Darstellungen sollen das quantitative Verhältnis der Alkaloide zueinander und die daraus entstehenden „Alkaloidmuster“ zeigen.

In Kapitel 4.7.1.3 wurde eine gewisse Kontinuität im Verhältnis der Alkaloide zueinander festgestellt, die insbesondere für die Lysergsäureamide zutrifft. Vergleicht man die Chromatogramme der Regenerationen von *I. asarifolia* mit denen aus Abbildung 4.27 (Veränderung von Wachstumsfaktoren bei *I. asarifolia*), so findet man in Gruppe 1 ein ähnliches Alkaloidverhältnis. Der einzige Unterschied ist der verhältnismäßig geringe Ergonovinananteil (grau 20 min). Die Chromatogramme der Gruppen 2 und 3 entsprechen diesem Bild jedoch nicht. Bei beiden Gruppen überwiegt der Chanoclavinanteil (blau 11 min). Bei Gruppe 3 ist zudem Isolysergsäureamid (grün 17 min) stark vertreten.

Wie bereits unter 4.7.1.3 festgestellt, scheint der Chanoclavinanteil in *I. asarifolia* bei geringem Gesamtalkaloidgehalt zu steigen. Dieser ist offensichtlich abhängig von der Pilzbesiedelung und diese wiederum vom Pflanzenwachstum. Die Biosynthese der Clavinalkaloide benötigt weniger Energie, als die der Lysergsäureamide (vgl. 1.3) und ist bei geringerer Leistungsfähigkeit möglicherweise effektiver.

4.7.4 Gesamtalkaloidgehalt und Ergosterolverteilung in unterschiedlichen Blattstadien

Die Untersuchung unterschiedlicher Blattstadien der Pflanzen sollte ebenfalls den Bezug der Epibionten zum pflanzlichen Stoffwechsel verdeutlichen. Wie unter 4.4 dargestellt, ist das Mycel von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 in den jungen Blattknospen der Pflanzen besonders stark ausgeprägt. Lichtmikroskopische Studien haben zudem gezeigt, dass alte Blätter im Vergleich zu jüngeren Blättern nur dünn mit den Pilzen besiedelt sind.

In allen bisherigen Untersuchungen wurden Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 lichtmikroskopisch quantifiziert (vgl. 3.5.1). Zur biochemischen Quantifizierung des Pilzvorkommens wurde im Rahmen dieses Versuchs das Verfahren der Ergosterolextraktion nach Schwadorf und Müller (1989) modifiziert und etabliert (vgl. 3.4.6). Mit dieser Methode war es möglich, Alkaloidkonzentration und Pilzbiomasse auf eine definierte Menge Pflanzenmaterial zu beziehen.

Ergosterol dient den meisten Pilzen zum Aufbau der Zellmembran und ist daher ein geeigneter Indikator für die Pilzdichte. Pflanzen produzieren kein Ergosterol oder falls doch, nur in Spuren. Wie die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, sind die Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 auf den beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* die weitaus überwiegenden Pilze (vgl. 4.5 und 4.6). Es konnte also davon ausgegangen werden, dass das aus alkaloidführenden Pflanzen extrahierte Ergosterol hauptsächlich von diesen Pilzen stammte. Zur Überprüfung wurden auch alkaloidfreie Pflanzen extrahiert. Dabei konnten nicht einmal Spuren von Ergosterol nachgewiesen werden.

Zu Beginn des Versuchs wurden die Blattstadien der Pflanzen entsprechend ihrer Rhachisgröße (vgl. Tab. 4.12) eingeteilt. Bei *I. asarifolia* wurden die Blattknospen als eigenes Blattstadium getrennt untersucht. Bei *T. corymbosa* öffnen sich die Blattknospen sehr schnell, so dass nicht viele zur Verfügung stehen. Sie wurden daher zusammen mit den kleinen, gerade geöffneten Blättern untersucht.

Von allen Blattstadien wurden im September 2005 je 18 g (*I. asarifolia*) bzw. je 10 g (*T. corymbosa*) geerntet und zunächst eingefroren. Je 9 g bzw. je 5 g waren für die Ergosterolextraktion (vgl. 3.4.6) und je 9 g bzw. je 5 g für die Alkaloidextraktion (vgl. 3.4.1) vorgesehen. Die unterschiedliche Erntemenge war von den zur Verfügung stehenden Blattknospen und kleinen Blättern abhängig. Da die Pilze bisher auf den Blättern, nicht aber auf den Stängeln gefunden wurden, sollten Alkaloid- und Pilzvorkommen ausschließlich anhand von Blattmaterial verglichen werden. Das Alkaloidvorkommen wurde mittels DC (vgl. 3.4.3), UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) und HPLC-MS (vgl. 3.4.5) überprüft. Die Ergosterolquantifizierung erfolgte mittels HPLC (vgl. 3.4.7).

Der Vergleich des Gesamtalkaloidgehalts der verschiedenen Blattgruppen erfolgte mittels UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) und wird in den Abbildungen 4.33 und 4.34 in Form von Säulendiagrammen dargestellt.

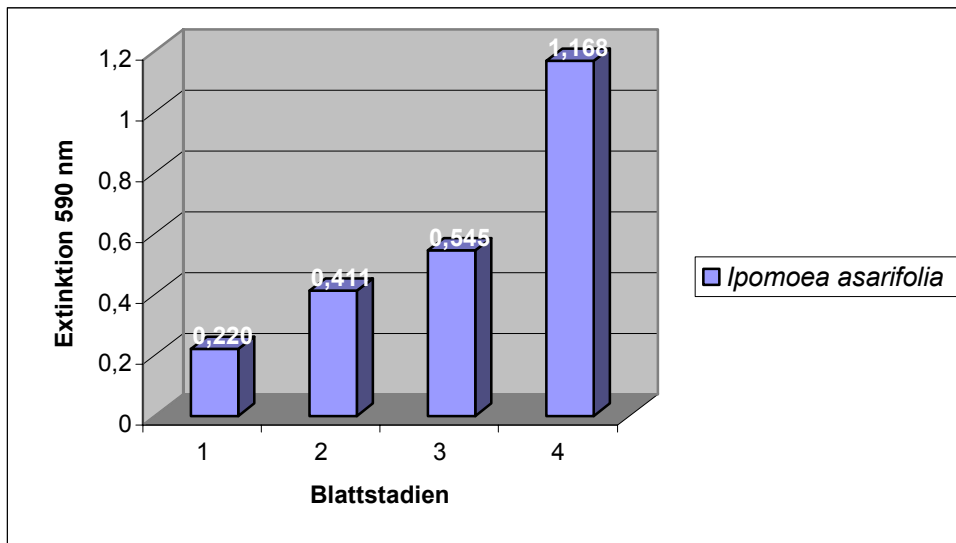


Abbildung 4.33 Photometrische Messung nach einer Methode von Van Urk: Darstellung der Alkaloidproduktion (ausgedrückt als Extinktion bei 590 nm) in verschiedenen Blattstadien von *Ipomoea asarifolia* (vgl. Text); 1: alte Blätter, 2: mittlere Blätter, 3: junge Blätter, 4: Blattknospen (Blattgrößen vgl. Tab. 4.12).

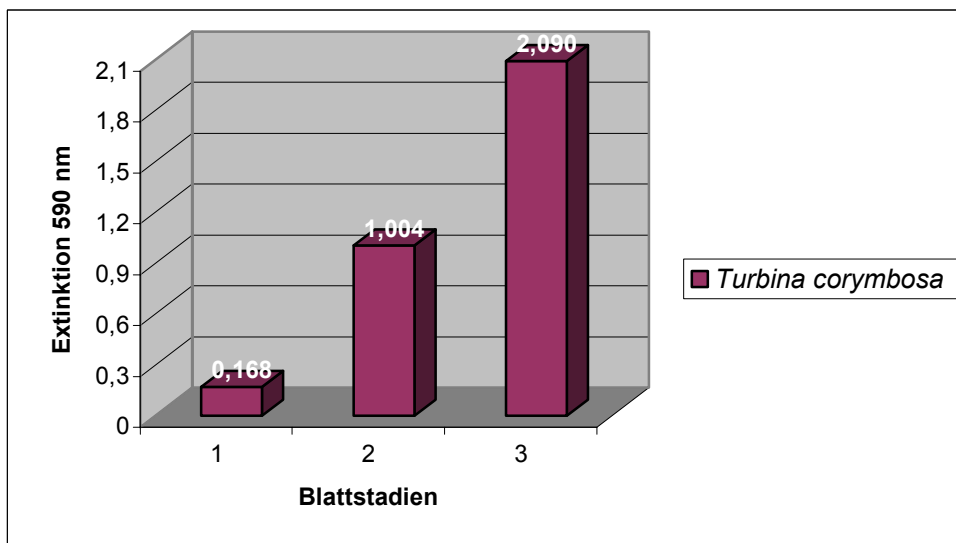


Abbildung 4.34 Photometrische Messung nach einer Methode von Van Urk: Darstellung der Alkaloidproduktion (ausgedrückt als Extinktion bei 590 nm) in verschiedenen Blattstadien von *Turbina corymbosa* (vgl. Text); 1: alte Blätter, 2: mittlere Blätter, 3: junge Blätter und Blattknospen (Blattgrößen vgl. Tab. 4.12).

Wie den Säulendiagrammen beider Pflanzenarten zu entnehmen ist, steht die Alkaloidproduktion in direktem Zusammenhang mit dem Alter der Blätter.

Die gleiche Tendenz ist auch in den DC-Chromatogrammen zu sehen (s. Abb. 4.35). Bei *I. asarifolia* ist der geringe Konzentrationsunterschied zwischen mittelalten und jungen Blättern (vgl. Abb. 4.33) in den DC-Chromatogrammen nicht erkennbar.

Die Alkaloidkonzentrationen der Blattknospen-Fraktion von *I. asarifolia* sowie der Fraktion der jungen Blätter und Blattknospen von *T. corymbosa* sind außergewöhnlich hoch. Die detaillierte Untersuchung der einzelnen Alkaloide erfolgte mittels HPLC-MS (s. unten).

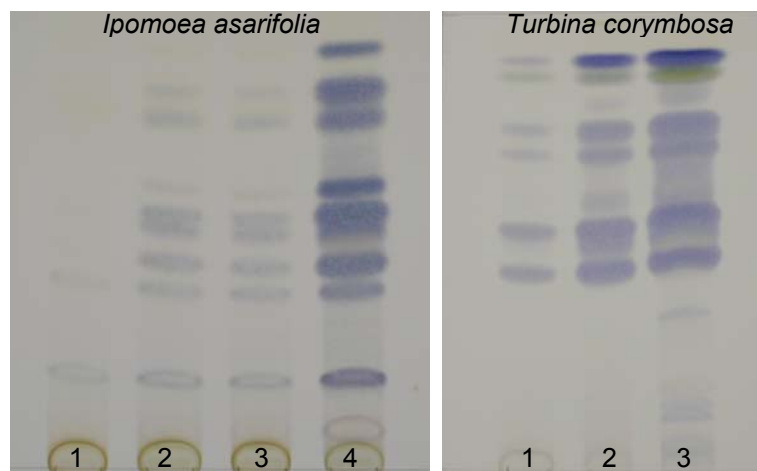


Abbildung 4.35 DC-Chromatogramme der Ergolinalkaloidfraktionen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (je 100 μ l) nach Untersuchung verschiedener Blattstadien (vgl. Text); zur Identifizierung der Alkaloide vgl. 4.2.3.1; ***Ipomoea asarifolia*** 1: alte Blätter, 2: mittlere Blätter, 3: junge Blätter, 4: Blattknospen; ***Turbina corymbosa*** 1: alte Blätter, 2: mittlere Blätter, 3: junge Blätter und Blattknospen (Blattgrößen vgl. Tab. 4.12).

Zur quantitativen Bestimmung von Ergosterol in den verschiedenen Blattstadien wurden die Ergosterolextrakte mittels HPLC vermessen. Anschließend wurde mit Ergosterolstandard kalibriert (vgl. 3.4.7). In den Abbildungen 4.36 (*I. asarifolia*) und 4.37 (*T. corymbosa*) sind die HPLC-Chromatogramme der unterschiedlichen Ergosterolfractionen (Blattgrößen vgl. Tab. 4.12) dargestellt. Tabelle 4.11 enthält Höhen- und Flächenwerte der Ergosterolpeaks.

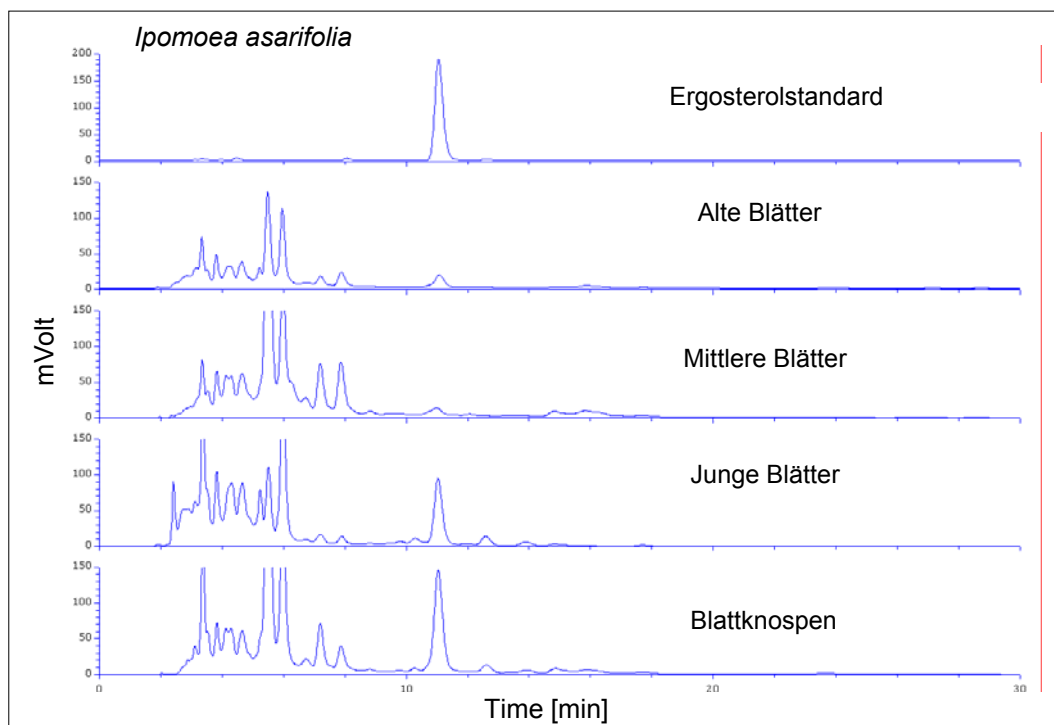


Abbildung 4.36 HPLC-Chromatogramme der Ergosterolextrakte verschiedener Blattstadien (je 9 g Blattmaterial / 500 μ l Methanol) von *I. asarifolia* (vgl. Text) und vom Ergosterolstandard (Stocklösung 1 mg / ml Methanol, 1:3 verdünnt); Injektion je 20 μ l; restliche Peaks unbekannt.

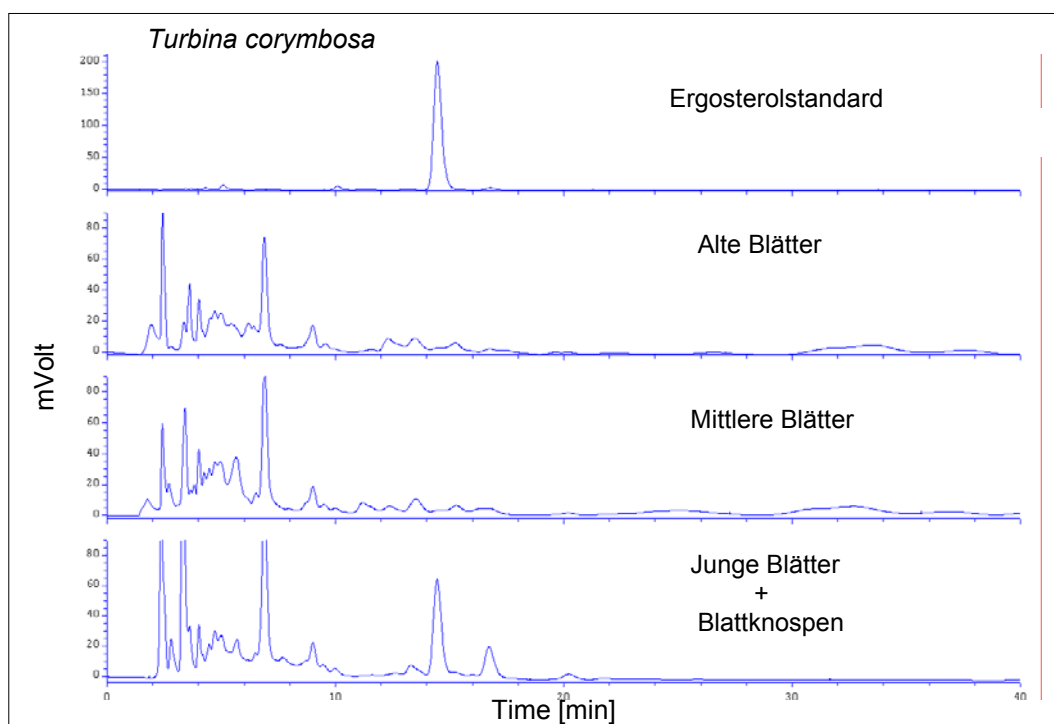


Abbildung 4.37 HPLC-Chromatogramme der Ergosterolextrakte verschiedener Blattstadien (je 5 g Blattmaterial / 500 μ l Methanol) von *T. corymbosa* (vgl. Text) und vom Ergosterolstandard (Stocklösung 1 mg / ml Methanol, 1:3 verdünnt); Injektion je 20 μ l; restliche Peaks unbekannt.

Tabelle 4.11 Peakhöhen und Peakflächen von Ergosterol in den Ergosterolextrakten von *I. asarifolia* (9 g Blattmaterial / 500 µl Methanol) und *T. corymbosa* (5 g Blattmaterial / 500 µl Methanol); Injektion je 20 µl.

Fraktionen (in Methanol)	Peakhöhe [mVolt]	Peakfläche [mVolt*min]
<i>Ipomoea asarifolia</i> (je 9 g / 500 µl)		
Alte Blätter	16,9	6,4
Mittlere Blätter	8,9	3,3
Junge Blätter	90,7	27,7
Blattknospen	141,6	47,7
<i>Turbina corymbosa</i> (je 5 g / 500 µl)		
Alte Blätter	Spuren	—
Mittlere Blätter	Spuren	—
Junge Blätter + Blattknospen	63,1	25,4

Die HPLC-Chromatogramme belegen die Abhängigkeit der Pilzbiomasse vom Alter der Blätter. Auffällig ist das sehr geringe Ergosterolvorkommen in alten und mittelalten Blättern. Bei *T. corymbosa* wurden nur Spuren detektiert, die in der oben dargestellten Auflösung nicht sichtbar sind. Bei *I. asarifolia* wurde in den alten Blättern fast doppelt soviel Ergosterol detektiert, wie in den mittelalten Blättern. Aufgrund der geringen Quantitäten ist dies eventuell auf Verluste während der Extraktion (vgl. 3.4.6) zurückzuführen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl Gesamtalkaloidgehalt als auch Ergosterolverteilung vom Alter der Blätter abhängig sind und deutlich miteinander korrelieren. Die genauen Konzentrationen pro g Frischgewicht werden in Tabelle 4.12 gegenübergestellt. Der Gesamtalkaloidgehalt wurde photometrisch als Ergonovin bestimmt.

Tabelle 4.12 Ergolinalkaloid- und Ergosterolgehalt (μg pro g Frischgewicht) der unterschiedlichen Blattstadien (Rhachisgröße in cm) von *I. asarifolia* und *T. corymbosa*. Der Gesamtalkaloidgehalt (μg / g Frischgewicht) wurde photometrisch als Ergonovin bestimmt.

Pflanzenart / Blattstadium	Rhachisgröße (cm)	Alkaloide ($\mu\text{g/g}$ FG)	Ergosterol ($\mu\text{g/g}$ FG)
<i>Ipomoea asarifolia:</i>			
Alte Blätter	4,5 – 6,5	6,4	1,7
Mittlere Blätter	2,5 – 4,0	11,9	0,9
Junge Blätter	1,5 – 2,0	15,9	8,3
Blattknospen	1,0 – 2,0	48,3	13,9
<i>Turbina corymbosa:</i>			
Alte Blätter	5,5 – 7,0	9,5	Spuren
Mittlere Blätter	3,5 – 5,0	53,3	Spuren
Junge Blätter / Blattknospen	1,5 – 3,0	110,8	13,5

Wie schon oben erwähnt, war bei *T. corymbosa* eine Unterteilung von jungen Blättern und Blattknospen mangels Masse nicht möglich. Die *Turbina*-Blattknospen öffnen sich wesentlich schneller, als die *Ipomoea*-Blattknospen. Aus der Tabelle geht hervor, dass in der Fraktion der jungen Blätter und Blattknospen von *T. corymbosa* und der Blattknospen-Fraktion von *I. asarifolia* fast identische Ergosterolkonzentrationen detektiert wurden. Der Ergolinalkaloidgehalt der *Turbina*-Fraktion ist jedoch mehr als doppelt so hoch. Eine höhere Alkaloidbiosynthese in *T. corymbosa* wurde schon in früheren Untersuchungen festgestellt (vgl. Abb. 4.6).

Bei beiden Pflanzenarten nehmen Alkaloid- und Ergosterolkonzentrationen mit dem Alter bzw. der Größe der Blätter rapide ab. Dies lässt die Vermutung zu, dass Pilzwachstum und Alkaloidbiosynthese hauptsächlich oder sogar ausschließlich in den jungen Blättern bzw. Blattknospen stattfinden und während des Blattwachstums stagnieren. Da von allen Blattstadien die gleiche Frischeinwaage extrahiert wurde, verringert sich die Anzahl der extrahierten Blätter bei steigender Blattgröße (s. Abb. 4.38). Ein stagnierendes Pilzwachstum bzw. eine stagnierenden Biosynthese hätten daher eine Verringerung der Konzentrationen pro g Frischgewicht zur Folge.

Eine weitere Möglichkeit ist ein erhöhter „Turn-over“ der Alkaloide in zunehmendem Blattalter. Die Fungizidversuche zeigen, dass der Abbau von Alkaloiden in den Pflanzen durchaus stattfindet. Dies beantwortet allerdings nicht die Frage nach dem Verbleib der Pilze. Beide Möglichkeiten werden in Kapitel 5.7.2 diskutiert.

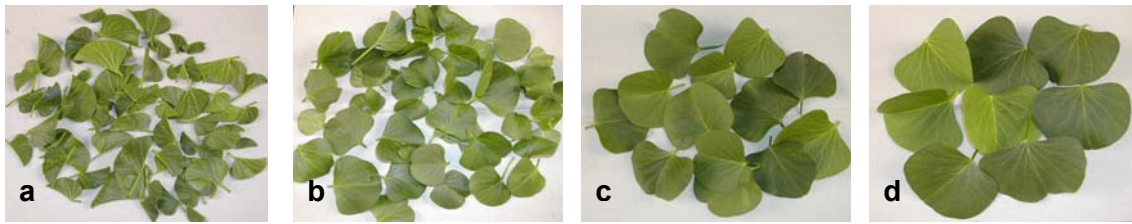


Abbildung 4.38 Je 9 g Frischeinwaage der unterschiedlichen Blattstadien von *Ipomoea asarifolia*; **a**: geschlossene Blattknospen, **b**: junge Blätter, **c**: mittlere Blätter, **d**: alte Blätter.

Die Alkaloidbiosynthese wurde anhand der Einzelalkaloide genauer untersucht. In den Abbildungen 4.39 (*I. asarifolia*) und 4.40 (*T. corymbosa*) werden die Alkaloidfraktionen in Form von sog. Multiple-Ion-Chromatogrammen miteinander verglichen.

