

Das Mikrobiologische Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich¹

3 Endophytische Pilze²

Emil Müller, ETH Zürich

Bis vor kurzem galten gesunde pflanzliche Gewebe, abgesehen von Mykorrhiza-Partnern in den Wurzeln und gelegentlich eindringenden Erregern von Pflanzenkrankheiten, als frei von Mikroorganismen. Sporadisch, aber ohne weitere Beachtung zu erfahren, finden sich allerdings ältere Berichte über offensichtlich harmlose Pilze in Pflanzengeweben. Bei den vor etwa zehn Jahren durch eine Arbeitsgruppe des mikrobiologischen Institutes begonnenen Untersuchungen über Pilze in gesunden pflanzlichen Geweben wurden seither in gegen 200 Pflanzenarten Pilze nachgewiesen. Da dabei Farne, Moose und Blütenpflanzen aus verschiedensten Familien und aus verschiedenen Kontinenten und Klimazonen berücksichtigt wurden, scheint heute die Annahme einer allgemeinen Verbreitung von Pilzen in gesunden Pflanzen berechtigt (M. E. Bernstein und F. E. Carroll, 1977; F. E. Carroll et al., 1977; O. Petrini und E. Müller, 1979; M. Luginbühl und E. Müller, 1980; O. Petrini et al., 1982; O. Petrini und M. Dreyfuss, 1981; O. Petrini und G. Carroll, 1981; B. Widler und E. Müller, 1984).

Der Nachweis erfolgt durch Isolierung von Myzelien, die aus dem Gewebe wachsen. Die dafür verwendeten Gewebestücke werden zunächst an ihrer Oberfläche sterilisiert und anschließend auf sterilen Nähragar ausgelegt; die Pilze beginnen nach einigen Tagen aus den Schnittflächen zu wachsen und können in Kulturröhrchen übertragen werden. Auf Grund später gebildeter Fruktifikationen lassen sie sich identifizieren. Nicht fruchtende Kulturen werden durch andere Bedingungen zur Fruktifikation gezwungen, doch bleibt am Ende immer noch ein Anteil von 15–30% nicht fruchtender und damit nicht bestimmbarer Kulturen; zur Beurteilung des gesamten Befalles sind diese aber trotzdem brauchbar. Ein direkter Nachweis von endophytischen Pilzen in den Geweben ist mit geeigneten Färbemethoden zwar möglich, eine zahlenmässige Erfassung und eine Artbestimmung ist dabei aber praktisch ausgeschlossen.

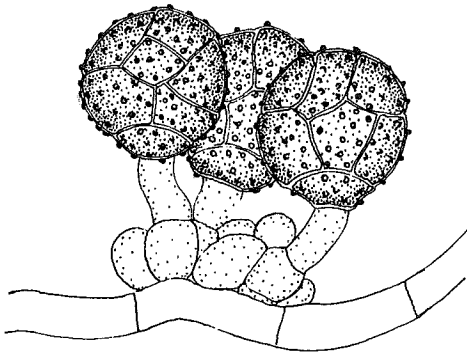


Bild 1 *Epicoccum purpurascens*, ein weit verbreiteter endophytischer Pilz; Myzel mit ungeschlechtlich gebildeten Sporen (Konidien), Vergrösserung 2000 mal.

¹ Quellenangabe: Bulletins der ETH Zürich, Nr. 191–195 (1985) und Jahresbericht ETHZ 1984.

² Beiträge 1 und 2 siehe Heft 1986/1.

Die Isolierung von Endophyten aus beliebig vielen Gewebeproben erlaubt, den Anteil aller Infektionen und der einzelnen Pilzarten festzustellen; eine auf klar formulierten Fragestellungen abgestimmte Probeerhebung ermöglicht auch eine statistische Auswertung der Daten. Insbesondere wurden folgende Teilaspekte weiter verfolgt: Welche Pilze treten als Endophyten auf? Woher stammen sie, und wie gelangen sie in die Gewebe? Ist ihr Vorkommen in den Pflanzen zufällig, oder folgt es bestimmten Gesetzmässigkeiten? Sind bei den endophytischen Pilzen individuelle Verhaltensweisen erkennbar? In welcher Weise beeinflussen die besiedelnden Pilze ihre Wirte?

