

MetaLine: Aufbau einer Plattform zur Extraktion, biologischen Testung und Formulierung bioaktiver Metaboliten mit potentieller antikanzerogener und antifungaler Aktivität aus schwermetallbelasteten Pilz/Pflanzen-Gemeinschaften

MetaLine: Establishment of a platform for extraction, biological screening and characterization of bioactive metabolites with potential anticancer and fungicidal activity from heavy metal polluted fungal/plant communities

Johanna Hummel, Helmut Baltruschat, Ingo Schellenberg, René Csuk

Das Ziel des hier vorgestellten Projekts MetaLine ist die Evaluierung bioaktiver Sekundärmetaboliten gewonnen aus endophytischen Pilzen aus schwermetallbelasteten Pilz/Pflanzen-Gemeinschaften für kosmetische, pharmakologische und landwirtschaftliche Anwendungen in Form eines Mehrstufenprogramms. Endophytische Pilze, die das Wurzelgewebe schwermetallresistenter Pflanzen besiedeln, wurden bisher noch nicht biotechnologisch untersucht. Im Rahmen des Projekts erfolgen die taxonomische Identifizierung sowie eine funktionelle Charakterisierung hinsichtlich effektiver Sekundärmetaboliten mittels eines zielgerichteten biologischen Screenings. Mehr als 700 endophytische Pilze konnten isoliert werden. Nach einer Selektion anhand phänotypischer Vergleiche wurden fast 400 Isolate auf ihre antifungale Aktivität gegen sieben phytopathogene Pilze bzw. Oomyceten mit Hilfe eines Dualkultur-Assays getestet. Ein Drittel (34 %) der getesteten Mikroorganismen zeigten positive Effekte; diese wurden anschließend in drei verschiedenen Medien für die spätere Extraktion kultiviert. Bei der Durchführung von Lochtests und Sulforhodamine B-Tests wurden erste antifungale und antikanzerogene Extrakte entdeckt.

Schlüsselwörter/Keywords: Endophytische Pilze, Rhizosphäre, Metabolit-Screening, Fungizid, Krebsmedikament, endophytic fungi, rhizosphere, metabolite screening, fungicide, anti-cancer drugs

1. Einleitung

Seit jeher spielen Naturstoffe eine bedeutende Rolle in der Wirkstoffforschung. Sie stellen eine wichtige Quelle neuer, bioaktiver Verbindungen dar, welche wiederum Leitstrukturen für pharmazeutische und landwirtschaftliche Anwendungen liefern können. In Anbetracht der weiter wachsenden Gefahr der Resistenzen von Phytopathogenen gegen Pflanzenschutzmittel liegt es nahe, den Forschungsschwerpunkt an dieser Stelle zu vertiefen, um der genannten Problematik entgegen zu wirken (Gisi & Leadbeater 2010; BMEL 2016). Eine Literaturrecherche hinsichtlich der Isolierung neuer Sekundärmetaboliten zeigt, dass in den letzten Jahren endophytische Mikroorganismen in den Fokus der Forschung gerückt sind. Zahlreiche Publikationen beschreiben das hohe Potential dieser Organismen, bioaktive Verbindungen in einem kommerziell interessanten Maßstab zu produzieren (Hardoim et al. 2015; Martinez-Klimova et al. 2017; Mefteh et al. 2017). Die Aufmerksamkeit der Forschung liegt insbesondere bei Habitaten, die durch extreme Bedingungen wie hohe Trockenheit, Salinität, Hitze, Kälte oder Druck gekennzeichnet sind. Es wird angenommen, dass durch die Synthese besonderer Naturstoffe, Endophyten essentiell zur Anpassungsfähigkeit der Pflanzen an die Umgebung beitragen. Dies kann in Form von entsprechenden Adaptionsprozessen oder durch die Etablierung unterschiedlicher Verteidigungsstrategien, wie induzierter Resistenz oder ACC-Deaminase-Aktivität, erfolgen (Glick 2014; Reimer-Michalski & Conrath 2016) und lässt neue, gegebenenfalls bislang unbekannte Strukturen erwarten. Neben Mangrovenwäldern, (ant)arktischen Lebensräumen oder Halbwüsten zählen auch, aufgrund ihrer hohen Schwermetallbelastung, die anthropogen entstandenen Abraumbalden des Zink-, Kupfer- oder Bleibergbaus zu Extremhabitaten. Schwermetalle wie Blei, Zink oder Kupfer wirken hoch toxisch auf Pflanzen, sodass dieser Lebensraum oftmals fast vegetationsfrei ist und nur ein Gedeihen einer hochspezialisierten Flora zulässt. Charakteristische Vertreter dieser extremen Pflanzengesellschaft sind u. a. das Kupferblümchen (*Minuartia verna* subsp. *hercynica*, KB), das Taubenkropf-Leimkraut (*Silene vulgaris* var. *humilis*, TK) und die Galmei-Grasnelke (*Armeria maritima* subsp. *halleri*, HG), die neben der Karthäuser-Nelke (*Dianthus carthusianorum* subsp. *carthusianorum*, KN) Gegenstand der Untersuchungen sind (Baumbach & Schubert 2008).