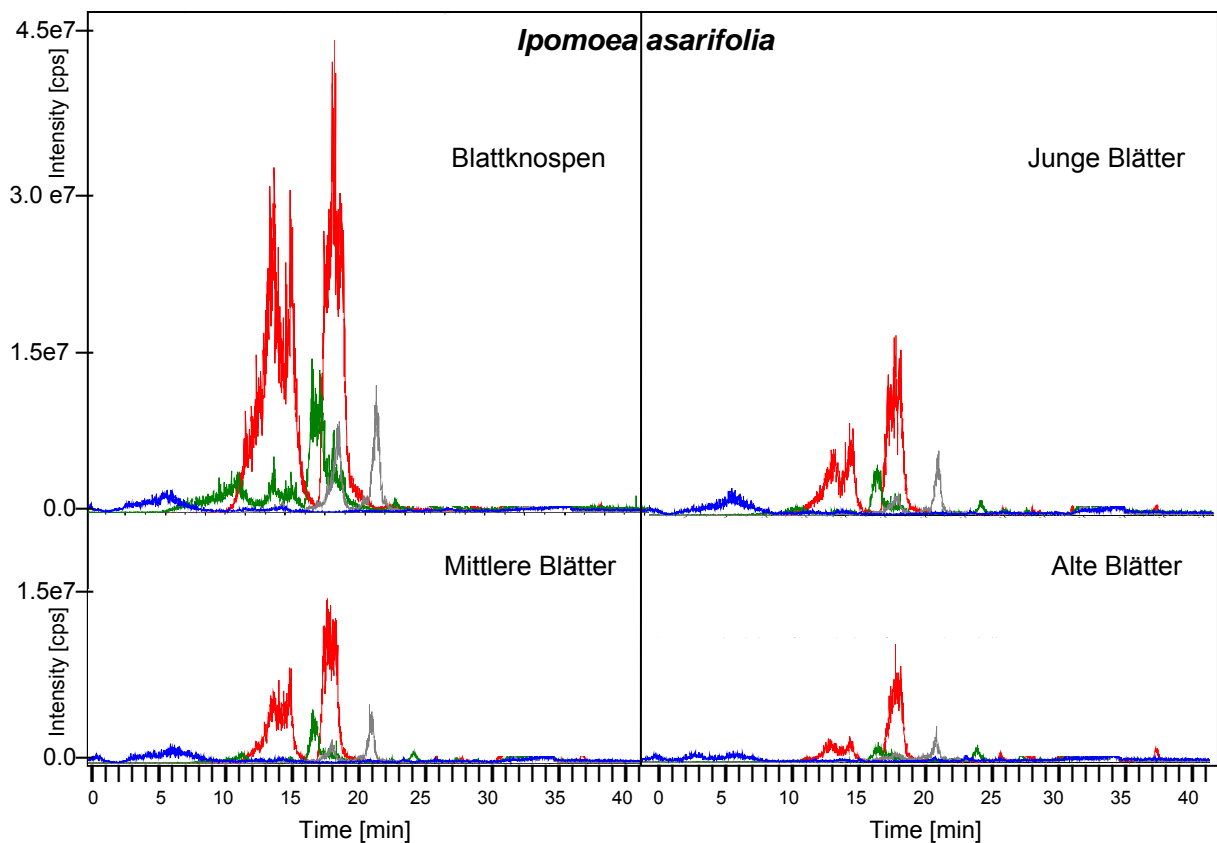


Abbildung 4.39 HPLC-MS Messung (DAD zwischen 275 und 315 nm) der Ergolinalkaloidfraktionen verschiedener Blattstadien von *Ipomoea asarifolia* (je 20 μ l) (vgl. Text); Darstellung in Form von Multiple-Ion-Chromatogrammen; **blau** (6 min): Chanoclavin, **grün** (11 min): Lysergsäureamid, **grün** (16,5 min): Isolysergsäureamid, **grün** (13, 14 und 18 min): unbekannt, **rot** (13 min): Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (14,5 min): Isolysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (17,5 und 18,5 min): weitere Isoformen von Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **grau** (21 min): Ergonovin, **grau** (18 min): Isoform von Ergonovin. Die Zeitverschiebungen im Vergleich zu Abb. 4.27 sind durch Druckschwankungen während der Messung entstanden.

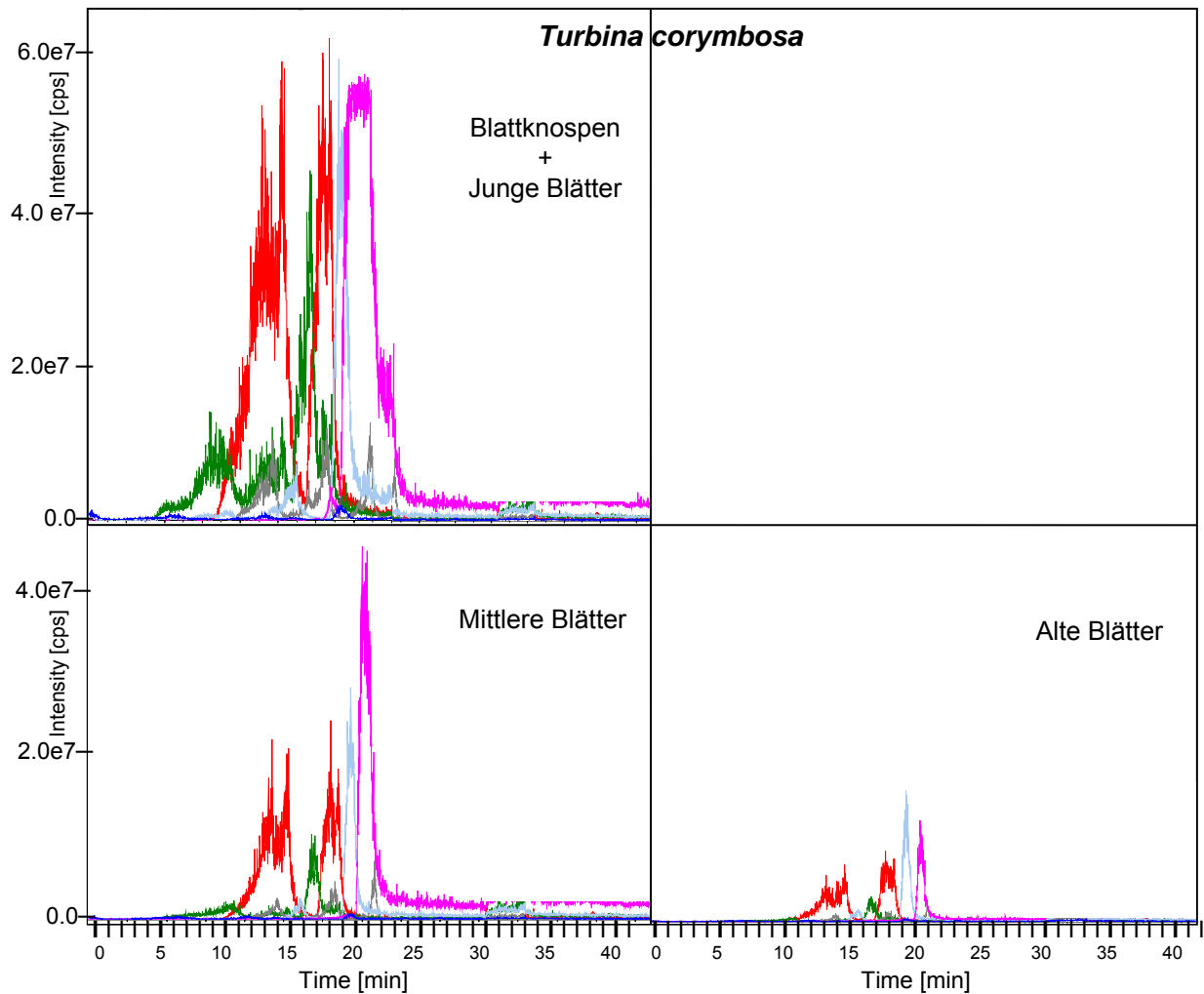


Abbildung 4.40 HPLC-MS Messung (DAD zwischen 275 und 315 nm) der Ergolinalkaloidfraktionen verschiedener Blattstadien von *Turbina corymbosa* (je 20 μ l) (vgl. Text); Darstellung in Form von Multiple-Ion-Chromatogrammen; **grün** (10,5 min): Lysergsäureamid, **grün** (16,5 min): Isolysergsäureamid, **grün** (13, 14 und 18 min): unbekannt, **rot** (13 min): Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (14,5 min): Isolysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (17,5 und 18,5 min): weitere Isoformen von Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **grau** (21,5 min): Ergonovin, **grau** (14 und 18 min): Isoformen von Ergonovin, **hellblau** (19,5 min): Elymoclavin, **hellblau** (15,5 min): Isoform von Elymoclavin, **pink** (21 min): Agroclavin. Die Zeitverschiebungen im Vergleich zu Abb. 4.28 sind durch Druckschwankungen während der Messung entstanden.

Die Abbildungen 4.39 und 4.40 zeigen Multiple-Ion-Chromatogramme der Ergolinalkaloidfraktionen verschiedener Blattstadien von *I. asarifolia* bzw. *T. corymbosa*. Die Messung erfolgte mittels HPLC-MS (vgl. 3.4.5), wie unter 4.2.3.1 beschrieben. In den Multiple-Ion-Chromatogrammen wird die Intensität des Gesamtzerfalls der Ergolinalkaloidmoleküle dargestellt. Dazu wurden die

Zerfallsprodukte (Molekülionen) im Anschluss an die Messung durch Eingabe der Molekulargewichte (vgl. Tab. 4.4) in die Auswertungssoftware (vgl. 3.4.5) extrahiert. Die Alkaloide sind farblich voneinander zu unterscheiden. Der Farbenschlüssel befindet sich unter den Abbildungen. Die Darstellungen sollen das quantitative Verhältnis der Alkaloide zueinander und die daraus entstehenden „Alkaloidmuster“ zeigen.

Die Abbildungen verdeutlichen ein weiteres Mal die kontinuierliche Abnahme der Alkaloidkonzentration mit dem Alter bzw. der Größe der Blätter. Dies betrifft nicht nur den Gesamtalkaloidgehalt, sondern jedes einzelne Alkaloid. Die in den Blattknospen biosynthetisierten Alkaloide sind in geringerer Konzentration in allen älteren Blattstadien vorhanden. Eine ergänzende Biosynthese einzelner Alkaloide in alten Blättern ist nicht erkennbar.

4.8 Versuche zur Rolle der epibiontischen Pilze bei der Alkaloidbiosynthese

Alle beschriebenen Untersuchungen dieser Arbeit haben die Beteiligung der Clavicipitaceen-Pilze an der Ergolinalkaloid-Biosynthese bestätigt. Ein weiterer wichtiger Nachweis war die Isolierung und teilweise Sequenzierung des Biosynthesegens *dmaW/cpd1* im Rahmen der Doktorarbeit von Apothekerin A. Markert (vgl. 4.5). Die Funktion der Pilze bei der Biosynthese wurde jedoch noch nicht abschließend geklärt. Eine mögliche Beteiligung der Pflanzen an der Biosynthese war nicht auszuschließen (vgl. 5.7). Untersuchungen zur Speicherung der Alkaloide sowie zur Herkunft diverser Vorstufen sollten zur weiteren Klärung beitragen.

4.8.1 Untersuchungen zur Alkaloidspeicherung

In bisherigen Versuchen wurde der Alkaloidgehalt des Pflanzenmaterials untersucht und mit dem Pilzvorkommen korreliert. Die Untersuchungen zur Alkaloidspeicherung sollten zeigen, ob auch im Pilzmycel Alkaloide enthalten sind.

Zu diesem Zweck wurde einerseits Pilzmycel aus den Blattknospen bzw. sehr jungen Blättern der beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*

abgeschabt (vgl. 3.3.2) und extrahiert (vgl. 3.4.2). Aus jeweils 10 g Blattmaterial konnten je etwa 0,5 g Pilzmycel gewonnen werden.

Andererseits wurden je 10 g Blattmaterial (geöffnete Blätter verschiedener Stadien) beider Pflanzenarten in 200 ml Wasser 8 min lang in einem Ultraschallbad behandelt. Die Dauer der Ultraschallbehandlung wurde in mehreren Vorversuchen getestet. Dabei war darauf zu achten, dass sich bei möglichst geringer Blattschädigung möglichst viel Pilzmycel ablöst. Die quantitative Ablösung des Pilzmycels konnte mittels Lichtmikroskop (vgl. 3.5.1) nachgewiesen werden. Die behandelten Blätter waren nahezu pilzfrei. Das Pilzmycel wurde nach der Behandlung 10 min bei 10000 rpm und einer Kühlung von 5 °C abzentrifugiert. Es wurden jeweils etwa 0,2 g Pilzmycel gewonnen. Die mit Ultraschall behandelten Blätter sowie gleiche Mengen unbehandelter Blätter und die Pilzisolate wurden eingefroren und später extrahiert (vgl. 3.4.1 und 3.4.2).

Das Alkaloidvorkommen wurde mittels DC (vgl. 3.4.3), UV-Spektroskopie (vgl. 3.4.4) und HPLC-MS (vgl. 3.4.5) überprüft. Alle Pilzextrakte sind auf 150 µl Extrakt konzentriert worden (vgl. 3.4.2). Hiervon wurden 50 µl + 450 µl Wasser (statt 100 µl + 900 µl Wasser) für die Photometrie, 50 µl auf 0,5 cm (statt 100 µl auf 1 cm) für die DC und 20 µl für die HPLC-MS verwendet. Die Pflanzenextrakte wurden wie gewohnt extrahiert und analysiert.

In Abbildung 4.41 sind die DC-Chromatogramme der Pflanzen- und der Pilzextrakte des Ultraschallversuchs dargestellt. Tabelle 4.13 enthält den durch photometrische Messung erhaltenen Gesamtalkaloidgehalt der Extrakte des Ultraschallversuchs und des abgeschabten Pilzmycels. Dieser wurde als Ergonovin bestimmt.

In der Abbildung 4.42 werden die Alkaloidfraktionen in Form von sog. Multiple-Ion-Chromatogrammen miteinander verglichen. Die Messung erfolgte mittels HPLC-MS (vgl. 3.4.5), wie unter 4.2.3.1 beschrieben. In den Multiple-Ion-Chromatogrammen wird die Intensität des Gesamtzerfalls der Ergolinalkaloidmoleküle dargestellt. Dazu wurden die Zerfallsprodukte im Anschluss an die Messung durch Eingabe der Molekulargewichte (vgl. Tab. 4.4) in die Auswertungssoftware (vgl. 3.4.5) extrahiert. Die Alkaloide sind farblich voneinander zu unterscheiden. Der Farbenschlüssel befindet sich unter den Abbildungen. Die Darstellungen sollen das quantitative Verhältnis der Alkaloide zueinander und die daraus entstehenden „Alkaloidmuster“ zeigen.

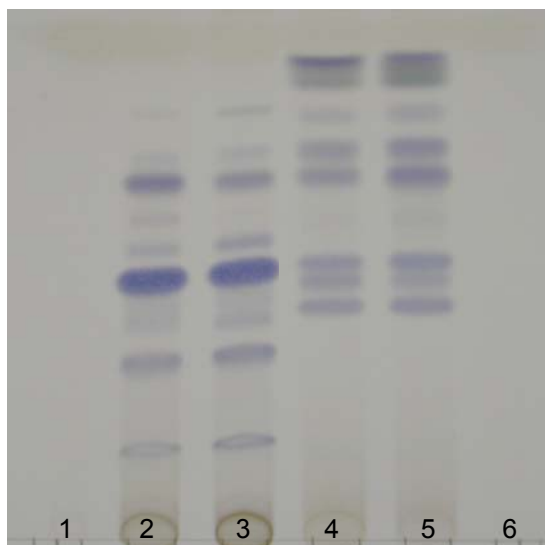


Abbildung 4.41 DC-Chromatogramme der Pflanzenextrakte und der Pilzextrakte von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* nach dem Ultraschallversuch (vgl. Text); zur Identifizierung der Alkaloide vgl. 4.2.3.1; 1: Pilzmycel von *I. asarifolia*, 2: Blätter von *I. asarifolia* nach Ultraschallbehandlung, 3: Blätter von *I. asarifolia* ohne Ultraschallbehandlung, 4: Blätter von *T. corymbosa* ohne Ultraschallbehandlung, 5: Blätter von *T. corymbosa* nach Ultraschallbehandlung, 6: Pilzmycel von *T. corymbosa*.

Tabelle 4.13 Quantitative Untersuchung der Ergolinalkaloide (Pflanzen- bzw. Pilzextrakte) von *I. asarifolia* und *T. corymbosa* (vgl. Text). Der Gesamtalkaloidgehalt wurde photometrisch als Ergonovin bestimmt. Aufgrund der Vergleichbarkeit wurde der Alkaloidgehalt von Pflanzen- und Pilzextrakten auf das Gewicht des Pflanzenmaterials bezogen.

Pflanzen- bzw. Pilzextrakte	Alkaloide ($\mu\text{g} / \text{g}$ Pflanzenmaterial)
Ultraschallversuch	
<i>Ipomoea asarifolia</i> ohne Ultraschall	21,6
<i>Ipomoea asarifolia</i> nach Ultraschall	20,5
Pilzmycel von <i>Ipomoea asarifolia</i> (entfernt durch Ultraschall)	0,0
<i>Turbina corymbosa</i> ohne Ultraschall	18,8
<i>Turbina corymbosa</i> nach Ultraschall	18,0
Pilzmycel von <i>Turbina corymbosa</i> (entfernt durch Ultraschall)	0,0
Abgeschabtes Pilzmycel	
Pilzmycel von <i>Ipomoea asarifolia</i>	0,25
Pilzmycel von <i>Turbina corymbosa</i>	0,37

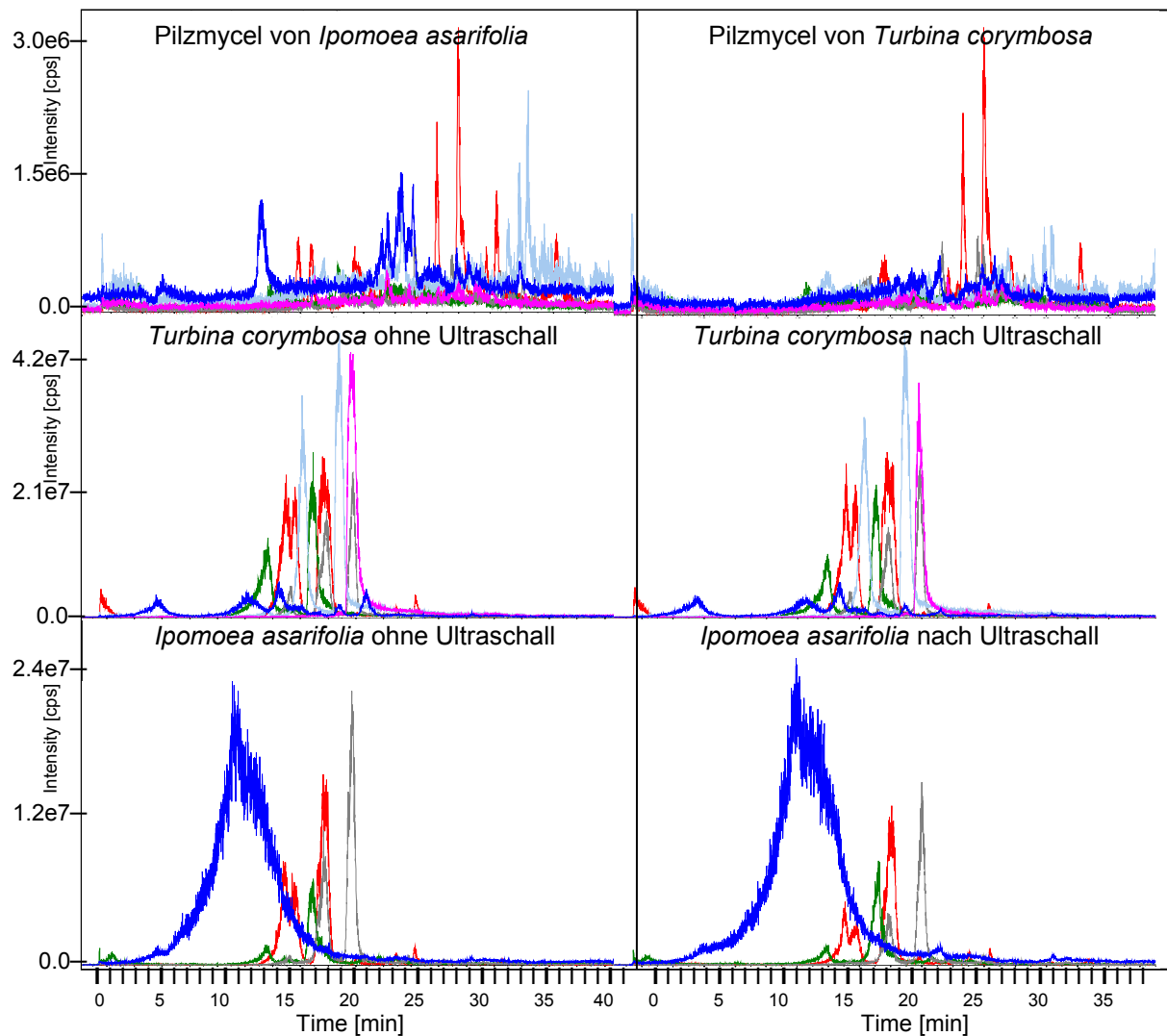


Abbildung 4.42 HPLC-MS Messung (DAD zwischen 275 und 315 nm) der Pilzextrakte aus abgeschabtem Mycel bzw. der Pflanzenextrakte des Ultraschallversuchs von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (je 20 μ l) (vgl. Text); Darstellung in Form von Multiple-Ion-Chromatogrammen; **blau** (11 min): Chanoclavin, **grün** (13,5 min): Lysergsäureamid, **grün** (17 min): Isolysergsäureamid, **rot** (14,5 min): Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (15,5 min): Isolysergsäure α -hydroxyethylamid, **rot** (17,5 und 18,5 min): weitere Isoformen von Lysergsäure α -hydroxyethylamid, **grau** (links 20 min, rechts 21 min): Ergonovin, **grau** (18 min): Isoform von Ergonovin, **hellblau** (links 19 min, rechts 20 min): Elymoclavin, **hellblau** (16 min): Isoform von Elymoclavin, **pink** (links 20 min, rechts 21 min): Agroclavin; restliche Peaks unbekannt.

Wie Abbildung 4.41 und Tabelle 4.13 zu entnehmen ist, wurden in den beiden Pilzextrakten des Ultraschallversuchs nicht einmal Spuren von Alkaloiden detektiert. In den beiden Pilzextrakten aus abgeschabtem Pilzmycel sind mittels Photometrie (vgl. Tab. 4.13) geringe Spuren gefunden worden. Mittels DC wurden auch hier keine Alkaloide detektiert. Der Gesamtalkaloidgehalt der Ultraschall-behandelten und der unbehandelten Pflanzen unterschied sich bei beiden Pflanzenarten nur geringfügig voneinander (vgl. Tab. 4.13). Die Ultraschall-behandelten Pflanzen enthielten 4 bis 5 % weniger Alkaloide, als die unbehandelten Pflanzen.

Der detaillierten Analyse mittels HPLC-MS (s. Abb. 4.42) ist Folgendes zu entnehmen: In der Pilzfraktion von *I. asarifolia* ist möglicherweise Chanoclovin (blau 11 min) enthalten. Auch Spuren von Lysergsäure α -hydroxyethylamid und Isolysergsäure α -hydroxyethylamid (rot 14,5 und 15,5 min) sind nicht auszuschließen. Die Pilzfraktion von *T. corymbosa* enthält allenfalls minimale Spuren von Lysergsäureamid (grün 13,5 min) und den Isoformen von Lysergsäure α -hydroxyethylamid (rot 17,5 und 18,5 min). Alle weiteren Peaks in den Pilzfraktionen sind unbekannt.

Die HPLC-MS Analyse deckt sich nicht mit der photometrischen Messung (vgl. Tab. 4.13). Laut Photometrie sollte die *Turbina*-Fraktion mit 0,37 $\mu\text{g/g}$ einen höheren Alkaloidgehalt haben, als die *Ipomoea*-Fraktion mit 0,25 $\mu\text{g/g}$. Die photometrischen Messungen erfolgten nach einer Methode von Van Urk (vgl. 3.4.4). Diese beruht auf einer Farbreaktion von Indolderivaten mit para-Dimethylaminobenzaldehyd. Bei den geringen Quantitäten sind störende Substanzen, welche die Messung verfälschen, nicht auszuschließen.

Die Untersuchung von abgeschabtem Pilzmycel beider Pflanzenarten wurde mehrfach wiederholt. In keiner der Analysen wurden Alkaloide detektiert. Es muss demnach davon ausgegangen werden, dass in der obigen Analyse versehentlich abgeschabte Blattteilchen mitextrahiert wurden oder Artefakte vorlagen.

Das „Alkaloidmuster“ der Pflanzenfraktionen beider Pflanzenarten ist ohne und mit Ultraschallbehandlung nahezu identisch. Der geringe quantitative Unterschied, der auch in der photometrischen Messung erkennbar ist (vgl. Tab. 4.13), verändert nicht die qualitative Zusammensetzung der Alkaloide. Der Alkaloidverlust von 4 bis 5 % während der Ultraschallbehandlung konnte verschiedene Ursachen haben. In den Pilzfraktionen wurden die Alkaloide, wie oben gezeigt, nicht wiedergefunden. Auch im Ultraschallwasser wurden mittels Photometrie keine Alkaloide detektiert.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass alle Anzeichen für einen aktiven Transport der Alkaloide von den Pilzen in die Pflanzen sprechen. Die oben dargestellten Untersuchungen begründen, mit einer Ausnahme, eine fast 100%ige Transporteffizienz. Weitere Möglichkeiten, wie die Induktion der Alkaloidbildung durch die Pilze, werden unter 5.7.4 diskutiert.

Auch die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Rolle von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 bei der Ergolinalkaloid-Biosynthese.

4.8.2 Einbaustudien mit Deuterium-markierten möglichen Präkursoren der Ergolinalkaloid Biosynthese

Wie beschrieben, bilden die Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 bevorzugt an den lipophilen Drüsenschuppen der Blattoberflächen von *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* größere Kolonien (s. Abb. 4.43). Pflanzliche Isoprenverbindungen scheinen für sie von besonderer Bedeutung zu sein. Denkbar ist z.B. ein Nutzen dieser Verbindungen für den Stoffwechsel der Pilze. Die Ergolinalkaloid-Biosynthese beginnt, wie unter 1.3 beschrieben, mit der Prenylierung von Tryptophan durch Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (s. Abb. 1.6). DMAPP bzw. sein Isomeres IPP (Isopentenylpyrophosphat) sind die Vorläufer aller Isoprenoide. In Pflanzen und Bakterien können diese beiden Präkursoren von zwei Biosynthesewegen abgeleitet werden. Zum Einen vom cytosolischen Mevalonsäureweg und zum Anderen von dem erst vor einigen Jahren entdeckten plastidären Deoxyxyluloseweg (Eisenreich et al. 2001). Da Pilze keine Plastiden haben, geht man allgemein davon aus, dass sie ausschließlich den Mevalonsäureweg verwenden (Eisenreich et al. 2001).