Beteiligte pilzliche Organismen

Die bis heute festgestellten etwa 800 Arten pilzlicher Endophyten gehören zur Hauptsache zu den Ascomyceten (Schlauchpilze) und zu den mit ihnen verknüpften, nur ungeschlechtlich fruktifizierenden Deuteromyceten. Vereinzelt Oomyceten und Basidiomyceten lassen sich ebenfalls feststellen. Mit unserer Nachweismethode aber nicht erfassbar sind die auf lebendes Gewebe angewiesenen obligat biotrophen Organismen. Leider ist es – besonders bei Deuteromyceten – nicht immer möglich, die Bestimmung bis zur Art zu führen, da viele systematische Gruppen ungenügend bearbeitet sind und deshalb die Zuordnung zu einer bestimmten Art sehr unsicher ist. Immerhin lassen sich heute schon einige klar abgegrenzte Gruppen erkennen, deren Glieder immer wieder in den verschiedensten Pflanzen angetroffen werden.

In allen bisher untersuchten Pflanzenarten fanden wir bis anhin nicht nur einen, sondern verschiedene Endophyten; das Spektrum reicht von Efeu (*Hedera helix*) mit 24 bis zur immergrünen Bärentraube (*Arctostaphylos uva ursi*) mit 204 Arten (M. Luginbühl und E. Müller, 1980; B. Widler und E. Müller, 1984). Manche Pilze kommen in den verschiedensten Pflanzenarten vor; für einige können wir sogar eine fast allgemeine Verbreitung erkennen, so für den Deuteromyceten *Epicoccum purpurascens* (Bild 1). Andere wiederum sind streng auf eine einzige Pflanzenart oder auf kleine Gruppen nahe verwandter Arten spezialisiert. So lebt *Leptosphaerulina carinthiaca* nur in den Blattadern von *Ranunculus alpestris* (Alpenhahnenfuss); sie bildet ihre Fruchtkörper jeweils in den abgestorbenen, überwinterten Blättern (Bild 2; P. Crivelli 1983).

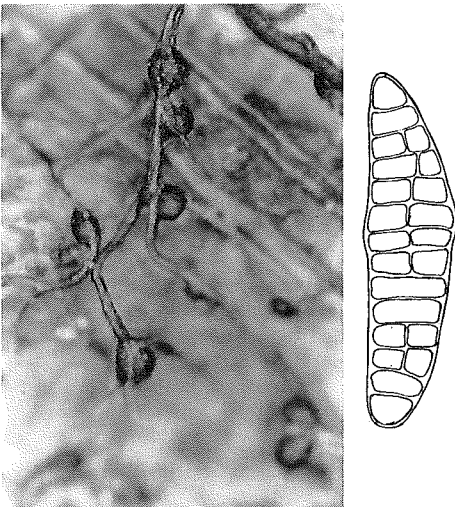


Bild 2 Teil eines überwinterten Blattes des Alpenhahnenfuss (*Ranunculus alpestris*) mit Fruktifikationen von *Leptosphaerulina carinthiaca*, einem spezifischen Endophyten des Wirtes. Vergrösserung 10 mal; rechts: Ascospore von *Leptosphaerulina carinthiaca*, Vergrösserung 2000 mal.

Besiedlung der Pflanzen

Der grösste Teil der Endophyten geht auf spontane Infektionen aus Sporen zurück, die durch den Wind transportiert werden und von der Pflanzenoberfläche aus mit ihren Keimhyphen in die Gewebe dringen. Die Pflanzenorgane sind einem steten Infektionsdruck ausgesetzt, dem sie in unterschiedlichem Masse erliegen. Allerdings dürfte bei den einzelnen Pflanzenarten jeweils nur eine beschränkte Zahl von Pilzen fähig sein, die ihnen begehenden Abwehrmechanismen zu überwinden. Auch von den zahlreichen Bodenpilzen besiedeln jeweils nur wenige Wurzeln und bodennahe Pflanzenteile. Ein kleiner Teil von Endophyten dürfte aber auch mit den Samen auf die nächste Generation übertragen werden. So sind für Winterweizen und für Raps verschiedene solcher samenbürtigen Pilzarten nachgewiesen (z. B. T. Riesen und T. Sieber 1985).