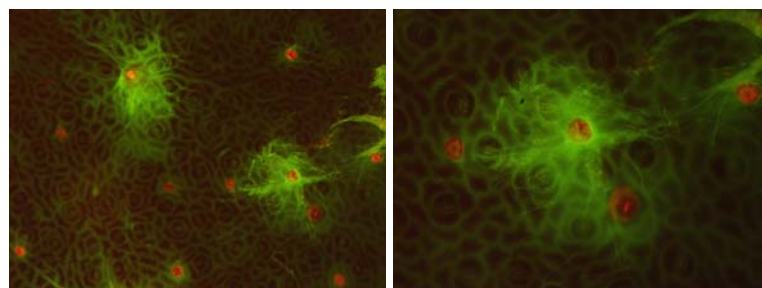


Abbildung 4.43 Die epibiontischen Pilze Iasa-F13 und Tcor-F01 bilden bevorzugt an den lipophilen Drüsenschuppen der Blattoberflächen größere Kolonien. Lichtmikroskopische Aufnahmen (100fach) der Blattoberfläche von *Ipomoea asarifolia* nach Fluoreszenzanfärbung mit Oregon grün-markiertem Wheat Germ Agglutinin (Pilzmycel) und Nilrot (Drüsenschuppen).

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. W. Boland, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena, sollte die Herkunft des DMAPP bei der Ergolin-Biosynthese untersucht werden. Dazu wurden sowohl Blätter als auch beblätterte Sprosse (je 8 – 9 g), wie unter 3.4.10.1 beschrieben, 48 h in Lösungen mit deuterierter Mevalonsäure (d_2 -MVA) bzw. deuterierter Deoxyxylulose (d_2 -DOX) inkubiert. Die Inkubationsversuche wurden mit beiden Pflanzenarten (*I. asarifolia* und *T. corymbosa*) 3mal wiederholt. Dabei wurden, unter Berücksichtigung der Veränderung des pflanzlichen Stoffwechsels, verschiedene Jahreszeiten gewählt (Juli 2004, Dezember 2004 und Mai 2005). Es wurden 2 bis 6 Monate alte Pflanzen untersucht.

Nach Ernte und Extraktion der Pflanzentriebe (vgl. 3.4.1) wurden die Alkaloide Chanoclavin-I, Lysergsäureamid und Isolysergsäureamid mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (vgl. 3.4.11) isoliert und der Einbau von d_2 -DOX bzw. d_2 -MVA in die einzelnen Alkaloide mittels GC (vgl. 3.4.12) ausgewertet. Dabei war insbesondere das erste entstehende Alkaloid auf dem Biosyntheseweg, das Chanoclavin-I (s. Abb. 1.6), von Interesse. In Abbildung 4.44 sind die Deuteriumpositionen im Molekül sowie die Anzahl der eingebauten Deuteriumatome dargestellt.

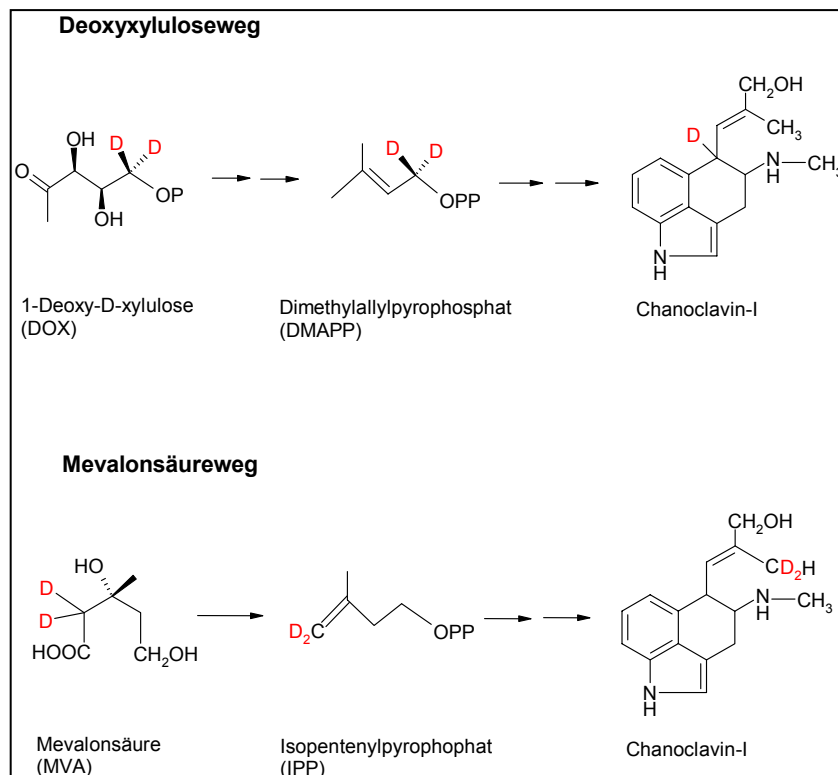


Abbildung 4.44 Einbau von deuterierter Deoxyxylulose (d_2 -DOX) bzw. deuterierter Mevalonsäure (d_2 -MVA) in Chanoclavin-I (D=Deuterium).

Schon 1963 haben Gröger und Floss durch Inkubation der Convolvulacee *Ipomoea rubro-caerulea* in ^3H -MVA relativ hohe Einbauraten in den Alkaloiden der Stängel erzielt. Allerdings war zu der Zeit die Biosynthese via DOX unbekannt und wurde daher nicht getestet. Da Pflanzen die Möglichkeit des sog. „Crosstalks“ haben (vgl. Dudareva et al. 2005, Eisenreich et al. 2001, Jux et al. 2001), d.h. alternativ sowohl MVA als auch DOX nutzen können, ermöglicht erst die Inkubation der Pflanzen mit beiden Vorstufen die sinnvolle Auswertung eines eventuellen Einbaus.

Um Auskunft über einen möglichen „Crosstalk“ zu bekommen, wurde zusätzlich der Einbau der deuterierten Substanzen in die terpenoiden Duftstoffe der Pflanzen überprüft. Dazu wurden die Pflanzen in geschlossenen Exsikkatoren (s. Abb. 4.45) wie oben beschrieben inkubiert (vgl. 3.4.10.2). Die während dieser Zeit emittierten Duftstoffe wurden auf einem Aktivkohlefilter angereichert. Die Desorption der Duftkomponenten erfolgte durch Eluieren des Filters mit Dichlormethan. Die Probe wurde unmittelbar nach dem Eluieren mittels GC-MS vermessen (vgl. 3.4.13).



Abbildung 4.45 Versuchsaufbau der „Closed Loop Stripping“-Analyse zur Anreicherung von flüchtigen Blattinhaltsstoffen. Die Inkubation der Pflanzenriebe erfolgte in geschlossenen Glasexsikkatoren über 48 h in Lösungen mit deuterierter Mevalonsäure (d_2 -MVA) bzw. deuterierter Deoxyxylulose (d_2 -DOX). Die während dieser Zeit emittierten Duftstoffe wurden auf einem Aktivkohlefilter angereichert. Dazu wälzte eine Miniaturpumpe den Luftraum in den Exsikkatoren kontinuierlich um. **Links:** Tagphase (10 h Licht mit einer Intensität von ca. 4000 Lux), **Rechts:** Nachtphase (14 h Dunkelheit).

Die 3malige Wiederholung der Versuche führte immer zum gleichen Ergebnis: Weder in Chanoclavine-I (vgl. Abb. 4.44), noch in den übrigen untersuchten Alkaloiden (Lysergsäureamid und Isolysergsäureamid) wurde Deuterium detektiert. D.h., es hat kein Einbau von d_2 -MVA bzw. d_2 -DOX in die Alkaloide stattgefunden.

Dagegen waren die terpenoiden Duftstoffe regelmäßig hoch markiert. In zahlreichen Monoterpenen und Sesquiterpenen wurden sowohl d_2 -MVA als auch d_2 -DOX detektiert. In Abbildung 4.46 wird das Sesquiterpen Caryophyllen exemplarisch dargestellt.

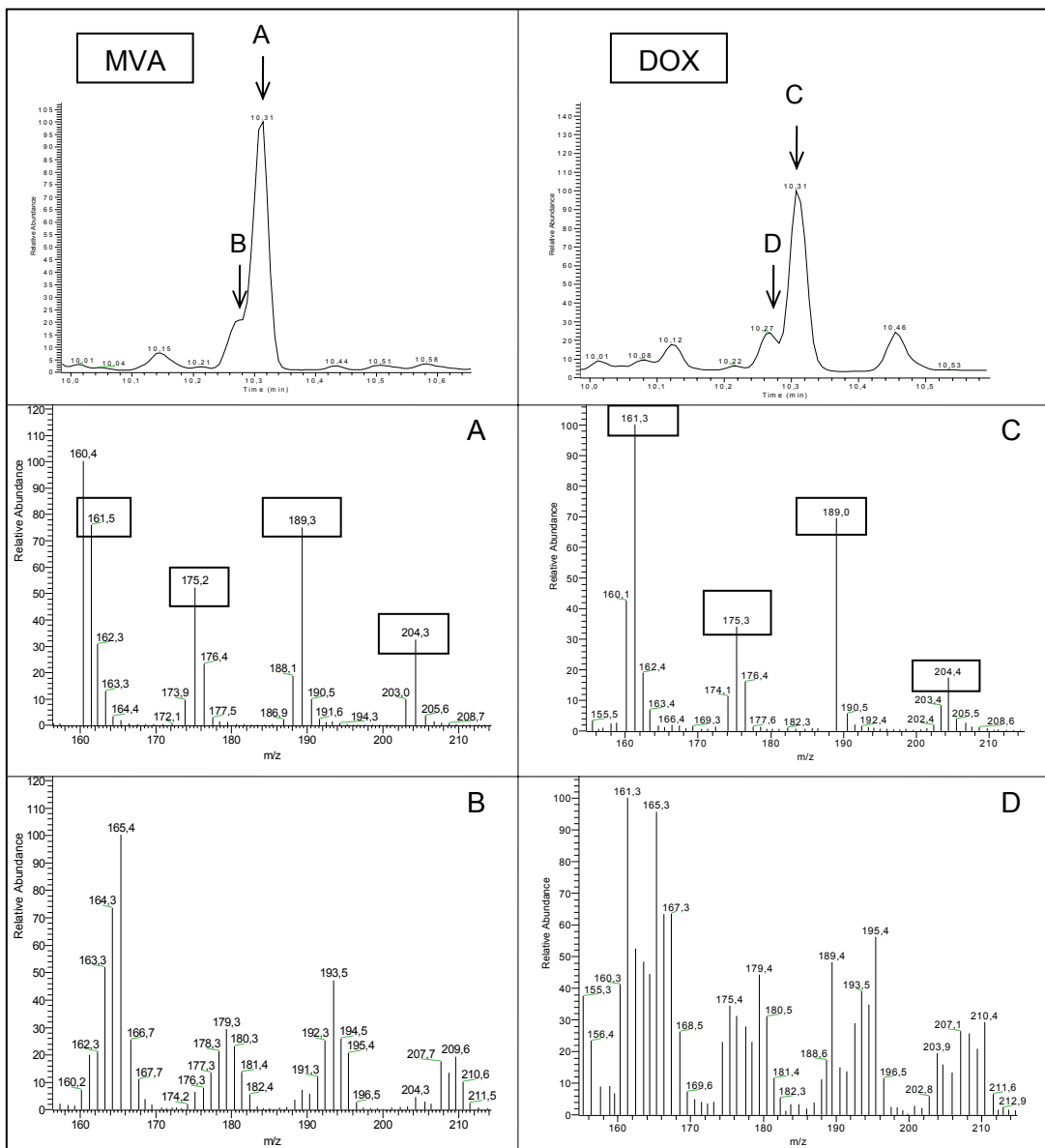


Abbildung 4.46 Chromatographische Auftrennung einzelner Isotopomere von Caryophyllen (Auszug aus GC-MS Messung terpenoider Duftstoffe nach Inkubation der Pflanzen in deuterierter MVA bzw. DOX, vgl. Text). **Links:** Inkubation in d_2 -MVA, **A:** geringer Einbau, **B:** hoher Einbau; **Rechts:** Inkubation in d_2 -DOX, **C:** geringer Einbau, **D:** hoher Einbau; Die eingerahmten Massen sind für unmarkierte Sesquiterpene charakteristisch. Die Markierung pro Isopreneinheit beträgt 2 Deuteriumatome (Verschiebung der Massen um 2 Einheiten pro Isoprenrest).

In Abbildung 4.46 wird der Einbau von d_2 -MVA bzw. d_2 -DOX in terpenoide Duftstoffe, am Beispiel des Sesquiterpens Caryophyllen, gezeigt. Die Analyse der anfallenden Chromatogramme wird durch den Umstand erleichtert, dass Isotopomere mit höherem Deuteriumgehalt aufgrund ihres geringeren Siedepunktes und ihrer herabgesetzten Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial schneller von der GC-Säule eluieren.

Die in den Abbildungen A und C eingerahmten Massen 161, 175, 189 und 204 sind für unmarkierte Sesquiterpene charakteristisch. Je höher der Anteil dieser Massen im Massenspektrum, desto geringer ist die Markierungsrate. Bei hoher Markierungsrate steigt der Anteil weiterer Massen und es kommt zur typischen Clusterbildung (s. Abb. B und D). Caryophyllen ($C_{15}H_{24}$) wird aus 3 Isopreneinheiten gebildet. Jede Isopreneinheit wird durch die deuterierten Vorstufen MVA bzw. DOX mit 2 Deuteriumatomen markiert (vgl. Abb. 4.44). Im Falle eines Einbaus sollte sich das Molekulargewicht des Terpens pro Isopreneinheit um 2 Masseneinheiten verschieben. Das Molekulargewicht kann sich damit um 2, 4 oder 6 erhöhen.

Der Nachweis von MVA und DOX sowohl in Mono- als auch in Sesquiterpenen bestätigt die Möglichkeit des pflanzlichen „Crosstalks“. Sollten die Alkaloide auf dem MVA-Weg gebildet werden, so ist daher keine Aussage über die Herkunft des Präkursors möglich. Das Ergebnis würde jedoch nicht der Annahme widersprechen, dass die Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 die Vorstufe zur Verfügung stellen. Sollten die Alkaloide eindeutig auf dem DOX-Weg gebildet werden, so stellen die Pflanzen die Vorstufe zur Verfügung. Eine weitere in der Literatur beschriebene Möglichkeit ist die Anregung des pflanzlichen DOX-Weges durch den Pilz (Walter et al. 2000).

Allerdings kann derzeit, mangels Einbau der deuterierten Vorstufen in die Alkaloide, keine Aussage gemacht werden. Da die Pflanzen die deuterierten Substanzen nachweislich verwerten, kann angenommen werden, dass die Vorstufen zur Alkaloidbildung von den Pilzen kommen. Möglicherweise haben sie keinen Zugriff auf die von außen verabreichten Substanzen. Vermutungen hierzu und Ideen für neue Versuchsansätze werden unter 5.7.5.1 diskutiert.

4.8.3 Einbaustudien mit ^{14}C -Tryptophan

Die Ergolinalkaloid-Biosynthese beginnt, wie unter 1.3 beschrieben, mit der Prenylierung von Tryptophan durch Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (s. Abb. 1.6). Durch Inkubationsstudien mit ^{14}C -Tryptophan sollte der Ort der Biosynthese (Pilz oder Pflanze) aufgeklärt werden.

Dazu wurden je 9 g Blätter pilz-/alkaloidfreier (vgl. 3.1.2) und pilz-/alkaloidführender Pflanzen von *Ipomoea asarifolia* inkubiert. Zudem wurden 9 g Blätter pilz-/alkaloidführender Pflanzen mit Ultraschall behandelt und ebenfalls inkubiert. Die Ultraschallbehandlung führte zu alkaloidhaltigen und weitgehend pilzfreien Blättern (vgl. 3.4.14.2).

Die Pflanzenteile wurden zunächst in 4 ml wässriger ^{14}C -Tryptophan-Lösung (je 10 μCi = 0,37 MBq in 4 ml H_2O) inkubiert. Nach Verbrauch der Lösung (in ca. 9 h) wurde reines Wasser nachgefüllt. Der Wasserverbrauch unter dem Luftstrom des Abzuges wurde in einem Vorversuch getestet, um eine zügige Aufnahme der radioaktiven Verbindung zu gewährleisten. Die Inkubationszeit betrug, in Anlehnung an den unter 4.8.2 beschriebenen Versuch, insgesamt 48 h. Nach 48 h wurden die Pflanzen geerntet und wie unter 3.4.1 beschrieben extrahiert. Der Gesamtalkaloidextrakt konnte mittels Radio-HPLC und MS analysiert werden (vgl. 3.4.15).

Desweiteren wurden von 9 g Blattmaterial der Pflanze *Ipomoea asarifolia* 0,5 g Pilzmycel, wie unter 3.3.2 beschrieben, isoliert. Anschließend wurde das Pilzmycel in 1 ml MS-Flüssigmedium (vgl. Tab. 2.7) aufgenommen und mit 10 μCi (= 0,37 MBq) ^{14}C -Tryptophan versetzt. Da sich MS-Salzlösung in Pilzmedien bewährt hat, wurde sie statt Wasser für diesen Versuch gewählt. Die Inkubationszeit betrug wie bei dem Blattmaterial 48 h. In dieser Zeit musste keine MS-Salzlösung nachgefüllt werden. Nach 48 h wurde das Mycel in 2 min bei 10000 rpm abzentrifugiert und wie unter 3.4.2 beschrieben extrahiert. Der Überstand (etwa 150 μl MS-Lösung) wurde zur Überprüfung des radioaktiven Rückstandes verwahrt. Der Gesamtalkaloidextrakt konnte mittels Radio-HPLC und MS analysiert werden (vgl. 3.4.15).

Das Ergebnis der Inkubationen wird in Tabelle 4.14 dargestellt.

Tabelle 4.14 Einbau von ^{14}C -Tryptophan in Ergolinalkaloide bzw. andere Verbindungen nach Inkubation verschiedener Versuchsgruppen von *Ipomoea asarifolia* (je 9 g Blätter) bzw. von Pilzmycel (0,5 g) in wässriger ^{14}C -Tryptophan-Lösung (vgl. Text).

Versuchsgruppen	Einbau von ^{14}C -Tryptophan in Alkaloide	Einbau von ^{14}C -Tryptophan in andere Verbindungen
Blätter pilz- / alkaloidfrei	keine Alkaloide	geringer Einbau in eine unbekannte Verbindung
Blätter pilz- / alkaloidführend	kein Einbau	geringer Einbau in zwei unbekannte Verbindungen
Blätter pilzfrei / alkaloidführend (Ultraschall-behandelt)	kein Einbau	geringer Einbau in zwei unbekannte Verbindungen
Pilzmycel	keine Alkaloide	kein Einbau

Wie der obigen Tabelle zu entnehmen ist, hat kein Einbau von ^{14}C -Tryptophan in Ergolinalkaloide stattgefunden. Der Einbau in andere Verbindungen zeigt, dass die radioaktive Substanz von den Blättern aufgenommen wurde. Allerdings handelte es sich auch hier nur um Spuren. Eine konkrete Zuordnung von Massenspektren zu den radioaktiv markierten Peaks war nicht möglich.

Im Pilzextrakt wurde kein Einbau in vorkommende Verbindungen detektiert. Alkaloide waren in dem Extrakt, wie erwartet, nicht vorhanden (vgl. 4.8.1). Im abzentrifugierten Überstand (etwa 150 μl MS-Lösung, s.o.) wurde mittels Szintillationszähler ein radioaktiver Rückstand von 2670 dpm (= 0,043 KBq) gemessen. Dies ist nur ein winziger Bruchteil der Gesamtzugabe von 0,37 MBq.

Mangels radioaktiver Substanz wurde der Versuch nicht wiederholt. Diese erste Untersuchung zeigt jedoch, dass ein Einbau von ^{14}C -Tryptophan in verschiedene Verbindungen der Pflanzen durchaus stattfindet. Fraglich ist, wo das restliche ^{14}C -Tryptophan verbleibt. In weiteren Versuchen sollte überlegt werden, wie die Einbauraten erhöht werden kann (vgl. 5.7.5.2). Erst dann ist eine Aussage zum Einbau von ^{14}C -Tryptophan in die Alkaloide und zu einer eventuellen Beteiligung des Pilzes möglich.

Zur Klärung der Rolle von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 bei der Biosynthese der Alkaloide sind weitere Untersuchungen erforderlich. Als sicher kann die vollständige Speicherung der Alkaloide in den Pflanzen gelten.

5 DISKUSSION

Schon 1960 entdeckte Albert Hofmann das Vorkommen von Ergolinalkaloiden in Convolvulaceen. Allerdings war bis heute ungeklärt, wie und wo die Alkaloide in den Pflanzen gebildet werden. Grundlage der Untersuchungen zur Alkaloidbiosynthese in Convolvulaceen ist die seit mehr als einem Jahrhundert bekannte (vgl. 1.1) und gut erforschte Symbiose von Poaceen und Ergolinalkaloid-bildenden endophytischen Pilzen (z.B. Bush et al. 1997, Clay und Schardl 2002, Tudzynski und Scheffer 2004). Auch epibiontische Ergolinbildner, die meist auf meristematischem Gewebe und Infloreszenzen der Poaceen vorkommen (z.B. Clay und Frenz 1993, Reddy et al. 1998), werden beschrieben. Die Vermutung lag nahe, dass bei den Convolvulaceen ebenfalls Pilze für die Ergolinbildung verantwortlich sind. Die Entdeckung epibiontischer Pilze auf den Blattoberflächen der Convolvulaceen *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (Kucht et al. 2004, Steiner et al. 2006) gab der Ergolinalkaloidforschung einen wichtigen Impuls. Zur Beurteilung und zum Verständnis der Interaktionen dieser neu entdeckten Symbiosen ist der Vergleich mit den bekannten Interaktionen der Gras-Pilz-Symbiosen erforderlich.

5.1 Symbiosen von Gräsern und Ergolinalkaloid-bildenden Pilzen

5.1.1 Endophytische Pilze

Symbiosen von Gräsern (Poaceae), insbesondere der Unterfamilie Pooideae, mit endophytischen Pilzen aus der Familie der Clavicipitaceae sind weit verbreitet. Die Pilze wachsen interzellulär und intrazellulär in den oberirdischen Pflanzenorganen (Clay und Schardl 2002).

Grundsätzlich wachsen die Endophyten mehrere Jahre systemisch in den Wirtspflanzen und bilden zur Blütezeit typische Vermehrungsstrukturen, wie Fruchtkörper und sexuelle Sporen, mit denen sie die Reproduktion der Pflanzen be- bzw. verhindern. In einigen Gräsern produzieren die Pilze jedoch keinerlei externe Vermehrungsstrukturen, sondern wachsen in den Samen der infizierten Pflanzen (Sampson 1933). Diese vertikal übertragenen asexuellen Endophyten stammen von den horizontal übertragenen sexuellen Formen ab (Clay und Schardl 2002). Molekulare

Studien haben zudem gezeigt, dass viele der vertikal übertragenen Endophyten interspezifische Hybriden sind. D.h., die Infektion der Gräser mit unterschiedlichen Pilzarten führt zur Fusion der Hyphen und letztlich zur parasexuellen Rekombination. Zahlreiche Gras-Endophyten haben sowohl die Fähigkeit zur vertikalen als auch zur horizontalen Verbreitung (siehe Abb. 5.1). Diese Endophyten haben sich mit großer Wahrscheinlichkeit durch Co-Kladogenese zusammen mit ihren Wirtsgräsern entwickelt, da ihre verwandtschaftlichen Beziehungen häufig die verwandtschaftlichen Beziehungen der Pflanzen reflektieren (Schardl et al. 1994, Moon et al. 2002, Craven et al. 2001a).

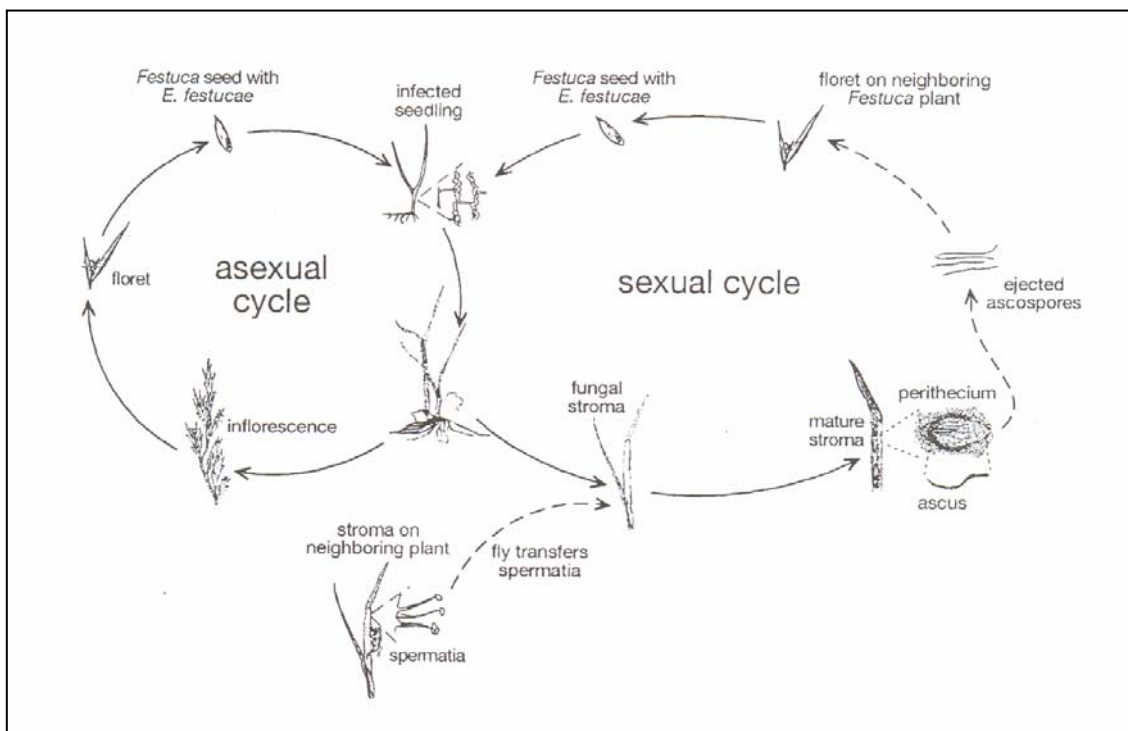


Abbildung 5.1 Lebenskreislauf von *Epichloë festucae* mit alternativ sexuellem bzw. asexuellem Zyklus und entsprechend horizontaler bzw. vertikaler Vermehrung; aus Clay und Schardl 2002.

Die meisten vertikal übertragenen Endophyten produzieren biologisch aktive Alkaloide wie Ergolinalkaloide, Lolinalkaloide, Peraminalkaloide und Lolitremalkaloide (Porter 1994, Bush et al. 1997, Siegel und Bush 1997), welche die Pflanzen vermutlich vor Krankheiten und Herbivorie schützen. Hier scheint der Schlüssel für die Evolution und das diverse Erscheinungsbild dieser Pilzgruppe zu liegen: Vertikal übertragene Mutualisten bilden eine einzigartige ökologische Nische für horizontal übertragene Parasiten (Clay und Schardl 2002). Der Wechsel von vertikaler zu horizontaler

Verbreitung ist fließend, genauso wie die damit einhergehenden Veränderungen von Wirtsunterstützung und Wirtsschwächung. Schardl stellte daher die These auf, ein asexueller Endophyt sei "ein maskierter Krankheitserreger, dessen Genom sowie assoziierten Funktionen zugunsten der Wirtspflanze umgewandelt wurde" (Schardl und Clay 1997; Schardl et al. 1991).

Ein gut untersuchtes Beispiel für eine solche Entwicklung ist der mutualistische asexuelle *Neotyphodium*-Endophyt. Molekulargenetische und biochemische Studien haben gezeigt, dass dieser Pilz eng verwandt ist mit dem parasitischen sexuellen *Epichloë*-Endophyt (Schardl 1996, Schardl und Clay 1997). *Neotyphodium* steigert Fitness und Adaptationsfähigkeit der Wirtsgräser, während *Epichloë* durch die Bildung von Stromata auf Infloreszenzen die Sterilität der Pflanzen verursacht. *Epichloë* und der davon abstammende *Neotyphodium* gehören zur Familie der Clavicipitaceae (White 1997). Phylogenetische Analysen ergaben, dass diese Verwandtschaft durch Kreuzungen verschiedener Endophyten mit *Epichloë*-Arten entstanden ist (Clay und Schardl 2002).

5.1.2 Epibiontische Pilze

Eine interessante Variante der endophytischen Form ist das epibiontische Wachstum von Ergolinalkaloid-bildenden Clavicipitaceen-Pilzen auf Gräsern. Das Mycel der Epibionten verbreitet sich auf den Oberflächen junger Blätter, Knospen und meristematischer Regionen sowie auf den Blüten der Pflanzen (Leuchtmann und Clay 1988, White und Glenn 1994). Meristematische Regionen ermöglichen dem Pilz eine gute Erreichbarkeit pflanzlicher Ressourcen vor Ausbildung der Kutikula. Die Infektion der Pflanzen erfolgt daher bevorzugt in der frühen Entwicklungsphase und erlaubt dem epibiontischen Pilz zusätzlich ein systemisches Wachstum (Clay und Schardl 2002).

Die phylogenetische Nähe von epibiontischen und endophytischen Arten innerhalb der Clavicipitaceen (Clay und Frenz 1993, Reddy et al. 1998) zeigt, dass der evolutionäre Wechsel zwischen epibiontischem Wachstum auf dem Wirt und interzellulärem, systemischem Wachstum in dem Wirt nicht schwer ist. Dies wurde insbesondere durch molekulare und morphologische Studien der Gattung *Balansia* belegt: Zahlreiche Arten dieser Gattung sind Epibionten; von den untersuchten Arten erwiesen sich ausschließlich *B. obtecta* und *B. claviceps* als Endophyten (siehe Abb. 5.2). *B. obtecta* und *B. claviceps* bilden eine Unterordnung epibiontischer *Balansia*-Pilze, von denen sie offensichtlich abstammen (Reddy et al. 1998).

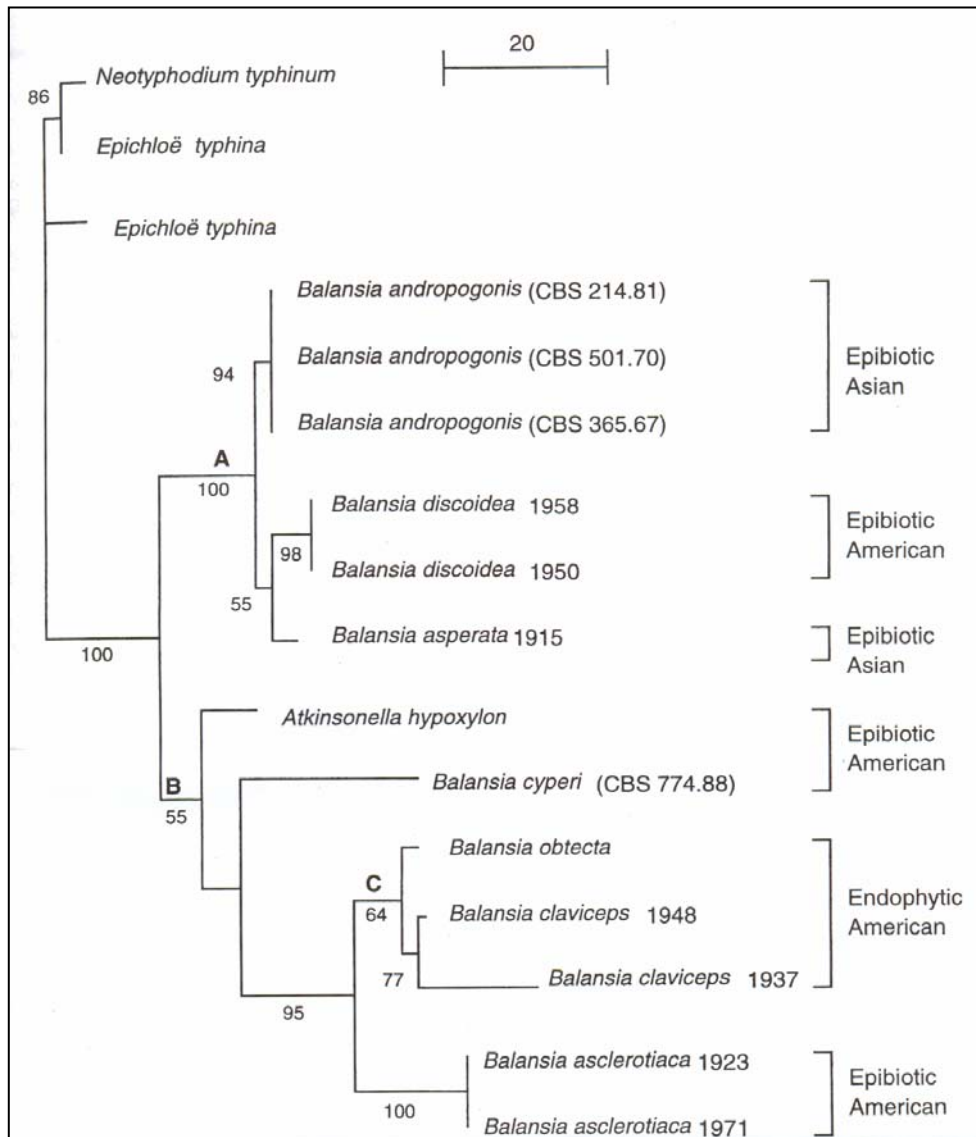


Abbildung 5.2 Stammbaum epibiontischer und endophytischer *Balansia*-Arten sowie deren Verwandtschaftsverhältnis zu *Epichloë*- und *Neotyphodium*-Arten; Ordnungen und Unterordnungen sind wie folgt markiert: A = *B. asperata*-Ordnung, B = *B. claviceps*-Ordnung, C = Endophyten-Unterordnung; die Ergebnisse beruhen auf ITS(Internal-Transcribed-Spacer)-1-Daten; die Zahlen an den Verzweigungen geben das prozentuale Verwandtschaftsverhältnis an; der Balken zeigt die Anzahl der Nukleotidwechsel pro Messeinheit; aus Reddy et al. 1998.

Trotz dieser evolutionären Verwandtschaft darf der unterschiedliche taxonomische Charakter von epibiontischen und endophytischen Infektionen nicht unterschätzt werden (Clay und Frenz 1993). Durch Untersuchungen der enzymatischen Ausstattung dieser Pilze wurden funktionelle Unterschiede herausgearbeitet. Stovall (1988) hat den epibiontischen *B. cyperi* mit dem endophytischen *B. obtecta* verglichen.

Dabei stellte er fest, dass beide Pilze mit einer Pektat-Lyase ausgestattet sind, diese jedoch nur von dem Endophyten nicht aber von dem Epibionten genutzt wird. Dieser Unterschied ist mit dem Wachstum von *B. obtecta* in den Interzellularen erklärbar, wo der Pilz das Pektin der Mittellamelle verwerten kann. White et al. (1991 b) zeigten, dass der epibiontische *Atkinsonella hypoxylon* Öle und Paraffin besser nutzen kann, als endophytische *Balansia*- und *Acremonium*-Arten. Ein Epibiont ist sicherlich prädestiniert, Wachse und Fette der Kutikula zu verwerten, während ein Endophyt die Kutikula nur zur Fruktifikation kontaktiert.

Solche signifikanten funktionellen Unterschiede könnten darauf hinweisen, dass epibiontische Pilze eine monophyletische Gruppe bilden (Clay und Frenz 1993). Durch die Ausbildung des Oberflächenwachstums ist hier eine weitere ökologische Nische entstanden.

5.2 Entdeckung epibiontischer Pilze auf Ergolinalkaloid-führenden Convolvulaceen

Convolvulaceen sind schon seit vielen Jahrzehnten als Ergolinalkaloid-führende Pflanzen bekannt (Hofmann 1960). Ebenso alt ist die Frage nach dem Biosyntheseort der Alkaloide (Taber und Heacock 1962). Die Vermutung lag nahe, dass die Alkaloidbildung, wie bei den Gräsern, von Pilzen übernommen wird. Taber und Heacock (1962) stellten jedoch die Hypothese auf, dass die Ergoline unabhängig von Pilzen und anderen Mikroorganismen in den Samen der Pflanzen gebildet werden. Mit Hilfe von Van Urk-Experimenten wiesen sie im Samenembryo von *Turbina corymbosa* Ergolinalkaloide nach, während sie in den äußeren Samenteil (Samenschale und Fruchtwand) keine Alkaloide fanden. Gleichzeitig wurden aus den äußeren Samenteil Pilze der Gattungen *Fusarium* und *Chaetomium* isoliert, die jedoch nicht als Alkaloidbildner bekannt waren. Einige Jahre später zeigten Mockaitis et al. (1973) anhand von Pfropfungsexperimenten mit *Ipomoea violacea*, dass der Ort der Alkaloidbiosynthese die Blätter der Pflanzen sind und die Akkumulation der Alkaloide in den Samen erfolgt. Die mögliche Beteiligung von Mikroorganismen an der Biosynthese war nach wie vor ungeklärt.

Im Rahmen der Dissertation von J. Groß (2004) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Pilze aus den Blättern und Stängeln der Ergolinalkaloid-führenden Convolvulaceen *Turbina corymbosa* und *Ipomoea asarifolia* isoliert, die

aufgrund der Isolierungsmethode (vgl. 3.3.1) als Endophyten galten. Ergolinalkaloide konnten sowohl in den Blättern und Stängeln als auch in den Samen der Pflanzen nachgewiesen werden. Diese Befunde ließen weiterhin die Vermutung zu, dass Pilze der Ort der Alkaloidbiosynthese sind. Da die Symbiose von Gräsern mit Ergolinalkaloid-bildenden Endophyten häufiger beschrieben wird und besser untersucht ist, als die Symbiose von Gräsern mit Ergolinalkaloid-bildenden Epibionten, wurden zunächst Endophyten als Alkaloidproduzenten in den Convolvulaceen favorisiert. Allerdings konnte für keinen der isolierten Pilze eine Beteiligung an der Alkaloidbiosynthese in den Pflanzen nachgewiesen werden (vgl. Dissertation J. Groß 2004, vgl. 4.6). Mit der Entdeckung epibiontischer Pilze auf den Blattoberflächen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (Kucht et al. 2004, Steiner et al. 2006) nahm die Forschung eine unerwartete Wende. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die ökologischen und biochemischen Interaktionen dieser Pflanze-Pilz-Symbiosen aufzuklären.

Der erste Schritt war die Überprüfung der Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Vorkommen der Epibionten. Diese Korrelation konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Fungizidversuchsreihen für beide Pflanzenarten zweifelsfrei nachgewiesen werden (vgl. 4.1 und 4.2). Molekularbiologische Ergebnisse von A. Markert und M. Ahimsa-Müller haben die Korrelation ebenfalls bestätigt (vgl. 4.5): Die Pilze wurden als Clavicipitaceen-Pilze identifiziert und das einleitende Gen der Ergolinalkaloid Biosynthese, das sog. dmaW-/cpd1-Gen, vollständig aus den Pilzen isoliert und sequenziert (Steiner et al. 2006, pers. Mitteilung A. Markert). Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die dmaW-/cpd1-Gensequenzen des *Ipomoea*-Pilzes (Iasa-F13) und des *Turbina*-Pilzes (Tcor-F01) eine Ähnlichkeit von 92% haben, während die ITS-Regionen sowie die 18S-rDNA sogar zu 100% übereinstimmen. Auch hierdurch wurden die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit bestätigt: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben die enorme Ähnlichkeit der Pilzstrukturen deutlich gemacht (vgl. Abb. 4.4, 4.7, 4.16 und 4.17).

Im Verlauf der Arbeit ergaben sich zahlreiche weitere Fragestellungen bezüglich der Pflanze-Mikroorganismus-Interaktionen:

- Wie werden die epibiontischen Pilze verbreitet ?
- Gibt es Anzeichen für ein fakultativ endophytisches Dasein der Pilze ?
- Sind die Interaktionen wirtsspezifisch ?
- Welche Leistungen haben beide Partner zu erbringen und wie profitieren sie davon ?
- Welche Funktion haben in diesem Zusammenhang die Ergolinalkaloide ?
- Welche Rolle spielen Pilz bzw. Pflanze bei der Alkaloidbiosynthese ?

Ausgangspunkt für die experimentellen Ansätze zur Klärung dieser Fragen waren die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse über Poaceen. Beobachtungen und Befunde der durchgeführten Untersuchungen sollen hier kritisch überprüft und mit der bekannten Literatur verglichen werden.

5.3 Beurteilung der Fungizidversuche

5.3.1 Wirkung der Fungizide

Die Behandlung von *I. asarifolia* und *T. corymbosa* mit **Pronto Plus**[®] und **Folicur**[®] führte zur vollständigen bzw. fast vollständigen Eliminierung von Pilz und Alkaloiden (vgl. 4.1.1, 4.2.1, 4.2.3.3 und 4.2.3.4).

Pronto Plus[®] und Folicur[®] haben systemische Wirkung. Beide Fungizide sind altbewährt, werden allerdings i.d.R. für die Getreidebehandlung (Folicur[®] auch für die Rapsbehandlung) eingesetzt.

Pronto Plus[®] enthält zum Einen den Wirkstoff Triazol (Tebuconazol) und zum Anderen Spiroxamin ein Spiroketalamin. Folicur[®] enthält ausschließlich den Wirkstoff Triazol. Beide Wirkstoffe inhibieren die Sterolbiosynthese zum Aufbau der Zellmembran des Pilzes. Triazol inhibiert spezifisch die Ergosterolbiosynthese (Buchenauer 1987) und Spiroxamin inhibiert zusätzlich die Biosynthese anderer Sterole (National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals 2001).

Die Inhibitoren greifen in die C-14-Demethylierung von 24-Methylen-Dihydrolanosterol (Eburicol) ein (Buchenauer 1987), dies führt zur Akkumulation von zahlreichen Vorstufen (Buchenauer 1987). In Abbildung 5.3 wird der Ergosterol-Biosyntheseweg dargestellt sowie die Position der Inhibierung gezeigt.

Die meisten Pilzen produzieren zum Aufbau ihrer Zellmembran hauptsächlich Ergosterol (24-Methyl-cholesta-5,7,22-trien-3 β -ol) (Buchenauer 1987). Auch in den Pilzen Iasa-F13 und Tcor-F01 konnte Ergosterol nachgewiesen und als Indikator für die Pilzdichte genutzt werden (vgl. 4.7.4). Dabei wurde festgestellt, dass beinahe die gesamte Pilzbiomasse in den Blattknospen der beiden Pflanzenarten konzentriert ist (vgl. Tab. 4.12). Es kann demnach vermutet werden, dass die Eliminierung der Pilze nur erfolgreich ist, wenn das Fungizid die jungen Blattknospen erreicht. Systemische Wirkstoffe können über die Blätter oder die Wurzeln aufgenommen und vom

Transportsystem der Pflanze verlagert werden. Vor allem junge Triebe werden durch systemische Fungizide gut erreicht (Henningsen 2003).

Wie bereits unter 5.1.2 beschrieben, ist das epibiontische Pilzwachstum auf jungen Trieben und meristematischen Regionen auch bei den Poaceen ein viel beobachtetes Phänomen. Epibionten scheinen ihre Nahrungsquellen auf der Oberfläche junger Blätter und Blattknospen zu finden (Clay und Frenz 1993). Die Eliminierung der Pilze in diesem Stadium ist folglich besonders effektiv, da ihre Etablierung und Entwicklung auf den Pflanzen unterbunden wird.

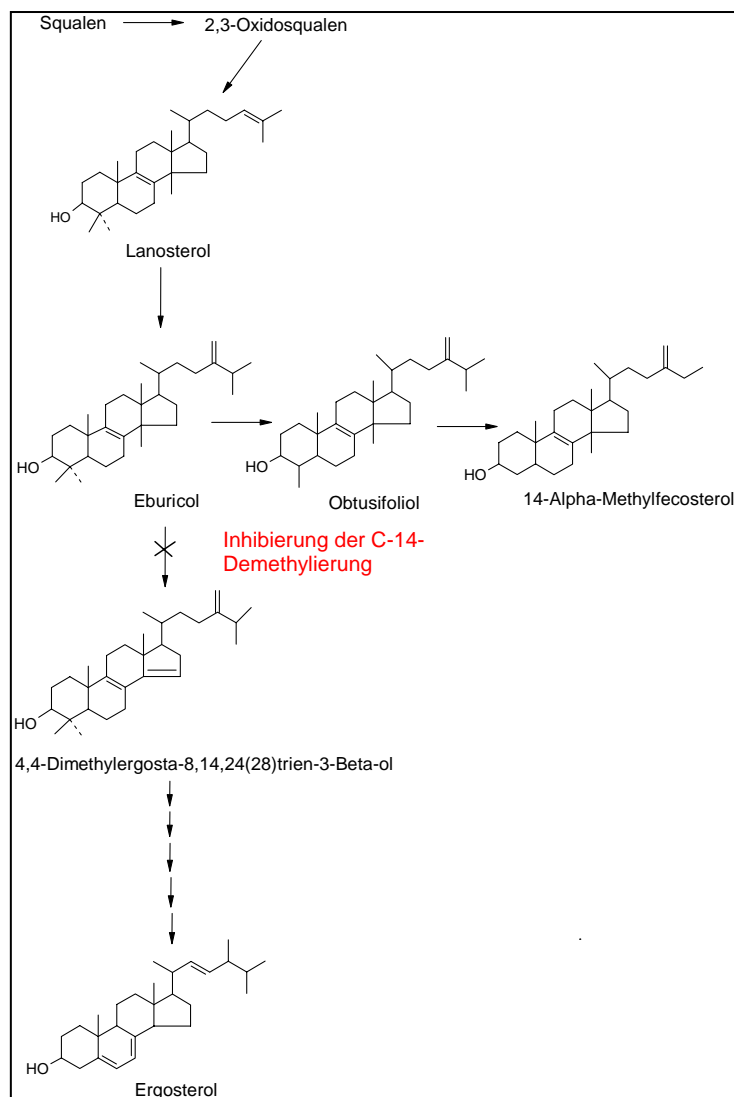


Abbildung 5.3 Biosynthese von Ergosterol; Inhibierung der C-14-Demethylierung durch den Wirkstoff Triazol der Fungizide Pronto Plus und Folicur; aus Buchenauer 1987.

Die Wirkung des Fungizids **Switch**[®] auf Pilz- und Alkaloidvorkommen der beiden Pflanzenarten *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (vgl. 4.1.1, 4.2.1, 4.2.3.3 und 4.2.3.4) war in dem obigen Kontext zunächst schwer verständlich. Nach der Behandlung von *I. asarifolia* mit Switch[®] wurde keine nennenswerte Wirkung festgestellt. Der epibiontische Pilz Iasa-F13 war in unveränderter Ausprägung nachweisbar, auch der Alkaloidgehalt blieb fast identisch. Dagegen führte die Behandlung von *T. corymbosa* mit Switch[®] zur fast vollständigen Eliminierung des Pilzes Tcor-F01 und der Alkaloide.

Switch[®] enthält zum Einen den Kontaktwirkstoff Pyrrolnitrin (Fludioxonil), welcher die membranabhängigen Transportprozesse des Pilzes beeinflussen soll. Zum Anderen ist der systemische Wirkstoff Pyrimidinamin (Cyprodinil) enthalten, welcher laut Hersteller die Biosynthese von Aminosäuren des Pilzes verhindert. Dies soll bei seinem Eindringen in das Pflanzengewebe oder während des Mycelwachstums erfolgen. Switch[®] ist ein neues Präparat mit neuartigen Wirkstoffgruppen. Interessant erschien insbesondere der Einfluss auf den Aminosäurestoffwechsel des Pilzes, eine bisher seltene Form der Pilzbekämpfung. Laut Herstellerangaben zeigen biochemische Studien, dass Cyprodinil die Methionin-Biosynthese hemmt. Angriffspunkt ist nach bisherigen Erkenntnissen das Enzym Cystathionin- β -lyase, welches an der Bildung von Methionin beteiligt ist (vgl. 8.1).

Da das Fungizid den epibiontischen Pilz auf den Blättern der *Turbina*-Pflanzen erreicht, nicht aber auf den Blättern der *Ipomoea*-Pflanzen, ist die Wirkung offensichtlich pflanzenspezifisch. Greift man die oben vermutete Eliminierung der Pilze in den Blattknospen auf, so stößt man auf einen signifikanten physiologischen Unterschied der beiden Pflanzenarten: Die Blattknospen von *T. corymbosa* öffnen sich wesentlich schneller als die von *I. asarifolia* (vgl. 4.7.4). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass hier hauptsächlich der Kontaktwirkstoff Pyrrolnitrin und nicht der zunächst favorisierte systemische Wirkstoff Pyrimidinamin eine Rolle spielt. Durch das schnellere Öffnen der schützenden Blattknospen wird der Pilz Tcor-F01 noch in seiner Reproduktionsphase getötet, während der Pilz Iasa-F13 diese nach dem Öffnen der Blattknospen schon hinter sich hat.

Unabhängig von der Wirkung der einzelnen Fungizide haben die Fungizidversuche gezeigt, dass mit der Eliminierung der Pilze auf den Pflanzen auch eine Eliminierung der Alkaloide erfolgt. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen an Poaceen: Alle in infizierten Gräsern vorkommenden Alkaloidklassen (Ergolinalkaloide, Lolinalkaloide,

Peraminalkaloide und Lolitrealkaloide) wurden von reinen Pilzkulturen produziert (Porter 1994, Blankenship et al. 2001), fehlten jedoch in nicht-infizierten Gräsern (Clay und Schardl 2002).