Mit zunehmendem Alter der Pflanzen nimmt die Zahl der Infektionen mit Endophyten zu (Tabelle 1). Die Grösse des Befalles und der Artenbestand sind aber auch vom Standort und seinen klimatischen Bedingungen abhängig, und er kann auch von Individuum zu Individuum variieren. Am Beispiel der immergrünen Bärentraube wird deutlich, dass die Pflanzen unter alpinen Bedingungen (Davos Parsenn, 2310 m) bedeutend langsamer besiedelt werden als in tieferen Lagen (Alvaneu, 1220 m; Tabelle 1). Einzelne Pilzarten können sich allerdings sehr verschieden verhalten. Bei der immergrünen Bärentraube (B. Widler und E. Müller, 1984) kommen sogar saisonale Unterschiede, z. B. Sommermaxima, Wintermaxima, vor. So kann der Ascomycet *Anthostomella sepebilis* im Winter relativ häufig, in den übrigen Jahreszeiten nur spärlich isoliert werden (Bild 3). Möglicherweise bewirkt der Pilz verfrühten Blattfall; die infizierten Blätter sind dann in den nächsten Proben nicht mehr vorhanden.

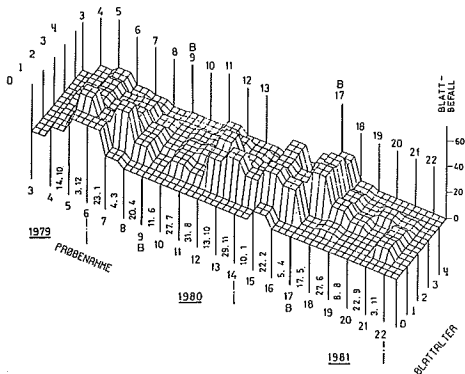


Bild 3 Darstellung der Häufigkeit von *Anthostomella sepebilis* im Jahresablauf, geordnet nach Daten der Probenahmen und Alter der Blätter. Die Wintermaxima sind deutlich erkennbar, ebenso die anfängliche Zunahme und die spätere Abnahme mit zunehmendem Alter der Blätter.

Tabelle 1. Häufigkeit des Endophytenbefalles von verschiedenen alten Blättern einiger Pflanzenarten (in % aller Blätter)

Pflanzenart	Blattalter in Jahren				
	0-1	1-2	2-3	3-4	4 und mehr
<i>Buxus sempervirens</i> (Buchs)	35	40	50	70	76
<i>Ilex aquifolium</i> (Stechpalme)	48	62	75	78	
<i>Hedera helix</i> (Efeu)	39	64	89	91	
<i>Juniperus communis</i> (Wacholder)	28	36	53	71	80
<i>Arctostaphylos uva ursi</i> Parsenn	10	28	78	94	95
(Bärentraube) Alvaneu	43	61	93	96	99

Die Besiedlung der Pflanzenorgane (Wurzeln, Triebe, Blätter, Blüten, Früchte) durch die verschiedenen Pilzarten erfolgt oft nicht gleichmässig. Beim Weizen (T. Riesen und T. Sieber 1985) ist *Phaeosphaeria nodorum*, der wichtigste Erreger der Getreidebräune (Septoriose), ein Pilz mit vorwiegend endophytischem Verhalten, bevorzugt im Halm zu finden; *Fusarium*-Arten, wahrscheinlich Schwächeparasiten, und *Idriella bolleyi*, ein wichtiger Antagonist von *Phaeosphaeria nodorum*, besiedeln sowohl Wurzel wie Halm, und *Periconia macrospinosa* ist kaum ausserhalb der Wurzel anzutreffen.

Noch weiter geht die Spezialisierung in den Fällen, in denen bestimmte Pilzarten bevorzugt die Mittelrippe, die Basis oder die Spitze von Blättern besiedeln.

Tabelle 2. Prozentualer Anteil pilzlicher Endophyten des Kulturweizens in den wichtigsten Pflanzenorganen

Pilzarten	Total der Isolierungen	Halm %	Blatt %	Spelze %	Wurzel %
<i>Phaeosphaeria nodorum</i> (= <i>Stagonospora nodorum</i>)	6343	65,0	14,2	8,0	8,0
<i>Didymella exitialis</i>	1073	7,0	82,0	1,7	0,7
<i>Gibberella zeae</i> (= <i>Fusarium graminearum</i>)	1706	52,8	3,4	3,4	32,4
<i>Fusarium culmorum</i>	1427	37,0	2,6	4,2	53,4
<i>Idriella bolleyi</i>	2318	25,6	2,0	1,0	70,8
<i>Periconia macrospinosa</i>	606	1,0	1,0	–	97,8