5.3.2 Beeinflussung der Produktion von Ätherischem Öl

Um den generellen Einfluss der Fungizidbehandlung auf den Sekundärstoffwechsel der Pflanzen zu überprüfen, wurde Ätherisches Öl vor und nach der Behandlung mit Folicur[®] untersucht (vgl. 4.1.2 und 4.2.3.5). Dabei wurde festgestellt, dass die Ätherisch Öl-Produktion durch den Einsatz des Fungizids keinesfalls gehemmt, dafür jedoch geringfügig angeregt wird. Hierfür gibt es folgende mögliche Erklärungen:

Es kann vermutet werden, dass die Pilze das Isopren der Ätherisch Öl-Komponenten als Nahrungsquelle bzw. für die Biosynthese der Alkaloide (siehe Abb. 1.6) nutzen. Die bisherigen Beobachtungen zeigen eine enge Bindung des Pilzwachstums an die lipophilen Drüschuppen der Pflanzen (vgl. 4.8.2, siehe Abb. 5.4). Die Katabolisierung von Isoprenoiden durch die Pilze ist daher sehr gut denkbar.

Wie schon unter 5.1.2 erläutert, sind epibiontische Pilze mit funktionellen Möglichkeiten ausgestattet, die es ihnen erlauben, die Ressourcen der Pflanzenoberfläche zu nutzen. Smith et al. (1985) beschreiben die Translokation von ¹⁴C-markierter Saccharose in den Blättern von Bahiagrass aufgrund des epibiontischen Pilzes *Myriogenospora atramentosa*. Man beobachtete die Wanderung der ¹⁴C-Saccharose von einem Blatt durch die „Stroma-Brücke“ des Pilzes hindurch zum nächsten Blatt. Dabei verblieb der größte Teil der Saccharose im Stroma des Pilzes. Dies zeigte, dass der Zucker aus den Pflanzen entfernt und vom Pilz aufgenommen wurde. In mikroskopischen Untersuchungen wurden keine Anzeichen für eine Penetration oder Veränderung der Kutikula durch den Pilz gefunden. Der Pilz war demnach in der Lage, Assimilationsprodukte wie die Saccharose zu erreichen, ohne in die Pflanze einzudringen. Allerdings fand man nach Ablösung der Kutikula, dass die Epidermiszellen unter dem Pilzmycel in Größe und Form verändert waren. Dies schien den Stoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze zu gewährleisten.

Auch Drüschuppen bestehen aus modifizierten Epidermiszellen. Sie sind zudem aufgrund ihrer exponierten Lage für epibiontische Pilze gut erreichbar.

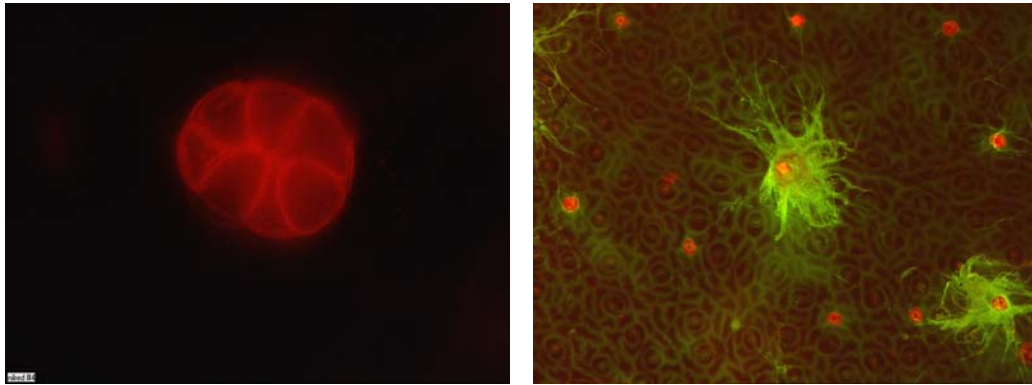


Abbildung 5.4 Links: Lichtmikroskopische Aufnahme (1000fach) einer Drüsenschuppe auf der Blattoberfläche von *Ipomoea asarifolia* nach Fluoreszenz-anfärbung mit Nil rot; Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme (100fach) der Blattoberfläche von *Ipomoea asarifolia* nach Fluoreszenz-anfärbung mit Oregon grün-markiertem Wheat Germ Agglutinin (Pilzmycel) und Nil-rot (Drüsenschuppen).

Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass den Pflanzen nach Eliminierung der Alkaloide bzw. des Pilzes ein wichtiges Abwehrsystem fehlt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Pflanzen verstärkt auf andere vorhandene Abwehrsysteme wie z.B. die Ätherisch-Öl-Produktion zurückgreifen. Ätherisches Öl hat ebenso wie Alkaloide antimikrobielle Wirkung bzw. dient der Abwehr gegen tierischen Fraß (Heldt 1996). Mechanismen der pflanzlichen Abwehr, dazu gehört auch die Synthese von Isoprenoiden, werden durch Genexpression reguliert (Dong 2001). Beispielsweise erfolgt im Falle von Verwundungen oder Infektionen ein sehr schnelles Umschalten des Isoprenoidstoffwechsels durch elicitorgesteuerte Genexpression: So führt die durch einen Pilzelicitor in Tabakzellen ausgelöste Phytoalexinsynthese dort zu einem Stillstand der Steroidsynthese. Die Zelle konzentriert dann ihre Isoprenoidsynthesekapazität auf die Abwehr (Heldt 1996). Ein solches „Umschalten“ ist auch im vorliegenden Fall denkbar. Die vorher vom Pilz zur Alkaloidbiosynthese benötigten Isoprenoide werden nun möglicherweise von der Pflanze für die Ätherisch Öl-Produktion genutzt.

Die geringe Quantitätssteigerung der Ätherisch-Öl-Produktion ist unter Umständen auf den Gewächshausstandort zurückzuführen. Im Gewächshaus sind biotische und abiotische Schadfaktoren nur eingeschränkt vorhanden. Aufschlussreich wäre eine Untersuchung am natürlichen Standort.

5.4 Überlegungen zu Lebensweise und Verbreitung der epibiontischen Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01

5.4.1 Führen die Pilze ein Dasein zwischen Epibiont und Endophyt bzw. zwischen Mutualist und Antagonist ?

Die unter 5.1.2 beschriebene verwandtschaftliche Nähe von epibiontischen und endophytischen Clavicipitaceen-Pilzen ließ die Überlegung zu, dass die epibiontischen Pilze Iasa-F13 und Tcor-F01 ein fakultativ endophytisches Dasein führen.

White et al. (1996) beschreiben das gleichzeitige Vorkommen von endophytischen und epibiontischen Hyphen in bzw. auf den Blättern der Poaceen *Agrostis hiemalis* und *Poa rigidifolia*. Mikroskopische Studien der Konidien und Konidienträger identifizierten Epibiont und Endophyt als den Clavicipitaceen-Pilz *Acremonium typhinum*. Es wurde angenommen, dass die unterschiedliche Verfügbarkeit pflanzlicher Nährstoffe während des Pflanzenwachstums der Grund für die zweigleisige Entwicklung war.

Auf den Blattoberflächen von *I. asarifolia* und *T. corymbosa* gaben Appressorien-ähnliche Strukturen einen Hinweis auf eine mögliche Penetration (vgl. 4.3.2.2).

Appressorien haften mit hohem Druck an der Pflanzenoberfläche. Dieser Druck leitet das Eindringen von Infektionshyphen in die Kutikula ein. Daher wurde das Pilzmycel von Iasa-F13 mittels Ultraschall von der Blattoberfläche abgelöst und die darunter liegende Epidermis nach Penetrationsstellen untersucht (vgl. 4.3.2.2). Dabei zeigte sich, dass der Pilz eine enorme Bindung an die Kutikula der Pflanzen aufweist: Mit dem Ablösen des Mycels lösten sich auch große Teile der Kutikula (siehe Abb. 4.19). Allerdings wurden weder Penetrationsstellen gefunden noch, wie spätere TEM-Untersuchungen zeigten (vgl. 4.3.2.4), zelluläre bzw. interzelluläre Hyphen. Ein endophytisches Dasein von Iasa-F13 und Tcor-F01 konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Beobachtungen deuten jedoch möglicherweise darauf hin, dass der Pilz einen Infektionsvorgang einleitet aber nicht beendet, da er im Laufe der Evolution die Fähigkeit zur Infektion verloren hat. Für die Penetration der pflanzlichen Zellwand benötigen Pilze Zellwand-abbauende Enzyme wie Pektinasen, Cellulasen und Xylanasen. Vorkommen und Bedeutung dieser Enzyme werden von Tudzynski und Scheffer (2004) am Beispiel des Gras-Parasiten *Claviceps purpurea* dargestellt. Pilz-Pflanze-Symbiosen werden häufig von der pflanzlichen Physiologie und den Standortbedingungen bestimmt (Saikkonen et al. 2004, Redman et al. 2001),

insbesondere pathogene Pilze reagieren auf die Signale ihrer Umwelt. Diese Signale resultieren letztlich in veränderter Genexpression (Tudzynski und Scheffer 2004) wobei verschiedene Kombinationen von Aktivatoren und Repressoren ein Ein- und Ausschalten von Genen bewirken (Heldt 1996). Eine Untersuchung des Genoms von Iasa-F13 und Tcor-F01 hinsichtlich der Codierung Zellwand-abbauender Enzyme wäre daher von großem Interesse. Möglicherweise waren die vermeintlichen Mutualisten Iasa-F13 und Tcor-F01 unter anderen Lebensbedingungen Parasiten. Wie auch schon unter 5.1.1 am Beispiel von *Neotyphodium* sp. dargestellt wurde, ist der Übergang von Mutualismus zu Antagonismus und umgekehrt oft fließend (Schardl et al. 2004).

5.4.2 Erfolgt die Verbreitung der Pilze in den Samen ?

Da bisher weder im Gewebe noch auf den Blattoberflächen von *I. asarifolia* bzw. *T. corymbosa* Vermehrungsstrukturen von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 gefunden wurden (vgl. 4.3.2.2) lag die Vermutung nahe, dass sich die Pilze in den Samen vermehren.

Wie in den Kapiteln 4.3.1 und 4.7.2 gezeigt wird, sind *Ipomoea*- und *Turbina*-Pflanzen, die aus sterilisierten Samen unter sterilen Bedingungen angezogen werden, sowohl pilz- als auch alkaloidführend. Zudem wurden die „Internal-Transcribed-Spacer(ITS)-Regionen“ der beiden Clavicipitaceen-Pilze im Rahmen der Doktorarbeit von M. Ahimsa-Müller in den Samen der Pflanzen gefunden (Steiner et al. 2006). Eine vertikale Transmission (Vermehrung in den Samen) von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 ist demnach sehr wahrscheinlich.

Die vertikale Vermehrung ist bei Gras-Endophyten aus der Familie der Clavicipitaceen keine Seltenheit (vgl. 5.1.1). Diese Art der Vermehrung ist gleichzeitig immer asexuell (siehe Abb. 5.1), da die Pilze keine Vermehrungsstrukturen im oder auf dem Blattgewebe bilden. Vertikal übertragene Pilze fügen den Pflanzen keinen Schaden zu und gelten daher als Mutualisten (Schardl et al. 2004).

Weitere Hinweise auf eine Vermehrung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 in den Samen geben die Ergebnisse der „Attachment-Versuche“ (vgl. 4.3.2.1) und der Inokulationsversuche (vgl. 4.6). In keiner dieser Versuchsreihen wurde die Verbreitung des Pilzmycels über die vegetativen Pflanzenorgane beobachtet.

Auch diese Befunde werden durch Experimente mit Gräser besiedelnden Clavicipitaceen-Pilzen bestätigt: Die experimentelle Infektion von Wirtspflanzen mit

asexuellen Vermehrungsstrukturen wie Konidien und Mycel ist sehr schwierig und kommt in der Natur nicht vor (Gentile et al. 2005).

5.5 Bedeutung der Pfropfversuche

Die Pfropfversuche (vgl. 4.3.2.3) sollten einerseits ein möglicherweise endophytisches Vorkommen der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 (vgl. 5.4.1) klären und andererseits Auskunft über Biosynthese und Verteilung der Ergolinalkaloide in den Pflanzen geben. Es zeigte sich, dass die epibiontischen Pilze nicht von pilzführenden zu pilzfreien Pflanzenteilen wandern. Denkbar wäre die Wanderung mittels interzellulärer Sporen oder Mycel. Wie jedoch schon die TEM-Untersuchungen gezeigt haben, scheinen die Pilze in der momentanen Lebensphase keine endophytischen Strukturen zu entwickeln (vgl. 5.4.1). Desweiteren stellte sich heraus, dass die Alkaloide nur in Gegenwart der epibiontischen Pilze gebildet und am Bildungsort gespeichert werden. Eine Verlagerung der Alkaloide über den Transpirationsstrom der Pflanzen findet möglicherweise nicht statt. In jeder Versuchsanordnung (alkaloid-/pilzfreies Reis auf alkaloid-/pilzführende Unterlage bzw. alkaloid-/pilzführendes Reis auf alkaloid-/pilzfreie Unterlage) blieben alkaloid-/pilzführende Pflanzen alkaloid-/pilzführend und alkaloid-/pilzfreie Pflanzen alkaloid-/pilzfrei.

Moritz (1953) beschreibt Pfropfexperimente, in denen alkaloidfreie Tomatenreiser auf alkaloidhaltige Tabakwurzeln gepfropft wurden. Die Tomaten enthielten in dieser Anordnung Tabakalkaloide, deren Verlagerung über den Transpirationstrom erfolgte. Umgekehrt wurden alkaloidhaltige Tabakreiser auf alkaloidfreie Tomaten gepfropft, was zu alkaloidfreien Tabakpflanzen führte. Hier wird deutlich, dass die Alkaloide ein Stoffwechselprodukt der Tabakwurzeln sind. Die Alkaloide werden offensichtlich in den Tabakwurzeln gebildet und von dort in die oberirdischen Pflanzenteile weitergeleitet.

Die Ergolinalkaloidbiosynthese in *I. asarifolia* und *T. corymbosa* scheint hingegen unmittelbar von den epibiontischen Pilzen abhängig zu sein. Die Alkaloide sind mit großer Wahrscheinlichkeit kein Stoffwechselprodukt der Pflanzen und werden offensichtlich auch nicht innerhalb der Pflanzen weitertransportiert.

5.6 Beobachtungen zum Vorkommen weiterer Pilzisolat

Aus *Ipomoea asarifolia* wurden im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche weitere Pilze isoliert, welche hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Ergolinalkaloid Biosynthese in den Pflanzen untersucht wurden. Die Pilze galten aufgrund der Isolierungsmethode (vgl. 3.3.1) als Endophyten (Petrini et al. 1992). In den Kapiteln 4.5 und 4.6 wurde jedoch bereits die Vermutung geäußert, dass es sich trotz der Isolierungsmethode nicht um Endophyten sondern um Pilze aus Sporenablagerungen handelt.

Den ersten Anstoß zu solchen Überlegungen gaben die TEM-Untersuchungen der Blätter (vgl. 4.3.2.4), in denen keine endophytischen Strukturen gefunden wurden. Inter- bzw. intrazelluläre Strukturen von Endophyten sind elektronenmikroskopisch deutlich erkennbar und werden in der Literatur häufig abgebildet (z.B. Clay und Leuchtmann 1997 in Clay und Schardl 2002). Gleichzeitig haben lichtmikroskopische Untersuchungen von *I. asarifolia* und *T. corymbosa* gezeigt, dass sich an den Blatträndern zahlreiche Pilzsporen befinden, die nicht selten der Sterilisation standhalten (vgl. 4.5).

Allerdings wurden mittels Single strand conformation polymorphism (SSCP) pilzlicher DNA aus den Blättern von *I. asarifolia* neben dem Pilz Iasa-F13 geringe Mengen weiterer Pilze detektiert (Steiner et al. 2006). Dies ist jedoch nur im ersten Moment ein Widerspruch. Eine genauere Betrachtung zeigt, dass die zusätzlichen Banden zwar in der Pilz-DNA aus Blättern bzw. Samen unsteriler Pflanzen vorkommen, in pilzlicher DNA aus Blättern steril angezogener Pflanzen und aus sterilen Kallus- bzw. Suspensionskulturen ist jedoch ausschließlich die Bande des Pilzes Iasa-F13 sichtbar. Im Hinblick auf fehlende mikroskopisch sichtbare Pilzstrukturen handelt es sich bei der zusätzlichen Pilz-DNA mit großer Wahrscheinlichkeit um Sporenverunreinigungen.

Die Inokulationsversuche (vgl. 4.6) geben ebenfalls Anlass zu einer solchen Vermutung. Wie lichtmikroskopische Untersuchungen gezeigt haben, konnte sich auf den Blattoberflächen aller *Ipomoea*-Pflanzen, die mit *Penicillium roquefortii* angeimpft wurden, ein *Penicillium*-Pilz etablieren. *P. roquefortii* galt wie alle aus den Pflanzen isolierten Pilze als endophytischer Pilz. Im Gewebe der Pflanzen wurde jedoch weder unter natürlichen noch unter experimentellen Bedingungen *Penicillium*-Mycel gefunden. Auch auf den Blattoberflächen war unter natürlichen Bedingungen kein *Penicillium*-Mycel auffindbar. Der Pilz kann demnach als unspezifischer „Gast“ betrachtet werden, der es mittels experimenteller Infektion geschafft hat, sich auf der

Blattepidermis von *Ipomoea asarifolia* zu etablieren. *P. roquefortii* ist ein ubiquitär vorkommender Pilz (Ohomo et al. 1975, Boysen 1999, Carlile et al. 2001) und daher offensichtlich flexibel und anpassungsfähig.

Da *P. roquefortii* als Indolalkaloidbildner bekannt ist (vgl. 4.6) konnte man überdies vermuten, dass die alkaloidfreien Pflanzen nach der erfolgreichen Infektion Alkaloide führen werden. Das Ergebnis war jedoch negativ: Obwohl die Pflanzen bei der Ernte in gutem Zustand waren, wurden in keiner Pflanze Alkaloide detektiert. Eventuell fehlen dem Pilz für ein epibiontisches Dasein auf den Blattoberflächen dikotyler Pflanzen die nötigen Enzyme um seinen Stoffwechsel uneingeschränkt aufrechtzuerhalten (vgl. 5.1.2). Trotz seiner Anpassungsfähigkeit ist das natürliche Lebensgebiet von *P. roquefortii* gelagertes Getreide und Silofutter. Er ist in der Lage, unter extrem O₂-armen bzw. CO₂-reichen Bedingungen zu wachsen und produziert insbesondere unter Luftabschluss Mycotoxine, wie z.B. Indolalkaloide (Boysen 1999).

Wie problematisch das Zustandekommen einer funktionierenden Symbiose sein kann, wird auch in der Literatur dargestellt: Gentile et al. (2005) schreiben, dass jede stabile mutualistische Gras-Endophyt-Symbiose offensichtlich eine Co-Adaptation von Wirt und Endophyt benötigt. Co-Adaptation heißt, Wirt und Pilzsymbiont passen sich gemeinsam an ihre Umwelt an und erhöhen so ihre Überlebenschance aber auch ihre gegenseitige Abhängigkeit. Sobald der Endophyt seinen Wirt wechselt führt dies zu unstabilen Verhältnissen bis hin zur pflanzlichen Nekrose. Auch Schardl et al. (2004) haben bei Inokulationsversuchen beobachtet, dass neue Assoziationen häufig zu Inkompatibilitätsreaktionen wie frühzeitiges Absterben von Pilzhyphen oder Pflanzenzellen führen. Solche Beobachtungen wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls gemacht: Die Infektion von *I. asarifolia* mit *Balansia obtecta* bzw. *Claviceps purpurea* führte zu Blattnekrosen und zum vollständigen Absterben der Pilze (vgl. 4.6). Beide Pilzarten sind Isolate aus Poaceen (vgl. Tab. 2.12), sie wurden nicht aus den Convolvulaceen isoliert.

Obwohl das Absterben von pilzlichen oder pflanzlichen Zellen nach der Infektion mit *P. roquefortii* nicht beobachtet wurde, deutet alles darauf hin, dass der Pilz kein natürlicher Lebenspartner von *I. asarifolia* ist, sondern aus Sporenablagerungen stammt. Die Sporen keimen vermutlich nach der Isolierung unter den besonders günstigen in vitro-Bedingungen aus und der wenig spezifische Pilz lässt sich durch Infektion der Pflanzen relativ einfach verbreiten. Alle weiteren für die Inokulationsversuche verwendeten Pilze lassen sich ebenfalls einfach auf Nährmedium vermehren, konnten sich jedoch auf den Pflanzen nicht etablieren.

Im Vergleich dazu konnten die epibiontischen Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 bisher weder auf Nährmedium vermehrt (vgl. 4.4) noch experimentell verbreitet (vgl. 4.3.2.1, 4.3.2.3 und 4.6) werden. Diese fehlende Flexibilität der beiden Epibionten ist ein deutliches Zeichen für ihre spezifische Bindung an *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa*. Wie schon unter 5.4.2 vermutet, vermehren sich die Pilze offensichtlich ausschließlich in den Samen der Pflanzen.

Im Kontext der obigen Betrachtungen kann davon ausgegangen werden, dass alle neben Iasa-F13 und Tcor-F01 isolierten Pilze keine natürlichen Symbionten von *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* sind und daher auch keine Rolle bei der Ergolinbildung spielen.

5.7 Beurteilung der spezifischen Rolle von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 bei der Alkaloidbildung

Seit der Entdeckung von Ergolinalkaloiden in Convolvulaceen besteht die Frage nach ihrem Biosyntheseort (vgl. 5.2): Werden die Alkaloide im Pflanzengewebe produziert oder von assoziierten Mikroorganismen? Trotz der umfangreichen Beschreibungen Alkaloid-produzierender Clavicipitaceen-Pilze in Poaceen (vgl. 5.1) war diese Frage bis heute unerforscht. Auch im vorliegenden Fall ist die spezifische Rolle der epibiontischen Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 und die mögliche Beteiligung der Pflanzen bei der Alkaloidbildung bisher nicht vollständig geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand diverser Experimente versucht, Erklärungsansätze zu finden.

5.7.1 Einfluss des pflanzlichen Stoffwechsels auf die Alkaloidbildung

Frühere Untersuchungen von Symbiosen zwischen Gräsern und Alkaloid-bildenden Endophyten haben gezeigt, dass Alkaloidgehalt und Pilzdichte in den Pflanzen miteinander korrelieren (Ball et al. 1995, Keogh et al. 1996, Easton et al. 2002). In aktuellen genetischen und in vitro-Studien wurde jedoch festgestellt, dass der Alkaloidgehalt nicht nur von der Pilzdichte, sondern auch von Genotyp, Gewebebeschaffenheit, Alter und Wachstumsbedingungen der Pflanzen entscheidend beeinflusst wird (Clay und Schardl 2002, Spiering et al. 2005).

Um den Zusammenhang von pflanzlichem Stoffwechsel, Pilzwachstum und Alkaloidbiosynthese bei den Convolvulaceen zu überprüfen, wurden die Pflanzen unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ausgesetzt (vgl. 4.7.1). Dabei gaben einige Beobachtungen einen deutlichen Hinweis auf die Rolle der Pflanzen bei der Alkaloidbildung (vgl. Tab. 4.10):

- 1.) Die „Schattenpflanzen“ von *T. corymbosa* waren in sehr gutem Zustand. Unter diesen Bedingungen war das Pilzwachstum durchschnittlich, der Alkaloidgehalt jedoch überdurchschnittlich.
- 2.) Die Turbina-Pflanzen mit zusätzlicher Nährstoffversorgung waren in durchschnittlich gutem Zustand. Das Pilzwachstum war auch hier durchschnittlich, der Alkaloidgehalt jedoch unterdurchschnittlich.

Geht man davon aus, dass der Pilz der alleinige Alkaloidproduzent ist, so scheint seine Biosyntheseaktivität nicht nur von seinem quantitativen Vorkommen sondern vielmehr auch von dem Zustand der Pflanzen abhängig zu sein. Wie die obigen Beispiele zeigen, gedeihen die *Turbina*-Pflanzen im Schatten besonders gut, während das Wachstum bei zusätzlicher Nährstoffversorgung nur durchschnittlich ist. Diese unterschiedlichen Bedingungen beeinflussen offensichtlich die Biosyntheseaktivität des Pilzes. Der Alkaloidgehalt ist in den wachstumsstarken Pflanzen bei gleichbleibender Biomasse des Pilzes deutlich höher als in den wachstumsschwachen Pflanzen.

Im Falle der *Ipomoea*-Pflanzen erreichte das Pflanzenwachstum maximal durchschnittliche Qualität (vgl. Tab. 4.10). Daher gab es hier keine Möglichkeit eine höhere Biosyntheseaktivität des Pilzes in wachstumsstarken Pflanzen nachzuweisen. Das besonders schlechte Wachstum der „Schattenpflanzen“ von *I. asarifolia* hatte zur Folge, dass sowohl Alkaloidgehalt als auch Pilzdichte auffällig nachließen.

Weitere Beobachtungen zur Korrelation von Pflanzenbeschaffenheit und Alkaloidvorkommen wurden während der Fungizidversuche gemacht (vgl. 4.1 und 4.2): Die unbehandelten Pflanzen von *T. corymbosa* enthielten nach der 1. Versuchsreihe (September 2003 bis Januar 2004) 9,2 µg Alkaloide/g Frischgewicht. Nach der 2. Versuchsreihe (Februar bis Juni 2004) enthielten sie 21,7 µg Alkaloide/g Frischgewicht. Das Pilzmycel war in beiden Fällen stark ausgeprägt. Da die 1. Versuchsreihe im Herbst bzw. Winter und die 2. Versuchsreihe im Frühling erfolgte, spielte der pflanzliche Stoffwechsel auch hier offensichtlich eine große Rolle. Der Frühling ist für die meisten Pflanzen Wachstumszeit und bedeutet hohe

Stoffwechselaktivität. Wie oben bereits beobachtet, scheint die Stoffwechselaktivität der Pflanzen mit der Biosyntheseaktivität des Pilzes zu korrelieren.

Da die Fungizidversuche mit *I. asarifolia* beide im Frühling bzw. Sommer erfolgten (1. Versuchsreihe: Mai bis September 2002; 2. Versuchsreihe: Juni bis Oktober 2003), ist es in diesem Kontext nicht erstaunlich, dass der Alkaloidgehalt der unbehandelten Pflanzen in beiden Versuchen fast identisch war (etwa 6 µg Alkaloide/g Frischgewicht).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Alkaloidproduktion in den Convolvulaceen besonders gut funktioniert, wenn genügend pflanzliche Ressourcen zur Verfügung stehen. Es ist anzunehmen, dass dies der Preis ist, den die Pflanzen an die epibiontischen Pilze zahlen müssen, um den Schutz der Alkaloide gegen pathogene Mikroorganismen bzw. Herbivoren zu erhalten. Dieser Schutz spielt am natürlichen Standort der Pflanzen sicher eine größere Rolle als im Gewächshaus.

Die Verfügbarkeit von Ressourcen hat auch bei Gras-Endophyt-Symbiosen einen entscheidenden Einfluss auf das Verhältnis von Kosten und Nutzen der Pilzinfektion für den Wirt. Eine Änderung dieses Verhältnisses kann die Wirt-Endophyt-Beziehung sehr schnell von mutualistisch zu kommensalistisch oder sogar antagonistisch verschieben (Saikkonen et al. 1999, Cheplick et al. 2000, Ahlholm et al. 2002).

5.7.2 Erklärungsansätze für den sinkenden Pilz- und Alkaloidgehalt bei zunehmendem Blattalter

In den unter 4.7.4 beschriebenen Versuchen wurden Pilzbiomasse und Alkaloidgehalt verschiedener Blattstadien miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass fast die gesamte messbare Pilzbiomasse beider Convolvulaceen in den Blattknospen bzw. ganz jungen Blättern vorkommt, während in älteren Blättern nur Spuren messbar waren. Auch der Alkaloidanteil ist in jungen Blättern insbesondere in den Blattknospen wesentlich höher als in älteren Blättern.

Dieses Phänomen kann unterschiedliche Ursachen haben:

- 1.) Pilzwachstum und Alkaloidbiosynthese finden in den Blattknospen statt und stagnieren mit dem Blattwachstum.
- 2.) Die Alkaloide unterliegen einem „Turn-over“, d.h. sie werden im Laufe des Blattwachstums verstärkt abgebaut.
- 3.) Es erfolgt eine Translokation der Alkaloide und des Pilzes in die Blüten der Pflanzen.

Wie schon unter 5.7.1 erwähnt, ist der Zusammenhang von pflanzlicher Gewebebeschaffenheit und Alkaloidbildung aus den Symbiosen von Gräsern und Endophyten bekannt. Alter und Lage des pflanzlichen Gewebes, welches der Endophyt besiedelt, scheinen die Alkaloidkonzentration entscheidend zu beeinflussen. Dieser Effekt wird wiederum vom pflanzlichen Genotyp gesteuert (Spiering et al. 2005). Desweiteren wurde beobachtet, dass Endophyten in ausgewachsenen Blättern der Gräser ihr Wachstum einstellen (Schardl et al. 2004). Das Wachstum dieser Endophyten wird sowohl von biochemischen Veränderungen der Pflanzen wie Phytohormonen oder Stoffwechselmetaboliten, als auch von physiologischen Veränderungen wie Zellteilung oder Zellwachstum bestimmt (Tan et al. 2001).

Es ist durchaus möglich, dass auch bei den Convolvulaceen eine Stagnation des Pilzwachstums auf älteren Blättern erfolgt. Wie bereits unter 5.1.2 dargestellt, ist die Erreichbarkeit pflanzlicher Ressourcen für Epibionten vor Ausbildung einer fertigen Kutikula wesentlich einfacher. Sollten Iasa-F13 bzw. Tcor-F01, wie vermutet, die alleinigen Alkaloidproduzenten in *I. asarifolia* bzw. *T. corymbosa* sein, so sind sie bei guter Nährstoffversorgung sicher leistungsfähiger. Dies würde den hohen Ergolingegehalt in den jungen Blättern erklären. Gleichzeitig wäre es ein zusätzlicher Hinweis auf das Kosten-Nutzen-Prinzip von Symbiosen (vgl. 5.7.1).

Möglicherweise spielt der verstärkte Abbau der Alkaloide in zunehmendem Blattalter ebenfalls eine Rolle. Beobachtungen während der Fungizidversuche (vgl. 4.1 und 4.2) machen einen solchen „Turn-over“ sehr wahrscheinlich: Nach der Eliminierung von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 durch die Fungizide waren die Pflanzen innerhalb kurzer Zeit alkaloidfrei. Alkaloide die vor der Eliminierung der Pilze in den Pflanzen biosynthetisiert und gespeichert wurden, konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Eventuell werden die Ergoline, wie oben vermutet, hauptsächlich in den jungen Blättern produziert und zur gleichen Zeit bereits in den alten Blättern abgebaut. Wenn - wie im Falle der Fungizidversuche - keine weitere Biosynthese erfolgt, sind die Alkaloide auf diese Weise schnell aus den Pflanzen entfernt.

Auch Spiering et al. (2005) sehen im Abbau von Alkaloiden eine mögliche Erklärung für die veränderlichen Alkaloidkonzentrationen in unterschiedlichen Pflanzengeweben. Desweiteren schließen sie die Translokation der Alkaloide in den Pflanzen nicht aus. Die Translokation von Indolalkaloiden bei Convolvulaceen wird in der Literatur beschrieben (Mockaitis et al. 1973): In *Ipomoea violacea* sollen die Alkaloide in den Blättern der Pflanzen biosynthetisiert und anschließend in den Embryonen der Samen

akkumuliert werden. Dies wäre auch für *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* denkbar, zumal beide Pflanzen einen hohen Alkaloidgehalt in den Samen aufweisen (pers. Mitteilung M. Ahimsa-Müller). Eine Translokation der epibiontischen Pilze ist ebenfalls nicht auszuschließen, insbesondere da ihre Verbreitung in den Samen postuliert wird (vgl. 5.4.2). Allerdings konnte eine Translokation von Pilz und Alkaloiden im Rahmen der Pfropfversuche nicht nachgewiesen werden (vgl. 5.5). Möglicherweise erfolgt die Translokation nur während der Blütezeit. Da die Pflanzen während der hier angesprochenen Versuche (vgl. 4.7.4) nicht geblüht haben, sind die quantitativen Schwankungen von Pilz- und Alkaloidvorkommen vermutlich auf die Stagnation des Pilzwachstums bzw. den Alkaloidabbau in älteren Blättern zurückzuführen.

5.7.3 Pilz- und Alkaloidvorkommen in pflanzlichen Zellkulturen und regenerierten Pflanzen

Die Anlage pflanzlicher Zellkulturen sowie die Regeneration von Pflanzen aus Kallus (vgl. 4.7.2 und 4.7.3) dienen ebenfalls dazu, die Rolle von Pilz und Pflanze bei der Alkaloidbildung zu untersuchen. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Das Vorkommen von kontaminierenden Mikroorganismen konnte somit weitgehend ausgeschlossen werden.

Wie in den Kapiteln 4.7.2 und 4.7.3 dargestellt wird, waren in Kallus- und Suspensionskulturen von *I. asarifolia* zu keiner Zeit Alkaloide detektierbar. In regenerierten Pflanzen die aus Kalluskulturen gewachsen sind, wurde dagegen das gesamte Alkaloidspektrum wiedergefunden. Das Pilzmycel von Iasa-F13 konnte trotz steriler Anzuchtbedingungen sowohl in Zellkulturen als auch auf den Blättern der regenerierten Pflanzen nachgewiesen werden. Dieses Phänomen zeigt deutlich, dass die Alkaloidbiosynthese nicht immer mit dem Pilzvorkommen korreliert. Vielmehr scheinen - wie schon unter 5.7.1 und 5.7.2 beschrieben - bestimmte biochemische, physiologische und morphologische Eigenschaften der Pflanzen die Voraussetzung für eine funktionierende Pflanze-Pilz-Symbiose sowie die Alkaloidbildung zu sein.

Allerdings wurde in den pflanzlichen Zellkulturen zwar deutlich, aber nur wenig Pilzmycel gefunden (vgl. 4.7.2). Das Mycel stammt zwangsläufig von dem Pflanzenmaterial, aus dem die Zellkultur generiert wurde. In den Zellkulturen scheint der Pilz nur begrenzt zu wachsen. Die sonst für ihn typische Kolonienbildung (siehe Abb. 4.4) bleibt aus. Diese Beobachtung lässt sich mit der von Schardl et al. (2004) dargestellten Regulation des Pilzwachstums durch pflanzliches Wachstum und

pflanzliche Differenzierung (vgl. 5.7.2) erklären. Während Zellwachstum und -teilung in den Zellkulturen durch Zugabe von Auxinen (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 1-Naphtylessigsäure) (vgl. Tab. 2.9) bzw. einem Cytokinin (6-Benzylaminopurin) (vgl. Tab. 2.8) gewährleistet sind, fehlen weitere wichtige Funktionen. In Höheren Pflanzen dient die Produktion diverser Phytohormone wie Auxinen, Gibberellinen oder Cytokininen der Steuerung von Prozessen des Stoffwechsels und der Genexpression. Metabolismus, Wachstum und Entwicklung der verschiedenen Organe werden durch die Aussendung dieser Signalsubstanzen aufeinander abgestimmt (Heldt 1996). Offensichtlich bedürfen Pilzwachstum und Alkaloidproduktion solcher komplexer Vorgänge, welche erst mit der Ausbildung von Adventivknospen und der damit einhergehenden Zelldifferenzierung einsetzen. Dies erklärt das Vorkommen von Pilzmycel und Alkaloiden in Pflanzen, die aus den Zellen regeneriert wurden.

5.7.4 Hohe Transporteffizienz oder Induktion der Alkaloidbildung durch die epibiontischen Pilze ?

In 5.7.1, 5.7.2 und 5.7.3 wird von der Annahme ausgegangen, dass die epibiontischen Pilze die alleinigen Alkaloidproduzenten sind und die Pflanzen ihre Ressourcen unterstützend zur Verfügung stellen. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit stellte sich jedoch auch die Frage, ob die Pflanzen an der Alkaloidbiosynthese beteiligt sind. Die Möglichkeit des Horizontalen Gentransfers von den Pilzen auf die Pflanzen und umgekehrt wird in Kapitel 1.6 erläutert.

Untersuchungen zur Alkaloidspeicherung (vgl. 4.8.1) sollten zunächst klären, ob die Alkaloide vollständig in den Pflanzen oder eventuell teilweise in den Pilzen gespeichert werden. Dazu wurden die epibiontischen Pilze mittels Ultraschall von der Blattoberfläche der Pflanzen entfernt. Auf diese Weise konnten alkaloidhaltige, aber pilzfreie Blätter gewonnen und deren Alkaloidgehalt mit dem Alkaloidgehalt pilzführender Blätter verglichen werden. Auch der Alkaloidgehalt des abgelösten Pilzmycels wurde überprüft. Das Ergebnis war eindeutig: Alle in Kapitel 4.8.1 beschriebenen Versuche belegen die vollständige Speicherung der Alkaloide in den Pflanzen. Verluste von 4 - 5 % der Alkaloide nach der Ultraschallbehandlung wurden nicht im Pilzmycel wiedergefunden. Sie sind vermutlich auf Abrieb bzw. Verletzung der Blätter während der Behandlung zurückzuführen.

Sollten die Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01, wie bisher vermutet, die alleinigen Alkaloidproduzenten sein, so muss es ein sehr effizientes Transportsystem vom Pilz in

die Pflanze geben. Ein solcher Transport würde die mittels REM beobachtete enge Bindung der Pilze an die Pflanzen erklären (siehe Abb. 4.19). Andererseits können solche Beobachtungen genauso für eine Induktion der Alkaloidbildung durch Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 sprechen.

Geht man von der These aus, dass Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 pathogene Eigenschaften haben (vgl. 5.4.1), so wäre die Induktion der Alkaloidbildung in den Pflanzen durch die Pilze (induzierte Resistenz) nicht unwahrscheinlich. Die Abwehrbereitschaft von Pflanzen wird häufig durch den Befall mit verschiedenen Schadorganismen erhöht: Eine beträchtliche Anzahl von Genen in jedem Pflanzengenom codiert Leucin-reiche Resistenzproteine, die infektiöse Signale von Pathogenen erkennen (Dong 2001). Diese Interaktionen triggern physiologische Veränderungen wie programmierten Zelltod, Produktion von Sauerstoffradikalen, Akkumulation von Salicylsäure und Produktion von Phytoalexinen wie den Alkaloiden (Hammond-Kosack und Jones 1996). Die von Schardl et al. (2004) beschriebene Lebensweise mikrobieller Symbionten zwischen Mutualismus und Antagonismus (vgl. 5.4.1) machen solche Überlegungen durchaus wahrscheinlich. Es besteht die Möglichkeit, dass die Pilze auf diese Weise von den Pflanzen kontrolliert werden. Durch die Reduktion ihrer Angriffsbereitschaft verlieren die Pilze die Fähigkeit des schnellen Wachstums, der Bildung von Stromata, der sexuellen Reproduktion sowie der externen Verbreitung (White et al. 1991).

Gegen diese Theorie spricht die Tatsache, dass mittels molekularbiologischer Untersuchungen von *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* bisher kein Gen zur Ergolinalkaloid-Biosynthese in der Pflanzen-DNA gefunden wurde (pers. Mitteilung A. Markert). Wahrscheinlicher bleibt daher die Vermutung, dass die Alkaloidbildung durch die Pilze erfolgt (vgl. 5.2). Nicht-pathogene, epibiontische Mikroorganismen haben oft eine ausgeprägte antagonistische Wirkung auf pathogene Mikroorganismen und tragen somit zum Schutz der Pflanzen bei (Schreiber und Schönherr 1997). Häufig bilden epibiontische Mikroorganismen bei der kutikulären Stoffaufnahme in das Blatt ein der Blattoberfläche aufsitzendes Kompartiment. Dabei werden polare Substanzen vollständig in diesem epibiontischen Belag absorbiert, bevor sie über die Kutikula hinweg diffundieren und das Blattinnere erreichen können (Schreiber 1996). Möglicherweise nutzen Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 einen solchen Transportweg für die Speicherung der Ergolinalkaloide in *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa*.

Wie schon unter 5.3.2 vermutet, können auch die pflanzlichen Drüsenschuppen Ort des Stoffaustausches sein. Hier bietet sich die Theorie an, dass die Pilze das Isopren des Ätherischen Öls inkorporieren, für die Ergolinbiosynthese verwerten und anschließend die Ergoline in die Pflanzen transportieren.

5.7.5 Überlegungen zu den Einbaustudien mit Präkursoren der Alkaloidbiosynthese

In den unter 4.8.2 und 4.8.3 beschriebenen Inkubationsversuchen wurde versucht, die spezifische Rolle von Pilzen und Pflanzen bei der Verwertung bzw. Bereitstellung von Vorstufen der Ergolinalkaloid Biosynthese zu ergründen.

5.7.5.1 Versuche mit deuterierter Mevalonsäure (d₂-MVA) und deuterierter Deoxyxylulose (d₂-DOX)

Alle Terpenoide entstehen trotz ihrer großen Diversität mittels Kondensation von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) zu Geranylpyrophosphat. DMAPP bzw. sein Isomeres IPP sind auch die Vorläufer der Ergolinalkaloid Biosynthese (siehe Abb. 1.6). Sie können zum Einen vom cytosolischen Mevalonatweg (MVA-weg) und zum Anderen von dem erst vor einigen Jahren entdeckten plastidären Deoxyxyluloseweg (DOX-weg) abgeleitet werden (siehe Abb. 5.5). Pilze, Hefen, einige Bakterien und Tiere benutzen mangels Plastiden ausschließlich den MVA-weg, während der DOX-weg bei vielen Bakterien und Grünalgen Verwendung findet. Hingegen scheinen Höhere Pflanzen, Streptomyceten, einige Algen und Moose in der Lage zu sein, beide Biosynthesewege zu nutzen (Eisenreich et al. 2001).

Anfängliche Untersuchungen deuteten darauf hin, dass IPP bzw. DMAPP im Cytosol als Präkursor von Farnesylpyrophosphat fungiert und somit von Sesqui- und Triterpenen, während IPP bzw. DMAPP in den Plastiden Präkursor von Geranylpyrophosphat ist und damit von Mono- und Diterpenen sowie einigen Tetraterpenen (Dewick 2001). Mittlerweile ist für Höhere Pflanzen jedoch die Möglichkeit des „Crosstalks“ nachgewiesen, d.h. der alternativen Nutzung von MVA und DOX für alle Terpenoide (Dudareva et al. 2005).

Die unter 4.8.2 beschriebenen Einbaustudien mit d_2 -MVA und d_2 -DOX sollten die Entstehung von DMAPP in der Ergolinalkaloid Biosynthese aufklären. Dabei galt das Hauptinteresse der Frage, ob die Vorstufe pilzlicher oder pflanzlicher Herkunft ist.

Die Versuche erfolgten in Anlehnung an die 1963 von Gröger und Floss durchgeführten Biosynthesestudien: Durch Inkubation der Convolvulacee *Ipomoea rubro-caerulea* in ^3H -MVA wurden damals relativ hohe Einbauraten in den Alkaloiden der Stängel erzielt. Allerdings war zu der Zeit die Biosynthese über DOX unbekannt und wurde daher nicht getestet. Da Pflanzen sowohl MVA als auch DOX nutzen können, ermöglicht erst die Inkubation der Pflanzen in beiden Vorstufen die sinnvolle Auswertung eines eventuellen Einbaus. Auch das Vorkommen pilzlicher Symbionten wurde 1963 nicht untersucht.

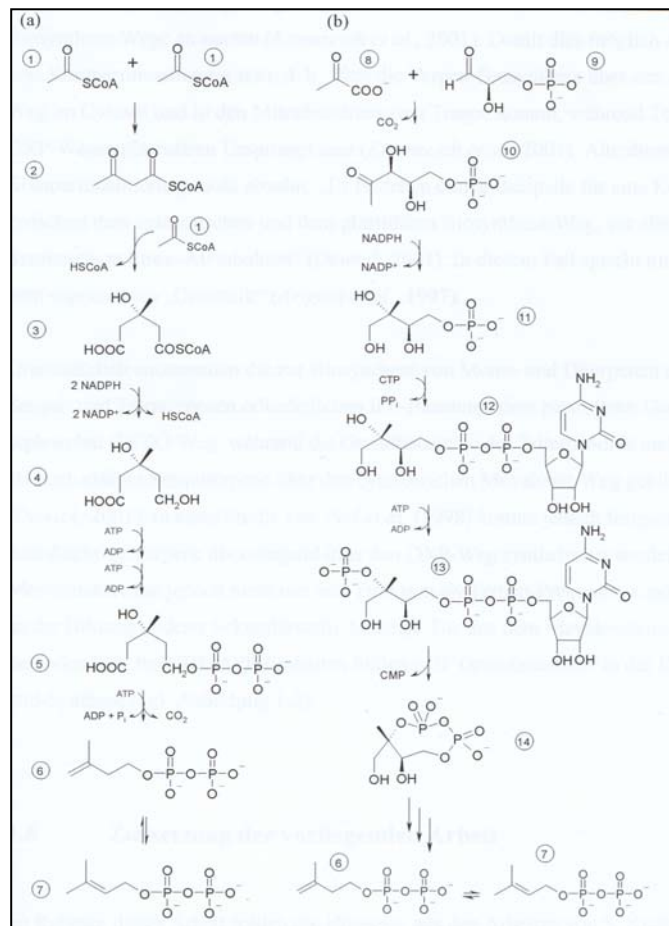


Abbildung 5.5 (a) Mevalonatweg und (b) Deoxyxyluloseweg der Isopentenylpyrophosphat- bzw. Dimethylallylpyrophosphat-Biosynthese; aus Eisenreich et al. 2001;

1: Acetyl-CoA, 2: Acetoacetyl-CoA, 3: 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA, 4: Mevalonsäure, 5: Mevalonsäurepyrophosphat, 6: Isopentenylpyrophosphat, 7: Dimethylallylpyrophosphat, 8: Pyruvat, 9: Glyzerinaldehyd-3-phosphat, 10: 1-Deoxy-D-xylulose, 11: 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, 12: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol, 13: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat, 14: 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem der Einbau von d₂-MVA und d₂-DOX in die terpenoiden Duftstoffe von *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* überprüft (siehe Abb. 4.46). Dabei zeigte der hohe Einbau beider Substanzen in Mono- und Sesquiterpene einerseits die Möglichkeit des pflanzlichen „Crosstalks“, andererseits belegte er die erfolgreiche Aufnahme der deuterierten Substanzen durch die Convolvulaceen. Dagegen war in den Ergolinalkaloiden kein Einbau nachweisbar.

Es ist daher nicht auszuschließen, dass die epibiontischen Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 den Prenylrest für die Alkaloidbildung zur Verfügung stellen, nicht aber die Pflanzen. Eventuell hatten die Pilze keinen Zugriff auf die über die pflanzlichen Sprosse angebotenen deuterierten Substanzen.

Allerdings erscheint die unter 5.3.2 vermutete Nutzung des pflanzlichen Isoprens durch die Pilze und ihre damit verbundene Lebensweise in Nähe der Drüsenschuppen plausibler. Eisenreich et al. (2001) postulieren das Vorkommen parasitischer Mikroorganismen, die keine isoprenoiden Präkursoren bilden können und diese von ihrem Wirt beziehen. Möglicherweise beruht die Symbiose von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 mit den Convolvulaceen auf einer solchen Nutzung und ist der Grund für den vermuteten früheren Parasitismus der Pilze (vgl. 5.4.1). Da die Pflanzen den Vorteil der Alkaloidbiosynthese nutzen konnten, wurde aus der parasitischen eine mutualistische Beziehung. Hier würde sich die unter 5.7.1 beschriebene Verschiebung des Kosten-Nutzen-Verhältnisses in Symbiosen widerspiegeln. Zusätzlich erklärt sich so der Sinn der Symbiose: Die Pilze haben die Möglichkeit der Alkaloidbildung (vgl. 5.2), während die Pflanzen terpenoide Vorstufen bereitstellen, die den Pilzen als Nahrungsgrundlage dienen und gleichzeitig zur Alkaloidproduktion genutzt werden.

Sollten die Pflanzen in den hier dargestellten Versuchen den Prenylrest tatsächlich zur Verfügung stellen, so nutzen sie die deuterierten Substanzen offenbar für die Biosynthese der Duftstoffe. Möglicherweise erfolgt deren Biosynthese schneller als die der Alkaloide, so dass die Pilze ausschließlich unmarkiertes pflanzliches Isopren für die Alkaloidbiosynthese verwerten können.

Um hier Aufklärung zu bekommen wäre es notwendig, in Zukunft neue Versuchsansätze auszuprobieren. Besonders sinnvoll erscheint das Bestreichen bzw. Besprühen der Blätter mit den Lösungen der deuterierten Substanzen. Auf diese Weise werden die epibiontischen Pilze unmittelbar erreicht. Zur Überprüfung der in Kapitel 5.7.2 geäußerten Vermutung, dass die Biosynthese hauptsächlich in den Blattknospen stattfindet, sollte der Versuch vor allem mit Blattknospen durchgeführt werden. Dazu müssten diese leicht geöffnet und im Inneren bestrichen bzw. besprüht werden. Die Blätter sollten während der Inkubation an den intakten Pflanzen bleiben und erst bei

Versuchsende geerntet werden. Falls d_2 -MVA-markierte Alkaloide nachweisbar sind, könnte eine Überprüfung des Einbaus in die pflanzlichen Duftstoffe aufschlussreich sein. Sind die Duftstoffe unmarkiert, so ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Pilze den Prenylrest zur Verfügung stellen. Im Falle eines d_2 -DOX-Einbaus in die Alkaloide käme der Prenylrest zweifellos von den Pflanzen. Sollten die Pilze, wie vermutet, die Alkaloidproduzenten sein so ist es keinesfalls ausgeschlossen, dass sie je nach Verfügbarkeit sowohl Isopren aus pilzlicher bzw. pflanzlicher MVA, als auch Isopren aus pflanzlicher DOX für die Biosynthese nutzen.

Der hohe ^3H -MVA-Einbau in die Alkaloide von *Ipomoea rubro-caerulea* (Gröger und Floss 1963) könnte darauf hinweisen, dass hier endophytische Pilze für die Alkaloidbiosynthese verantwortlich sind. Endophyten haben, wie in Kapitel 5.1.2 erläutert, eine andere enzymatische Ausstattung als Epibionten und daher eventuell bessere Möglichkeiten, die von den Pflanzen aufgenommenen radioaktiven Substanzen zu erreichen.