Interaktionen von pilzlichen Endophyten mit ihren Wirten

Endophyten entziehen ihren Wirten Nährstoffe, um zu überleben; in Anbetracht der winzigen Thalli dürfte dieser Entzug allerdings sehr gering sein. Andererseits werden sie Stoffwechselprodukte an die Gewebe abgeben; diese dürften für die Wirte grösstenteils wertlos sein. Für einige Endophyten ist aber die Produktion von Auxinen nachgewiesen, weshalb für diese Arten eine Beeinflussung von Wachstumsvorgängen nicht auszuschliessen ist. Leider fehlen uns noch weitergehende Hinweise für die Bedeutung dieser Aktivität. Ebenso wenig wissen wir über die Bedeutung der bei vielen endophytischen Pilzen nachgewiesenen Enzyme des Stoffabbaues wie Cellulasen, Pectinasen, Peroxydasen, die aber sicher in der für manche Endophyten bekannten saprobischen Phase in toten Pflanzenteilen zum Zuge kommen (T. Carroll und O. Petrini, 1983).

Mit der Wahl von Gewebestücken aus gesunden, unbeschädigten Pflanzenteilen wollten wir in erster Linie den natürlichen Bestand an endophytischen Pilzen erfassen; immer wieder und zum Teil sogar mehrheitlich isolierten wir aber auch potentiell pathogene Pilze. In wenigen Fällen dürften diese im Begriffe sein, sich in den Geweben festzusetzen, um ihre schädigende Wirkung zu entfalten. Lange nicht alle Infektionen mit pathogenen Pilzen führen, wie die Beobachtungen zeigen, zu einem sofortigen oder auch nur späteren Krankheitsausbruch. So konnten wir schon bei Keimlingen des Raps und allen weiteren Entwicklungsstadien den Erreger der Stengelschwärze, *Phoma lingam*, als häufigsten pilzlichen Endophyten feststellen. Abgesehen von einigen Blattflecken blieben aber die typischen Krankheitssymptome während der ganzen Vegetationszeit aus. Nur gerade bei kleinen Verletzungen, z. B. Frassstellen von Tieren, entwickelten sich begrenzte Nekrosen mit den Fruchtkörpern des Pilzes. Im Winterweizen findet man während der ganzen Vegetationsperiode regelmässig den Erreger des Schneeschimmels, *Monographella nivalis* (*Fusarium nivale*), ohne dass sich die Krankheit (Absterben der Jungpflanzen) je geltend macht. Der Pilz vermag sich erfahrungsgemäss nur unter einer länger andauernden Schneebedeckung voll zu entwickeln (z. B. T. Sieber und T. Riesen, 1985). Eine nahe verwandte Art, *Monographella maydis*, bis heute nur aus Mexico und der Karibik bekannt, wurde von Maisblättern aus Mexico relativ häufig als Endophyt isoliert. Tritt in den Maisblättern der ebenfalls nur aus Zentralamerika bekannte Erreger der Teerfleckenkrankheit (*Phyllachora maydis*) hinzu, bilden sich

rund um dessen schwarzen Fruchtkörper grössere nekrotische Flecken, in denen sich die Fruchtkörper der *Monographella* entwickeln (E. Müller und G. J. Samuels 1985). Der obligat biotrophen *Phyllachora maydis*, welche nur in lebendem Gewebe gedeiht, wird dabei die Überlebenschance entzogen, und sie stirbt ab. Der Schaden durch diese Folgekrankheit dürfte merklich grösser sein als durch *Phyllachora* allein (Bild 4).

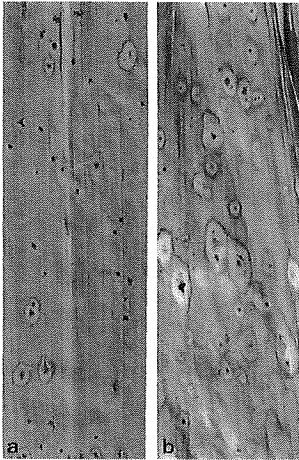


Bild 4 a) Maisblatt mit schwarzen Fruktifikationen von *Phyllachora maydis*. b) Maisblatt mit Fruktifikationen von *Phyllachora maydis* und umgebenden Nekrosen, verursacht durch *Monographella maydis* (natürliche Grösse).