5.7.5.2 Versuche mit ^{14}C -Tryptophan

Die Ergolinalkaloid-Biosynthese beginnt mit der Prenylierung von Tryptophan durch Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (siehe Abb. 1.6). Die Existenz des - für diesen Schritt notwendigen - Biosynthesegens *dmaW/cpd1* in Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 ist hinreichend belegt (Steiner et al. 2006, pers. Mitteilung A. Markert).

In den unter 4.8.3 beschriebenen Inkubationsexperimenten sollte der Nachweis erbracht werden, dass dieser Biosyntheseschritt in den Pilzen erfolgt. Gleichzeitig wurde die mögliche Biosynthese durch die Convolvulaceen überprüft. Dazu wurden pilzfreie Pflanzen sowohl mit Alkaloiden (vgl. 4.8.3) als auch ohne Alkaloide sowie pilzführende alkaloidhaltige Pflanzen in ^{14}C -Tryptophan inkubiert. Zudem wurde isoliertes Pilzmycel mit der ^{14}C -Tryptophanlösung getränkt.

In keinem der untersuchten Extrakte war ein Einbau in die Alkaloide nachweisbar. Allerdings wurde in allen Pflanzenextrakten ein sehr geringer Einbau in unbekannte Verbindungen detektiert (vgl. Tab. 4.14). Obwohl es sich dabei nur um Spuren handelte, ist dies ein Zeichen für die Aufnahme der radioaktiven Substanz durch die Pflanzen. Im Pilzextrakt wurde kein Einbau in bestehende Verbindungen festgestellt. Diese Befunde sind mit den unter 4.8.2 gewonnenen Ergebnissen vergleichbar: In allen Fällen sind die Pflanzen in der Lage, die zugegebenen markierten Substanzen zu

verarbeiten. Ein Einbau in die Ergoline erfolgt jedoch in keinem Fall. Wie schon unter 5.7.5.1 vermutet, scheinen die markierten Vorstufen die epibiontischen Pilze und damit den postulierten Ort der Alkaloidbiosynthese nicht zu erreichen.

Die in Kapitel 5.7.5.1 beschriebenen Biosynthesestudien von Gröger und Floss (1963) können auch hier als Vergleich herangezogen werden. Die Versuche wurden sowohl mit ^3H -MVA als auch mit ^3H -Tryptophan durchgeführt. Die Einbauraten in die Alkaloide der Stängel waren im Falle von Tryptophan ebenfalls relativ hoch. Diese Parallelität ist sicher kein Zufall und spricht für die oben aufgestellte Theorie, dass bei *Ipomoea rubro-caerulea* endophytische Pilze die Alkaloidbildner sind. Natürlich kann eine Alkaloidproduktion durch die Pflanzen nach wie vor nicht ausgeschlossen werden.

Aufgabe zukünftiger Versuche sollte die Modifikation des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experiments zugunsten der Einbauraten sein. Erst dann kann eine sichere Aussage über den Einbau von ^{14}C -Tryptophan in die Alkaloide getroffen werden. Sinnvoll wäre die Lösung von ^{14}C -Tryptophan in einem geringeren Wasservolumen bei gleichzeitiger Verlängerung der Inkubationszeit. Damit erreicht man eine schnellere Aufnahme der radioaktiven Substanz und einen längeren Stoffwechselumsatz. Möglicherweise konnte die radioaktive Substanz von den Pflanzen nicht ausreichend verstoffwechselt werden. Ein deutlicher Hinweis auf die Ergolinbiosynthese durch die Pilze wäre ein höherer Einbau in die unbekannt pflanzlichen Verbindungen bei nach wie vor unmarkierten Ergolinen. Hingegen wäre ein deutlicher Hinweis auf die Biosynthese durch die Pflanzen der Nachweis markierter Ergoline in pilzfreien Pflanzen. Um die Biosynthese durch die Pilze noch besser beurteilen zu können, sollte auch hier das Bestreichen der Blätter mit ^{14}C -Tryptophan überlegt werden (vgl. 5.7.5.1).

5.8 Überlegungen zum Vorkommen von Ergolinalkaloiden in weiteren Convolvulaceen

Das Vorkommen von Ergolinalkaloiden in Convolvulaceen wird in der Literatur für zahlreiche Arten der Gattungen *Argyreia*, *Convolvulus*, *Ipomoea* und *Turbina* beschrieben. Allerdings beschränken sich die Beschreibungen meist auf die Samen der Pflanzen, da diese für rituelle und medizinische Zwecke Verwendung fanden und finden (vgl. 1.4.2). Die vegetativen Pflanzenteile einiger Arten wurden von J. Groß im Rahmen ihrer Dissertation (2004) untersucht. Die Quelle der Ergoline - Pilze oder

Pflanzen - ist bisher jedoch ungeklärt. Von besonderem Interesse werden daher in Zukunft Studien zur Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Vorkommen epibiontischer oder endopytischer Pilzsymbionten sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bereits Blätter der Convolvulaceen *Argyreia nervosa*, *Ipomoea hulubij*, *Ipomoea nil* und *Ipomoea purpurea* mikroskopiert (vgl. 4.2.4.1). Dabei wurde nach epibiontischem Pilzmycel gesucht, welches mit dem von Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 vergleichbar ist. Die Untersuchung sollte das spezifische Vorkommen der Pilze Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 auf den Blättern von *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* belegen und die in Kucht et al. (2004) und Steiner et al. (2006) postulierte Korrelation von Pilz- und Alkaloidvorkommen bestätigen.

Auf keinem Blatt der untersuchten Convolvulaceen-Arten konnte Mycel nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war erwartungsgemäß, da das Vorkommen von Alkaloiden im Kraut dieser Pflanzen nirgendwo beschrieben wird. Auch das von J. Groß (2004) untersuchte Kraut der Arten *Argyreia nervosa* und *Ipomoea purpurea* enthielt keine Alkaloide.

Allerdings wird das Vorkommen von Ergolinen in den Samen von *Argyreia nervosa* (Rätsch 2004) und *Ipomoea purpurea* (Wilkinson 1986) in der Literatur beschrieben. Hier steht eine Untersuchung des Pilzvorkommens noch aus. Die Überprüfung des Alkaloidgehalts der Samen ist insbesondere im Falle von *I. purpurea* ebenfalls erforderlich. *I. purpurea* wird in der Literatur häufig mit *I. violacea* verwechselt. In den meisten Studien (Ausnahme: Wilkinson 1986) wurden keine Alkaloide in den Samen der Pflanze nachgewiesen (Rätsch 2004).

Aktuelle Untersuchungen zur Korrelation von Pilz- und Alkaloidvorkommen bei Convolvulaceen wurden von M. Ahimsa-Müller im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt (Ahimsa-Müller et al. unveröffentlicht). Untersuchungsgegenstand waren das Kraut der rotblühenden *Ipomoea asarifolia* Roem et Schult. sowie Kraut und Samen von *Ipomoea violacea* L..

Auch diese Untersuchungen belegen die 100 %ige Korrelation: Das Kraut der rotblühenden *I. asarifolia* enthielt das aus der weißblühenden Pflanze bekannte Alkaloidspektrum (vgl. 4.2.3.1)). Gleichzeitig fand man auf den Blättern einen Pilz mit dem mikroskopischen Erscheinungsbild von Iasa-F13 (siehe Abb. 4.4), der mittels ITS und 18S-rDNA ebenfalls als Clavicipitaceenpilz identifiziert wurde. Im untersuchten Kraut von *I. violacea* waren keine Alkaloide und kein Pilzmycel nachweisbar, während

in den Samen der gleichen Pflanze Alkaloide und Pilz gefunden wurden. Auch dieser Pilz wurde mittels ITS und 18S-rDNA als Clavicipitaceenpilz identifiziert.

Der Alkaloidgehalt in den vegetativen Pflanzenteilen von *I. violacea* (syn. *I. tricolor*, syn. *I. rubro-caerulea*) kann je nach Herkunft der Samen stark variieren. Während die von M. Ahimsa-Müller untersuchte Zuchtsorte im Kraut keine Alkaloide enthielt, wurden in anderen Züchtungen Alkaloide in allen Pflanzenteilen nachgewiesen (vgl. Dissertation J. Groß 2004).

Mockaitis et al. (1973) postulieren die Biosynthese von Indolalkaloiden in den Blättern von *I. violacea* und ihre Akkumulation in den Samen der Pflanzen (vgl. 5.2). Auch in den unter 5.7.5.1 und 5.7.5.2 beschriebenen Versuchen von Gröger und Floss (1963) wurden Alkaloide in den Stängeln, Blättern und Samen von *I. rubro-caerulea* gefunden. Diesem Phänomen sollte im Zusammenhang mit dem Pilzvorkommen in Zukunft nachgegangen werden. Dabei sollte insbesondere beachtet werden, dass auch endophytische Pilze als Ergolinproduzenten in Frage kommen (vgl. 5.7.5.1 und 5.7.5.2).

Abschließend ist zu bemerken, dass die Ergolinalkaloid-Biosynthese durch die Pflanzen nach wie vor nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Die in Kapitel 1.6 dargestellte Möglichkeit des Horizontalen Gentransfers bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings hat bereits J. Groß in ihrer Dissertation (2004) mit Hilfe von Hybridisierungsexperimenten festgestellt, dass „Gene aus Pflanzen, die für Enzyme der Alkaloidbiosynthese kodieren, wenn sie denn vorhanden wären, offensichtlich wenig Homologie zu denen von Pilzen hätten. Genomische DNA aus Pflanzen (*Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa*) hybridisiert nicht mit einer für die Ergolinbiosynthese in *Claviceps* spezifischen Gensonde (cpd1, kodiert für Dimethylallyltryptophan-Synthase) aus *Claviceps purpurea*“ (Zitat J. Groß). Da im Falle eines Horizontalen Gentransfers grundsätzlich eine hohe Homologie der übertragenen Gene erwartet wird, scheint dieser Befund gegen diese Hypothese zu sprechen.

Eine weitere Möglichkeit ist die konvergente (parallele) Evolution des Biosyntheseweges in Pilzen und Höheren Pflanzen (Der Marderosian 1966). Die wiederholte „Erfindung“ eines solch komplizierten Biosyntheseweges durch die Natur ist jedoch laut Mothes (1981) unwahrscheinlich.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das Vorkommen von Ergolinalkaloiden in Convolvulaceen und deren Biosynthese beschäftigt die Wissenschaft seit Jahrzehnten (Hofmann 1960, Gröger und Floss 1963). Es stellte sich immer wieder die Frage, ob symbiotische Mikroorganismen oder die Pflanzen selber die Alkaloide biosynthetisieren (Taber und Heacock 1962, J. Groß Dissertation 2004). Als Vorbild diente die langjährige Forschung über Symbiosen von Poaceen und Ergolinalkaloid-bildenden Pilzen (vgl. 1.4.1, 5.1).

Die Entdeckung epibiontischer Pilze auf den Blattoberflächen der Convolvulaceen *Ipomoea asarifolia* und *Turbina corymbosa* (Kucht et al. 2004, Steiner et al. 2006) gab der Ergolinalkaloidforschung einen wichtigen Impuls. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die ökologischen und biochemischen Interaktionen dieser Pflanze-Pilz-Symbiosen aufzuklären.

Mittels Fungizidversuchsreihen (vgl. 4.1, 4.2) konnte nachgewiesen werden, dass das Vorkommen der Ergolinalkaloide in den Pflanzen unmittelbar mit dem Vorkommen der Pilze korreliert. Die daraus abgeleitete Vermutung, die Pilze könnten die Alkaloidproduzenten sein, wurde durch molekularbiologische Untersuchungen gestützt (vgl. 4.5): Einerseits wurden die Pilze als Clavicipitaceen-Pilze identifiziert und andererseits wurde das einleitende Gen der Ergolinbiosynthese (*dmaW/cpd1*) aus den Pilzen isoliert und sequenziert (Steiner et al. 2006, pers. Mitteilung A. Markert). Zudem konnte mittels Single strand conformation polymorphism (SSCP) nachgewiesen werden, dass in pilzlicher DNA aus Blättern steril angezogener, alkaloidführender *Ipomoea asarifolia*-Pflanzen ausschließlich der Clavicipitaceen-Pilz vorkommt (vgl. 5.6). Die epibiontischen Pilze erhielten die Laborbezeichnungen Iasa-F13 (*Ipomoea asarifolia*) und Tcor-F01 (*Turbina corymbosa*).

Weitere Untersuchungen haben eine ausgesprochene Wirtsspezifität der beiden Pilze gezeigt. Sie lassen sich weder *in vitro* vermehren (vgl. 4.4) noch mittels experimenteller Infektion auf den Pflanzen verbreiten (vgl. 4.3.2.1, 4.6). Ihre Vermehrung scheint ausschließlich asexuell in den Samen der Pflanzen zu erfolgen (vgl. 5.4.2). Diese als vertikale Transmission bekannte Vermehrungsform ist bei Gras-Endophyten aus der Familie der Clavicipitaceen weit verbreitet (Schardl et al. 2004). Vertikal übertragene Pilze bilden keine infektiösen Vermehrungsstrukturen im oder auf dem Blattgewebe und gelten daher als Mutualisten.

Auch von den beiden Epibionten Iasa-F13 und Tcor-F01 wurden keine Vermehrungsstrukturen (vgl. 4.3.2.2) gefunden. Da sie den Pflanzen keinen Schaden zufügen, werden sie als Mutualisten angesehen. Allerdings deuten Appressorien-ähnliche Strukturen möglicherweise auf früheren Parasitismus hin (vgl. 5.4.1).

Es ist daher zu vermuten, dass es sich um eine sehr sensible Symbiose handelt, die auf einem ausgewogenen Kosten-Nutzen-Verhältnis beruht. Dies setzt die Kapazität beider Partner voraus, Leistungen zu erbringen die dem Anderen nützen. Eine solche Form der gegenseitigen Kontrolle ist von Gras-Endophyt-Symbiosen hinreichend bekannt (Saikkonen et al. 1999, Cheplick et al. 2000, Ahlholm et al. 2002).

Die Lebensweise der Epibionten Iasa-F13 und Tcor-F01 in der Nähe der Drüsenschuppen von *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* scheint die ideale Voraussetzung für ein solches Verhältnis zu sein (vgl. 5.3.2). Sofern die Pilze über die notwendige enzymatische Ausstattung verfügen (vgl. 5.1.2) haben sie hier die Möglichkeit, pflanzliche Isoprenoide zu katabolisieren und sowohl zur eigenen Ernährung als auch zur Alkaloidbiosynthese zu nutzen (vgl. 5.7.5.1). Die Alkaloide schützen die Pflanzen vor Krankheit und Herbivorie und führen offensichtlich zur Duldung der Pilze durch die Pflanzen. Diese stellen im Gegenzug ihre Ressourcen als Nahrungsgrundlage zur Verfügung. Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Verfügbarkeit pflanzlicher Ressourcen bei Alkaloidbildung und Pilzwachstum eine wichtige Rolle spielt (vgl. 5.7.1, 5.7.2). Die Nutzung isoprenoider Vorstufen durch die Pilze sowie deren Herkunft (Pilz oder Pflanze) wurden ebenfalls untersucht, konnten jedoch bisher nicht nachgewiesen werden (vgl. 5.7.5.1).

Die obigen Beobachtungen und Schlussfolgerungen weisen darauf hin, dass nur die Ausgewogenheit von Kosten und Nutzen zu der mutualistischen Symbiose von *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* mit Iasa-F13 bzw. Tcor-F01 geführt hat. Die Möglichkeit der Alkaloidbiosynthese eröffnet den Pilzen Iasa-F13 und Tcor-F01 offensichtlich eine einzigartige ökologische Nische. Dieses Phänomen ist von vertikal übertragenen Gras-Endophyten ebenfalls bekannt (Clay und Schardl 2002) und scheint den Verlust der sexuellen Vermehrung mit sich zu bringen (vgl. 5.1.1).

In diesem Kontext kann die Alkaloidbiosynthese durch die Convolvulaceen weitgehend ausgeschlossen werden. Auch wurden bisher keine Biosynthesegene in den Pflanzen gefunden. Zudem hat bereits J. Groß in ihrer Dissertation (2004) aufgrund von Hybridisierungsexperimenten festgestellt, dass ein Horizontaler Gentransfer (vgl. 1.6)

hier unwahrscheinlich ist. Die Experimente zeigten eine sehr geringe Homologie pilzlicher und pflanzlicher Gene, die für mögliche Enzyme der Alkaloidbiosynthese kodieren (vgl. 5.8). Die konvergente (parallele) Evolution eines so komplizierten Biosyntheseweges in Pilzen und Höheren Pflanzen gilt laut Mothes (1981) als unwahrscheinlich.

Abschließend ist hervorzuheben, dass die Beteiligung anderer Pilze an der Ergolinalkaloid Biosynthese ebenfalls weitgehend auszuschließen ist. Im Rahmen von Inokulationsversuchen konnte sich kein weiterer Pilz etablieren, außer dem ubiquitären Pilz *Penicillium roquefortii* (vgl. 5.6). Dieser als Indolalkaloidbildner bekannte Pilz war auf den Convolvulaceen nicht in der Lage Ergoline zu produzieren.

Die Einzigartigkeit einer gut funktionierenden Symbiose wird in der Literatur angesprochen: Gentile et al. (2005) schreiben, dass jede stabile mutualistische Gras-Endophyt-Symbiose offensichtlich eine Co-Adaptation von Wirt und Endophyt benötigt. Das heißt, Wirt und Pilzsymbiont passen sich gemeinsam an ihre Umwelt an und erhöhen so ihre Überlebenschance aber auch ihre gegenseitige Abhängigkeit.

In Zukunft wird es notwendig sein, weitere Ergolinalkaloid-führende Convolvulaceen hinsichtlich ihrer Pilzsymbionten und deren Korrelation mit dem Alkaloidgehalt zu untersuchen (vgl. 5.8). Dabei sollte insbesondere beachtet werden, dass auch endophytische Pilze als Ergolinproduzenten in Frage kommen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ahlholm, J.U., Helander, M., Lehtimäki, S., Wäli, P., Saikkonen, K. (2002): Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *OIKOS* 99: 173-183.

Allen, E.A., Hoch, H.C., Steadman, J.R., Stavelly, J. (1991): Influence of leaf surface features on spore deposition and the epiphytic growth of phytopathogenic fungi. In Andrews JH and Hirano SS (eds.) *Microbiol. ecology of leaves*. Springer Verlag Chapter 5.

Amor-Prats, D., Harborne, J.B. (1993): New sources of ergoline alkaloids within the genus *Ipomoea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21 (4): 455-462.

Andrews, J.H., Hirano, S.S. (1991): *Microbial ecology of leaves*. Springer Verlag: Chapter 10, 17, 18, 21.

Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kyllö, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A. (2003): Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS* 100 (26): 15649-15654.

Austin, D.F., Huáman, Z. (1996): A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. *Taxon* 45: 3-38.

Bacon, C.W. (1990): Isolation, culture, and maintenance of endophytic fungi of grasses. In *Isolation of biotechnological organisms from nature*, Labeda D.P. (ed.), McGraw-Hill Publishing Company, 1990: Chapter 10.

Bacon, C.W., Lyons, P.C., Porter, J.K., Robbins, J.D. (1986): Ergot toxicity from endophyte-infected grasses: a review. *Agronomy Journal* 78: 106-116.

Bacon, C.W., Siegel, M.R. (1988): Endophyte parasitism of tall fescue. *J. Prod. Agric.* 1 (1): 45-55.

Bacon, C.W., White (Jr.), J.F. (2000): Microbial endophytes. Marcel Dekker Inc. New York: Chapter 1, 3, 4, 5, 14.

Ball, O.J.-P., Prestidge, R.A., Sprosen, J.M. (1995): Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine and lolitrem B in perennial ryegrass. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1527-1533.

Barger, G. (1931): Ergot and Ergotism. Gurney and Jackson, London.

Berde, B., Stürmer, E. (1978): Introduction to the pharmacology of ergot alkaloids and related compounds. In Ergot alkaloid and related compounds, Berde, B., Schild, H.O. (eds.), Springer Verlag: 1-28.

Blankenship, J.D., Spiering, M.J., Wilkinson, H.H., Fannin, F.F., Bush, L.B., Schardl, C.L. (2001): Production of loline alkaloids by the grass endophyte, *Neotyphodium uncinatum*, in defined media. Phytochemistry 58: 395-401.

Boysen, M.E. (1999): Molecular identification and quantification of the *Penicillium roqueforti* group. Ph.D. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. ISSN 1401-6249.

Broun, P., Somerville, C., (2001): Progress in plant metabolic engineering. PNAS 98 (16): 8925-8927.

Buchenauer, H. (1987): Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds. In Modern selective fungicides, Lyr, H. (ed.), Gustav Fischer Verlag, 1987: Chapter 14.

Bush, L.P., Wilkinson, H.H., Schardl, C.L. (1997): Bioprotective alkaloids in grass-fungal endophyte symbioses. Plant Physiologie 114: 1-7.

Bushmann, F. (2002): Lateral DNA transfer. Mechanisms and consequences. Cold Spring harbour Laboratory Press, Cold Spring harbour, NY.

Buttler, C. (2004): Mutterkorn – ein Gift wird zur Arznei. PTA heute 10: 86-88.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. (2001): The fungi. 2nd edn., Academic, San Diego.

Chang, C.-K., Carew, D.P. (1968): Clavine alkaloid production with rye callus tissue. *Lloydia* 31 (1): 38-42.

Chao, J.-M., Der Marderosian, A.H. (1973): Identification of ergoline alkaloids in the genus *Argyreia* and related genera and their chemotaxonomic implications in the Convolvulaceae. *Phytochemistry* 12: 2435-2440.

Cheplick, G.P., Clay, K. Marks, S. (1989): Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grass *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *New Phytol.* 111: 89-97.

Cheplick, G.P., Perera, A., Koulouris, K. (2000): Effect of drought on the growth of *Lolium perenne* genotypes with and without fungal endophytes. *Functional Ecology* 14: 657-667.

Christensen, M.J., Leuchtman, A., Rowan, D.D., Tapper, B.A. (1993): Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycol. Res.* 97: 1083-1092.

Chung, K.R., Schardl, C.L. (1997): Sexual cycle and horizontal transmission of the grass symbiont, *Epichloe typhina*. *Mycological Research* 101: 295-301.

Clay, K. (2004): Fungi and the food of the gods. *Nature* 427(29): 401-402.

Clay, K., Frentz, I.C. (1993): *Balansia pilulaeformis*, an epiphytic species. *Mycologia* 85 (4): 527-534.

Clay, K., Schardl, C.L. (2002): Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160: 99-127.

Craven, K.D., Blankenship, J.D., Leuchtman, A., Hignight K., Schardl, C.L. (2001a): Hybrid fungal endophytes symbiotic with the grass *Lolium pratense*. *Sydowia* 53: 44-73.

Davidse, L.C. (1987): Biochemical aspects of benzimidazole fungicides – action and resistance. In Modern selective fungicides, Lyr, H. (ed.), Gustav Fischer Verlag, 1987: Chapter 16.

Davis, N.D., Clark, E.M., Schrey, K.A., Diener, U.I. (1986): In vitro growth of *Acremonium coenophialum*, an endophyte of toxic tall fescue grass. Appl. Environ. Microbiol. 52 (4): 888-891.

De Battista, J.P., Bouton, C.W., Bacon, C.W., Siegel, M.R. (1990): Rhizome and herbage production of endophyte-removed tall fescue clones and populations. Agronomy Journal 82 (4): 651-654.

Delp, C.J. (1987): Benzimidazole and related fungicides. In Modern selective fungicides, Lyr, H. (ed.), Gustav Fischer Verlag, 1987: Chapter 15.

Der Marderosian, A., Youngken, J.R., Heber, W. (1966): The distribution of indole alkaloids among certain species and varieties of *Ipomoea*, *Rivea* and *Convolvulus* (Convolvulaceae). Lloydia 29 (1): 35-41.

Der Marderosian, A.H. (1965): Nomenclatural history of the Morning Glory, *Ipomoea violacea*. Taxon 14: 234-240.

Dewick, P.M. (2001): The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. Natural product report: 181-222.

Dobberstein, R.H., Staba, E.J. (1969): *Ipomoea*, *Rivea* and *Argyreia* tissue cultures: influence of various chemical factors on indole alkaloid production and growth. Lloydia 32 (2): 141-147.

Dong, X. (2001): Genetic dissection of systemic acquired resistance. Current Opinion in Plant Biology 4: 309-314.

Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., Gershenzon, J., Boland, W. (2005): The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. PNAS 102 (3): 933-938.

Easton, H.S., Lath, G.C.M., Tapper, B.A., Ball, O.J.-P. (2002): Ryegrass host genetic control of concentrations of endophyte-derived alkaloids. *Crop Science* 42: 51-57.

Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A. (2001): Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* 6 (2): 78-84.

Erge, D., Maier, W., Gröger, D. (1973): Untersuchungen über die enzymatische Umwandlung von Chanoclavin-I. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 164: 234-247.

Faeth, S.H. (2002): Are endophytic fungi defensive plant mutualists ? *OIKOS* 98: 25-36.

Flieger, M., Wurst, M., Shelby, R. (1997): Ergot alkaloids – sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiol.* 42: 3-30.

Floss, H.G. (1976): Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. *Tetrahedron* 32: 873-912.