In all diesen Fällen setzt der Ausbruch der Krankheit nicht nur die erfolgreiche Infektion und Besiedlung voraus, sondern es müssen noch weitere Bedingungen erfüllt sein: Verletzungen durch Frass, Lagerung oder Hagelschlag, lange Schneebedeckung oder das Zusammentreffen mit einem zweiten, für sich allein möglicherweise harmlosen Pilz. Zwischen harmlosen und pathogenen Endophyten besteht in diesen Fällen keine deutliche Grenze.

Die Braunfleckenkrankheit des Weizens (Septoriose) ist Gegenstand eines Züchtungsprogrammes für Resistenz an den Forschungsanstalten für Pflanzenbau; es stehen bereits schon Sorten mit erheblicher Resistenz gegen diese Krankheit zur Verfügung. Wir isolierten Endophyten aus zwei anfälligen und zwei resistenten Sorten; die Erreger der Krankheit gehörten zu den am häufigsten erfassten Pilzen (T. Riesen und T. Sieber 1985). In einer der resistenten Sorten war allerdings die Zahl der Pilzisolierungen deutlich geringer als in den anfälligen Sorten, in der anderen resistenten Sorte etwa gleich gross. Die Vermutung liegt nahe, dass die beiden resistenten Sorten unterschiedliche Resistenzmechanismen besitzen, was das Züchtungsprogramm beeinflussen dürfte. Es zeigt sich damit, dass unsere zur Erfassung endophytischer Pilze angewendete Arbeitsmethode durchaus auch zu Lösungen bestimmter Fragestellungen der Phytopathologie beitragen kann.

Schlussfolgerungen

Obschon die Forschung über endophytische Pilze ganz am Anfang steht und die Bedeutung dieser Organismen für die Pflanzen noch keineswegs feststeht, erlauben die bisherigen Untersuchungsergebnisse einige allgemeine Aussagen:

- pilzliche Endophyten sind in den Pflanzen mit grosser Wahrscheinlichkeit allgemein verbreitet;
- der Endophytenbestand einer Pflanze setzt sich aus artspezifischen und nicht spezialisierten Pilzarten zusammen; die Zusammensetzung des Bestandes und der Anteil der einzelnen Pilzarten ist wahrscheinlich für die einzelne Pflanzenart typisch;
- zwischen harmlosen und pathogenen Pilzen besteht keine scharfe Grenze;
- zwischen betont biotrophen und saproben Pilzen besteht keine scharfe Grenze.

Literatur

- Bernstein, M. E. 1977. Internal fungi in old-growth Douglas-fir foliage. *Canad. J. Bot.* 55, 644–653.
- Carroll, F. E., Müller, E. and Sutton, B. C. 1977. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. *Sydowia* 29, 87–103.
- Carroll, G. and Petrini, O. 1983. Patterns of substrate utilisation by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75, 53–63.
- Crivelli, P. 1983. Über die heterogene Ascomycetengattung *Pleospora* Rabh.; Vorschlag für eine Aufteilung. Diss. ETH-Z, No. 7318. Kommissionsverlag Flück, CH-9053 Teufen.
- Luginbühl, M. und Müller, E. 1980. Endophytische Pilze in den oberirdischen Organen von vier gemeinsam an gleichen Standorten wachsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*, *Ilex*, *Ruscus*). *Sydowia* 33, 185–209.
- Müller, E. and Samuels, G. J. 1984. *Monographella maydis* sp. nov. and its connection to the Tar-spot disease of *Zea mays*. *Nova Hedwigia* 40, 113–120.
- Petrini, O. and Carroll, G. 1981. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Canad. J. Bot.* 59, 629–636.
- Petrini, O. und Dreyfuss, M. 1981. Endophytische Pilze in epiphytischen Araceae, Bromeliaceae und Orchidaceae. *Sydowia* 34, 135–148.
- Petrini, O. und Müller, E. 1979. Pilzliche Endophyten am Beispiel von *Juniperus communis*. *Sydowia* 32, 224–251.
- Petrini, O., Stone, J. and Carroll, F. E. 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. *Canad. J. Bot.* 60, 789–796.
- Riesen, T. und Sieber, T. 1985. Endophytic fungi in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Endophytische Pilze von Winterweizen (*Triticum aestivum* L.). Eidg. Techn. Hochschule, zwei Dissertationen, 1–190.
- Widler, B. und Müller, E. 1984. Untersuchungen über endophytische Pilze von *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel (Ericaceae). *Botanica Helvetica* 94, 307–337.