Floss, H.G., Anderson, J.A. (1980): Biosynthesis of ergot toxins. In *The biosynthesis of mycotoxins - a study in secondary metabolism*, Steyn P.S. (ed.), Academic New York: 17-67.

Frohne, D., Jensen, U. (1992): *Systematik des Pflanzenreichs* 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag: 37-43.

Furmanowa, M., Gajdzis-Kuls, D., Ruszkowska, J., Czarnocki, Z., Obidoska, G., Sadowska, A., Rani, R., Upadhyay, S.N. (2001): In vitro propagation of *Withania somnifera* and isolation of withanolides with immunosuppressive activity. *Planta Medica* 67: 146-149.

Genest, K. (1966): Changes in ergoline alkaloids in seeds during ontogeny of *Ipomoea violacea*. *J. Pharm. Sci.* 55: 1284.

Gentile, A., Rossi, M.S., Cabral, D., Craven, K.D., Schardl, C.L. (2005): Origin, divergence, and phylogeny of *Epichloë* endophytes of native Argentine grasses, *Mol. Phylogenet. Evol.* 35: 196-208.

Gersbach, P.V., Wyllie, S.G., Sarafis, V. (2001): A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Annals of Botany* 88 (4): 521-525.

Glenn, A.E., Bacon, C.W. (1997): Distribution of ergot alkaloids within the family Clavicipitaceae. In *Neotyphodium / grass interactions*, Bacon, C.W., Hill, N.S. (eds.), Plenum Press New York: 53-56.

Gröger, D., Floss, H.G. (1998): Biochemistry of ergot alkaloids – achievements and challenges. In *The Alkaloids: chemistry and biology* 50, Cordell, G.A. (ed.), Academic London: 171-218.

Gröger, D., Mothes, K., Floss, H.-G., Weygand, F. (1963): Zur Biogenese von Ergolin-Derivaten in *Ipomoea rubro-caerulea* Hook. *Zeitschrift für Naturforschung* 18 (12): 1123-1124.

Gröger, D., Sajdl, P. (1972): Enzymatic conversion of chanoclavine-I. *Pharmazie* 27: 188.

Groß, J. (2004): Untersuchungen zum Vorkommen von Ergolinen in Höheren Pflanzen der Familie der Convolvulaceae und in endophytischen Pilzen. Dissertation, Institut für Pharmazeutische Biologie, Bonn.

Haarmann, T., Machado, C., Lübbe, Y., Correia, T., Schardl, C.L., Panaccione, D.G., Tudzynski, P. (2005): The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: Extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry* 66: 1312-1320.

Hammond-Kosack, K., Jones, J.D.G. (1996): Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.

Heinstein, P.F., Lee, S.L., Floss, H.G. (1971): Isolation of dimethylallylpyrophosphate: tryptophan dimethylallyltransferase from the ergot fungus (*Claviceps spec.*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 1244-1251.

Heldt, H.W. (1996): *Pflanzenbiochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH: 403-420.

Henningsen, M. (2003): Moderne Fungizide: Pilzbekämpfung in der Landwirtschaft. *Chemie in unserer Zeit* 37 (2): 98-111.

Hirsch, A.M. (2004): Plant-microbe symbioses: a continuum from commensalisms to parasitism. *Symbioses* 37: 345-363.

Hochmuth, D.H., Joulain, D., König, W.A. (2002): MassFinder Software and Data Bank, University of Hamburg. <http://www.chemie.uni-hamburg.de/oc/koenig/massfinder.html>

Hofmann, A. (1961): Die Wirkstoffe der mexikanischen Zauberdroge 'Ololiuqui'. *Planta Medica* 9: 354-367.

Hofmann, A. (1964): Die Mutterkornalkaloide. Enke Stuttgart: 11-121.

Hofmann, A. (1978): Historical view on ergot alkaloids. *Pharmacology* 16: 1-11.

Hofmann, A. (2000): Die Mutterkornalkaloide. Vom Mutterkorn zum LSD; Die Chemie der Mutterkornalkaloide. Nachschatten o.O (Nachdr. v. 1964).

Hofmann, A. (2001): LSD mein Sorgenkind. Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co. KG, München.

Hofmann, A., Tschertter, H. (1960): Isolierung von Lysergsäure-Alkaloiden aus der mexikanischen Zauberdroge 'Ololiuqui' (*Rivea corymbosa* (L.) Hall. f.), *Experientia* 16: 414.

Hood, M.-E., Shew, H.-D. (1996): Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology* 86: 704-708.

Jenett-Siems, K., Kaloga, M., Eich, E. (1994): Ergobalansine / Ergobalansinine, a proline-free peptide-type alkaloid of the fungal genus *Balansia*, is a constituent of *Ipomoea piurensis*. *Journal of Natural Products* 57 (9): 1304-1306.

Jenett-Siems, K., Kaloga, M., Eich, E. (2004): Additions and corrections. *J. Nat. Prod.* 67: 2160.

- Jux, A., Gleixner, G., Boland, W. (2001): Zuordnung von Terpenen zur Methylerythritolphosphat- oder zur Mevalonat-Route anhand der natürlichen $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse: dynamische Ressourcennutzung in induzierten Pflanzen. *Angew. Chem.* 113 (11): 2134-2137.
- Karnovsky, M.J. (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 137-138.
- Kauf, N. (2004): Molekular- und mikrobiologische Untersuchungen zum Nachweis der Ergolin-Alkaloid-Biosynthese in assoziierten Pilzen der Pflanze *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae). Diplomarbeit, Institut für Pharmazeutische Biologie, Bonn.
- Kearney, J.F., Parrott, W.A., Hill, N.S. (1991): Cell biology & molecular genetics – Infection of somatic embryos of tall fescue with *Acremonium coenophialum*. *Crop Science* 31: 979-984.
- Keller, H.H., Da Prada, M. (1979): Central dopamine agonistic activity and microsomal biotransformation of lisuride, lergotrile and bromocriptine. *Life Science* 24: 1211-1221.
- Keller, U. (1999): Biosynthesis of ergot alkaloids. In *Ergot, the genus Claviceps*. Kren, V., Cvak, L. (eds.), Harwood Academic, Chur: 95-163.
- Keogh, R.G., Tapper, B.A., Fletcher, R.H. (1996): Distributions of the fungal endophyte *Acremonium lolii*, and of the alkaloids lolitrem B and peramine within perennial ryegrass. *N. Z. J. Agric. Res.* 39: 121-127.
- Kim, I.-S., Kim, S.-U., Anderson, J.A. (1981): Microsomal agroclavine hydroxylase of *Claviceps* species. *Phytochemistry* 20: 2311-2314.
- Kim, S.-U., Cho, Y.-J., Floss, H.G., Anderson, J.A. (1983): Conversion of elymoclavine to paspalic acid by a particulate fraction from an ergotamine-producing strain of *Claviceps* sp. *Planta Medica* 48: 145-148.
- Kozlovsky, A.G. (1999): Nontraditional producers of ergot alkaloids. *Applied Biochemistry and Microbiology* 35 (5): 477-485.

- Krupinski, V.M., Robbers, J.E., Floss, H.G. (1976): Physiological study of ergot: induction of alkaloid synthesis by tryptophan at the enzymic level. *J.Bacteriol.* 125: 158-165.
- Kucht, S. (2003): Korrelation von Ergolinalkaloidgehalt und Vorkommen assoziierter Pilze bei Convolvulaceae. Diplomarbeit, Institut für Pharmazeutische Biologie, Bonn.
- Kucht, S., Groß, J., Hussein, Y., Grothe, T., Keller, U., Basar, S., König, W.A., Steiner, U., Leistner, E. (2004). *Planta* 219: 619-625.
- Lam, C.K., Belanger, F.C., White (Jr.), J.F., Daie, J. (1995): Invertase activity in *Epichloë / Acremonium* fungal endophytes and its possible role in choke disease. *Mycol. Res.* 99: 867-873.
- Latch, G.C.M., Christensen, M.J. (1985): Artificial infection of grasses with endophytes. *Ass. Appl. Biol.* 107: 17-24.
- Leach, C.M. (1962a): The sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. *Canadian Journal of Botany* 40: 151-161.
- Leach, C.M. (1962b): The quantitative and qualitative relationship of ultraviolet and visible radiation to the induction in *Ascochyta pisi*. *Canadian Journal of Botany* 40: 1577-1602.
- Leuchtman, A., Clay, K. (1988): *Atkinsonella hypoxylon* and *Balansia cyperi*, epiphytic members of the Balansiae. *Mycologia* 80: 192-199.
- Leuchtman, A., Clay, K. (1996): Isozyme evidence for host races of the fungus *Atkinsonella hypoxylon* (Clavicipitaceae) infecting the *Danthonia* (Poaceae) complex in the southern appalachians. *American Journal of Botany* 83 (9): 1144-1152.
- Lewis, E.A., Bills, G.F., Heredia, G., Reyes, M., Arias, R.M., White (Jr.), J.F. (2002): A new species of endophytic *Balansia* from Veracruz, Mexico. *Mycologia* 94 (6): 1066-1070.
- Linsmaier, E.M., Skoog, F. (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.

Lyr, H. (1987/1995): Modern selective fungicides – Properties, applications and mechanisms of action, Gustav Fischer Verlag.

Maier, W., Schmidt, J., Nimtz, M., Wray, V., Strack, D. (2000): Secondary products in mycorrhizal roots of tobacco and tomato. *Phytochemistry* 54: 473-479

Maier, W., Schumann, B., Gröger, D. (1988): Microsomal oxygenases involved in ergoline alkaloid biosynthesis of various *Claviceps* strains. *J. Basic Microbiol.* 28: 83-93.

Mantegani, S., Brambilla, E., Caccia, C., Damiani, G., Fornaretto M.G., McArthur, R.A., Varasi, M. (1998): Serotonergic ergoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 1117-1122.

Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., Mootz, H.D. (1997): Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* 97: 2651-2673.

Marienfeld, J.R., Unseld, M., Brandt, P., Brennicke, A. (1997): Viral nucleic acid transfer between fungi and plants. *Trends in Genetics* 13: 260-261.

Medeiros, R.M.T., Barbosa, R.C., Riet-Correa, F., Lima, E.F., Tabosa, I.M., de Barros, S.S., Gardner, D.R., Molyneux, R.J. (2003): Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in Northeastern Brazil.

Michalakis, Y., Olivieri, I., Renaud, F., Raymond, M. (1992): Pleiotropic action of parasites: how to be good for the host. *Trends Ecol. Evol.* 7: 59-62.

Miles, C.O., Lane, G.A., di Menna, M.E., Garthwaite, I., Piper, E.L., Ball, O.J.-P., Latch, G.C.M., Allen, J.M., Hunt, M.B., Bush, L.P., Min, F.K., Fletcher, I., Harris, P.S. (1996): High levels of ergonovine and lysergic acid amide in toxic *Achnatherum inebrians* accompany infection by an *Acremonium*-like endophytic fungus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1285-1290.

Mockaitis, J.M., Kivilaan, A., Schulze, A. (1973): Studies of the loci of indole alkaloid biosynthesis and alkaloid translocation in *Ipomoea violacea* plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 164: 248-257.

Moon, C.D., Miles, C.O., Jarlfors, U., Schardl, C.L. (2002): The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern hemisphere. *Mycologia* 94: 694-711.

Moritz, O. (1953): Einführung in die allgemeine Pharmakognosie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Mothes, K. (1981): Zur Geschichte unserer Kenntnisse über die Alkaloide. *Pharmazie* 36: 199-209.

Mothes, K., Schütte, H., Luckner, M. (1985): Biochemistry of alkaloids. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.

Murray, F.R., Latch, G.C.M., Scott, D.B. (1992): Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. *Mol. Gen. Genet.* 233: 1-9.

National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals (NRA) (2001): Spiroxamine; Commonwealth of Australia Gazette NO. NRA 11: 30-31.

Ohomo, S., Sato, T., Utagawa, T. Abe, M. (1975): Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B and C from the cultures of *Penicillium roqueforti*. *Agric. Biol. Chem.* 39: 1333-1334.

Ortega, F., Steiner, U., Dehne, H.-W. (1998): Induced resistance to apple scab: microscopic studies on the infection cycle of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Phytopathology* 146: 399-405.

Otsuka, T., Anderson, J.A., Floss, H.G. (1979): The stage of N-methylation as the second pathway-specific step in ergoline biosynthesis. *Chem. Comm.* 15: 660-662.

Petrini, O., Sieber, T.N., Toti, L., Viret, O. (1992): Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins* 1: 185-196.

Plattner, H., Zingsheim, H.P. (1987): Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Fischer Verlag, Stuttgart.

Porter, J.K. (1994): Chemical constituents of grass endophytes. In Biotechnology of endophytic fungi of grasses, Bacon, C.W. und White (Jr.), J.F. (eds.). CRC, Boca Raton, Fla: 103-123.

Powell, R.G., Plattner, R.D., Yates, S.G., Clay, K., Leuchtman, A. (1990): Ergobalansine, a new ergot-type peptide alkaloid isolated from *Cenchrus Echinatus* (sandbur grass) infected with *Balansia obtecta* and *Balansia cyperi*. Journal of Natural Products 53 (5): 1272-1279.

Rätsch, C. (2004): Enzyklopädie der psychoaktiven Pflanzen. Wiss. Verl.-Ges., AT Verlag Aarau / Schweiz.

Reddy, P.V., Bergen, M.S., Patel, R., White (Jr.), J.F. (1998): An examination of molecular phylogeny and morphology of the grass endophyte *Balansia claviceps* and similar species. Mycologia 90 (1): 108-117.

Redlin, S.C., Carris, L.M. (1997): Endophytic fungi in grasses and woody plants – Systematics, ecology and evolution. APS Press: Chapter 1, 7, 8.

Redman, R.S., Dunigan, D.D., Rodriguez, R.J. (2001): Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader ? New Phytologist 151: 705-716.

Richardson, M.D., Logendra, S. (1997): Ergosterol as an indicator of endophyte biomass in grass seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 3903-3907.

Riederer, B., Han, M., Keller, U. (1996): D-lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. J. Biol. Chem. 271: 27524-27530.

Rykard, D.M., Luttrell, E.S. (1982): Development of the conidial state of *Myriogenospora atramentosa*. Mycologia 74 (4): 648-654.

Sachweh, U. (1987): Grundlagen des Gartenbaus, Verlag Eugen Ulmer GmbH.

Saha, D., Johnson-Cicalese, J. M., Halisky, P.M., Van Heemstra, M.I., Funk, C.R. (1987): Occurrence and significance of endophytic fungi in fine fescue. *Plant Dis.* 71: 1021-1024.

Saikkonen, K., Helander, M., Faeth, S.H., Schulthess, F., Wilson, D. (1999): Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neotyphodium* endophytes in Arizona fescue populations. *Oecologia* 121: 411-420.

Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H. (2004): Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* 9 (6): 275-280.

Sampson, K. (1933): The systematic infection of grasses by *Epichloë typhina* (Pers.) Tul. *Transactions of the British Mycological Society* 18: 30-47.

Schardl, C.L. (1996): *Epichloe* species: fungal symbionts of grasses. *Annual Review of Phytopathology* 34: 109-130.

Schardl, C.L., Clay, K. (1997): Evolution of mutualistic endophytes from plant pathogens. In *Plant Relationships, Part B*, Carroll, G.C., Tudzynski, P. (eds.), *The Mycota* 5, Springer Verlag: 221-238.

Schardl, C.L., Kuldau, G.A., White, J.F., Siegel, M.R. (1997): Molecular systematics of Clavicipitaceae supporting monophyly of genus *Epichloe* and form genus *Ephelis*. *Mycologia* 89: 431-441.

Schardl, C.L., Leuchtman, A., Chung, K.-R., Penny, D., Siegel, M.R. (1997): Coevolution by common descent of fungal symbionts (*Epichloë* spp.) and grass hosts. *Mol. Biol. Evol.* 14 (2): 133-143.

Schardl, C.L., Leuchtman, A., Spiering, M.J. (2004): Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 315-340.

Schardl, C.L., Leuchtman, A., Tsai, H.-F., Collett, M., Watt, D.M., Scott, D.B. (1994): Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen, *Epichloe typhina*. *Genetics* 136: 1307-1317.

- Schardl, C.L., Liu, J.-S., White (Jr.), J.F., Finkel, R.A., An, Z., Siegel, M.R. (1991): Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and Clavicipitaceous plant pathogens. *Plant Systematics and Evolution* 178: 27-41.
- Schreiber, L. (1996): Wetting of *Abies grandis* upper needle surface: influence of Ph, wax chemistry and epiphyllic microflora on contact angles. *Plant, Cell & Environ.* 19: 455-463.
- Schreiber, L., Schönherr, J. (1993): Determination of foliar uptake of chemicals: influence of leaf surface microflora. *Plant, Cell & Environ.* 16: 743-748.
- Schulz, B., Wahnke, U., Draeger, S., Aust, H.J. (1993): Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilisation methods. *Mycol. Res.* 97 (12): 1447-1450.
- Schwadorf, K., Müller, H.-M. (1989): Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (3): 457-462.
- Scott, P.M., Merrien, M.-A., Polonsky, J. (1976): Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*. *Experientia* 32: 140-142.
- Siegel, M.R., Bush, L.P. (1997): Toxin production in grass/endophyte associations. In *The mycota V. Pt. A. Plant relationship*, Carroll, G. und Tudzynski, P. (eds.). Springer Berlin: 185-207.
- Siegel, M.R., Latch, G.C.M., Bush, L., Fannin, F.F., Rowan, D.D., Trapper, B.A., Bacon, C.W., Johnson, M.C. (1990): Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology* 16: 3301-3315.
- Sinclair, J.B., Cerkauskas, R.F. (1997): Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In *Endophytic fungi in grasses and woody plants*, Redlin, S.C., Carris, L.M. (eds.), APS Press, 1997: Chapter 1.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. (1998): Strasburger, *Lehrbuch der Botanik* 34. Auflage, Gustav Fischer Verlag: 357-362, 539-582.

Smith, K.T., Bacon, C.W., Luttrell, E.S. (1985): Reciprocal translocation of carbohydrates between host and fungus in bahiagrass infected with *Myriogenospora atramentosa*. *Phytopathology* 75: 407-411.

Spiering, M. J., Lane, G.A., Christensen, M.J., Schmid, J. (2005): Distribution of the fungal endophyte *Neotyphodium lolii* is not a major determinant of the distribution of fungal alkaloids in *Lolium perenne* plants. *Phytochemistry* 66: 195-202.

Stadler, P.A., Giger, R. (1984): Ergot alkaloids and their derivatives in medical chemistry and therapy. In *Natural products and drug development*, Krosgard-Larson, P., Christensen, C.H., Kofod, H. (eds.). Munksgaard Copenhagen: 463-485.

Stahl, E., Schild, W. (1981): *Pharmazeutische Biologie, Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen*, 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag: 16-22.

Stauffacher, D., Tschertter, H., Hofmann, A. (1965): Isolierung von Ergosin und Ergosinin neben Agroclavin aus den Samen von *Ipomoea argyrophylla* Vatke (Convolvulaceae). *Fasciculus* 48 (149): 1379-1380.

Steiner, U., Ahimsa-Müller, M.A., Markert, A., Kucht, S., Groß, J., Kauf, N., Kuzma, M., Zych, M., Lamshöft, M., Furmanowa, M., Knoop, V., Drewke, C., Leistner, E. (2006): Molecular characterization of seed transmitted clavicipitaceous fungus occurring on dicotyledoneous plants (Convolvulaceae). *Planta* 224: 533-544.

Stovall, M.E., Clay, K. (1988): The effect of the fungus *Balansia cyperi* on the growth and reproduction of purple nutsedge, *Cyperus rotundus*. *New Phytologist* 109: 351-359.

Svitkina, T.M., Shevelev, A.A., Bershady, A.D., Gelfand, V.I. (1984): Cytoskeleton of mouse embryo fibroblasts. Electron microscopy of platinum replicas. *Eur. J. Cell. Biol.* 34: 64-74.

Taber, W.A., Heacock, R.A. (1962): Location of ergot alkaloid and fungi in the seed of *Rivea corymbosa* (L.) Hall. F., "Ololiuqui". *Canadian Journal of Microbiology* 8: 137-143.

- Taber, W.A., Heacock, R.A. (1963): Ergot-type alkaloids in vegetative tissue of *Rivea corymbosa* (L.) Hall. f.. *Phytochemistry* 2: 99-101.
- Tan, Y.Y., Spiering, M.J., Scott, V., Lane, G.A., Christensen, M.J., Schmid, J. (2001): In planta regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5377-5383.
- TePaske, M.R., Powell, R.G., Clement, S.L. (1993): Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 2299-2303.
- Towers, N.R. (2000): Mycotoxin poisoning in grazing livestock. World Buiatric Congress XXI, Punta del Este, Uruguay, CD-ROM: 1181-1192.
- Tsai, H.-F., Liu, J.-S., Staben, C., Christensen, M.J., Latch, G.C., Siegel, M.R., Schardl, C.L. (1994): Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloe* species. *Proceedings of the National Academy of Science* 91: 2542-2546.
- Tsai, H.-F., Wang, H., Gebler, J.C., Poulter, C.D., Schardl, C.L. (1995): The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase. The committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 119-125.
- Tudzynski, P., Correia, T., Keller, U. (2001): Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 1-22.
- Tudzynski, P., Hölter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N., Keller, U. (1999): Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 133-141.
- Tudzynski, P., Scheffer, J. (2004): *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Mol. Plant Pathol.* 5 (5): 377-388.
- Wadworth, A.N., Crisp, P. (1992): Co-dergocrine mesylate. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in age-related cognitive decline. *Drugs Aging* 2: 153-173.

Walter, M.H., Fester, T., Strack, D. (2000): Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *The Plant Journal* 21 (6): 571-578.

Werner, S., Steiner, U., Becher, R., Kortekamp, A., Zyprian, E., Deising, H.B. (2002): Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 169-173.

White (Jr.) J.F., Martin, T.I., Cabral, D. (1996): Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phylloplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia* 88 (2): 174-178.

White (Jr.), J.F. (1993): Structure and mating system of the graminicolous fungal epibiont *Echinodothis tuberiformis* (Clavicipitales). *American Journal of Botany* 30 (12): 1465-1471.

White (Jr.), J.F. (1997): Systematics of the graminicolous Clavicipitaceae. Applications of morphological and molecular approaches. In *Neotyphodium/grass interactions*, Bacon, C.W., Hill, N.S. (eds.), Plenum Press New York: 27-39.

White (Jr.), J.F., Breen, J.P., Morgan-Jones, G. (1991b): Substrate utilization in selected *Acremonium*, *Atkinsonella* and *Balansia* species. *Mycologia* 83 (5): 601-610.

White (Jr.), J.F., Glenn, A.E. (1994): A study of two fungal epibionts of grasses: structural features, host relationships, and classification in the genus *Myrogenospora*. *American Journal of Botany* 81: 216-223.

White (Jr.), J.F., Morrow, A.C., Morgan-Jones, G., Chambless, D.A. (1991a): Endophyte-host associations in forage grasses. XIV. Primary stromata formation and seed transmission in *Epichloë typhina*: developmental and regulatory aspects. *Mycologia* 83: 72-81.

White (Jr.), J.F., Owens, J.R. (1992): Stromal development and mating system of *Balansia epichloë*, a leaf-colonizing endophyte of warm-season grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (2): 513-519.

Wilkinson, R.E. (1986): Ergot alkaloid contents of *Ipomoea lacunosa*, *I. hederacea*, *I. trichocarpa* and *I. purpurea* seeds. *Canadian Journal of Plant Science* 66: 339-343.

Zifa, E., Fillion, G. (1992): 5-Hydroxytryptamine receptors, *Pharmacol. Rev.* 44: 401-458.

Zocher, R., Keller, U. (1997): Thiol template peptide synthesis systems in bacteria and fungi. In *Advances in microbial physiology*, Poole, R.K. (ed.). Academic San Diego: 85-131.

8 ANHANG

8.1 Informationen zu den Fungiziden Benomyl[®], Folicur[®], Pronto Plus[®] und Switch[®]

Produktinformationen zu den in der Arbeit verwendeten Fungiziden (vgl. Tab. 2.2, und Tab. 4.2) befinden sich auf der beiliegenden CD im Ordner „Herstellerangaben Fungizide“ (in der elektronischen Veröffentlichung Internetadressen hinten angefügt).

8.2 Informationen zu dem Dünger Plantosan[®]

Produktinformationen zu dem in der Arbeit verwendeten Dünger (vgl. 2.1.3) befinden sich auf der beiliegenden CD im Ordner „Herstellerangaben Plantosan“ (in der elektronischen Veröffentlichung Internetadresse hinten angefügt).

8.3 Massenspektren der Ergolinalkaloide

Die zu Kapitel 4.2.3.1 gehörenden Alkaloid-Massenspektren sind auf der beiliegenden CD im Ordner „Massenspektren Alkaloide“ zu finden (in der elektronischen Veröffentlichung hinten angefügt).

8.4 Massenspektren der Terpenoide

Die Massenspektren der Hauptkomponenten des Ätherischen Öls von *Ipomoea asarifolia* (vgl. 4.1.2) bzw. von *Turbina corymbosa* (vgl. 4.2.3.5) sind auf der beiliegenden CD im Ordner „Massenspektren Terpenoide/*Ipomoea*“ bzw. „Massenspektren Terpenoide/*Turbina*“ zu finden (in der elektronischen Veröffentlichung hinten angefügt).