Im Rahmen des Forschungsprojekts MetaLine wurden die ehemaligen Kupferabraumhalden der Mansfelder Mulde, die Schuler Hütte, die Okeraue sowie Wiesenabschnitte um die ehemalige Zinkhütte Recyclex in Goslar,

Harz als extreme Lebensräume für die anstehenden Untersuchungen ausgewählt. Dieses Projekt ist ein Gemeinschaftsprojekt der Hochschule Anhalt (AG Prof. Dr. Schellenberg, Institute of Bioanalytical Sciences) und der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (AG Prof. Dr. Csuk, Institut für Organische Chemie). In Form eines Mehrstufenprogramms soll eine Plattform zur Extraktion, biologischen Testung und Formulierung bioaktiver Metaboliten mit potentieller antikanzerogener und antifungaler Aktivität aus schwermetallbelasteten Pilz/Pflanzen-Gemeinschaften für die pharmakologische und landwirtschaftliche Anwendungen entstehen. Hierzu erfolgen der Ausbau und die Weiterentwicklung der bereits existierenden Plattformen beider Institute zur Isolierung und Charakterisierung von pflanzlichen Sekundärmetaboliten zu einer synergistischen Extraktions-, Screening- und Formulierungspipeline aus pilzlichen Wurzelendophyten.

2. Material und Methoden

Die Bearbeitung des Projekts gliedert sich in drei Phasen (Abb. 1): In Phase I erfolgte eine Bodenprobenentnahme in der Rhizosphäre, um die abiotischen Bodenbedingungen genauer zu spezifizieren sowie die Sammlung des zu untersuchenden Wurzelmaterials auf den zwei bereits genannten Standorten (Tabelle 1). Ein Teil des gesammelten Wurzelmaterials stand zur mikroskopischen Visualisierung der pilzlichen Endophyten und ihrer Sporen zur Verfügung. Hierfür wurde modifiziert die Färbemethode nach Koske & Gemma (1989) angewendet. Das verbliebene Pflanzenmaterial diente zur Isolation endophytischer Pilze (EP) aus den oberflächensterilisierten Pflanzenwurzeln auf Potato-Dextrose-Agar (PDA)-Platten. Die gewonnenen Rein-isolate wurden mithilfe eines Dualkultur-Assays (DKA) auf ihre antifungale Wirkung gegen landwirtschaftlich relevante phytopathogene Pilze und Oomyceten untersucht. Je ein Myzelplug des Pathogens und ein Myzelplug des zu untersuchenden EP wurden auf einer PDA-Platte unter definierten Bedingungen (Myzelpluggröße, Abstand der Plugs) co-kultiviert, dabei deuteten die Bildung von Hemmhöfen bzw. ein geringeres Myzelwachstum der Phytopathogene im Vergleich zu einer Kontrollplatte auf eine antifungale Wirkung der EP hin.

Aktive Isolate wurden visuell in ihrer Wirkung eingestuft und fotodokumentiert. Anschließend wurden jene Isolate zur Biomasseproduktion in drei verschiedenen Medien kultiviert, wöchentlich angesichts ihres Wachstumsverhaltens beurteilt und fotodokumentiert. Die so erhaltene Biomasse stand für die Extraktion zur Verfügung. Diese erfolgte auf klassischem Wege oder mithilfe der Accelerated Solvent Extraction unter Verwendung verschiedener Extraktionsprotokolle. Die erhaltenden Rohextrakte wurden mithilfe einer Screening-Plattform (Abb. 2) hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht. War eine Bioaktivität zu verzeichnen, wurden jene Rohextrakte in Phase II überführt. Hier erfolgte, gekoppelt mit der biologischen Screening-Plattform, eine Fraktionierung der Rohextrakte sowie die Isolierung und die strukturelle Identifizierung der bioaktiven Verbindungen. Ist es möglich, eine biologisch aktive Reinsubstanz zu isolieren (sog. „Hit“), sollen in Phase III mithilfe des Instituts für Organische Chemie, AG Prof. Dr. Csuk, strukturelle Modifikationen an der Verbindung vorgenommen werden, um potentiell eine Erhöhung der biologischen Aktivität zu erzielen. Die biologische Screening-Plattform unterteilt sich in drei Einheiten. Untersuchungen bezüglich der antifungalen Wirkung werden am Institute of Bioanalytical Sciences vorgenommen. Das Screening auf antikanzerogene Effekte sowie Acetylcholinesterase- und Butyrylcholinesterase-Inhibitoren erfolgt am Institut für Organische Chemie.

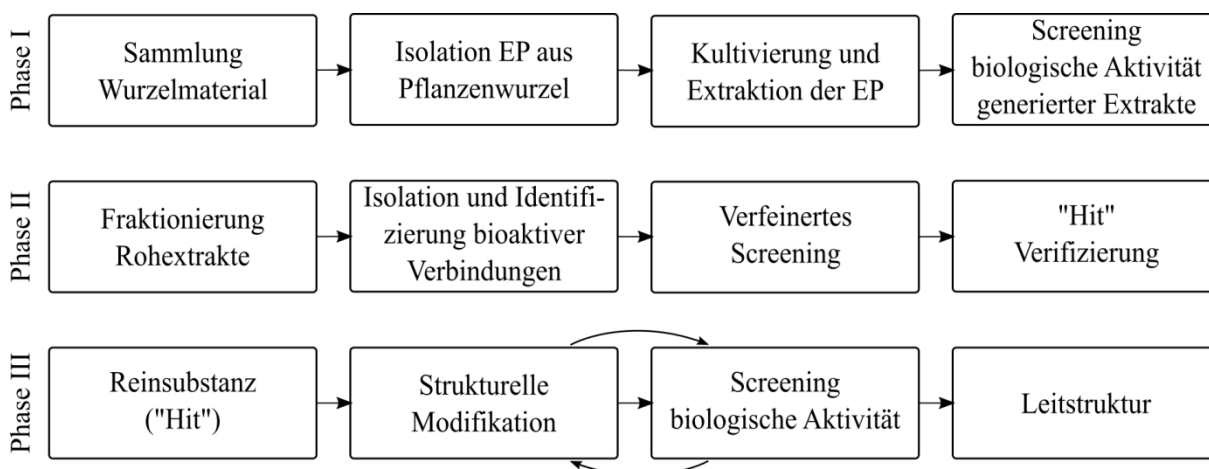
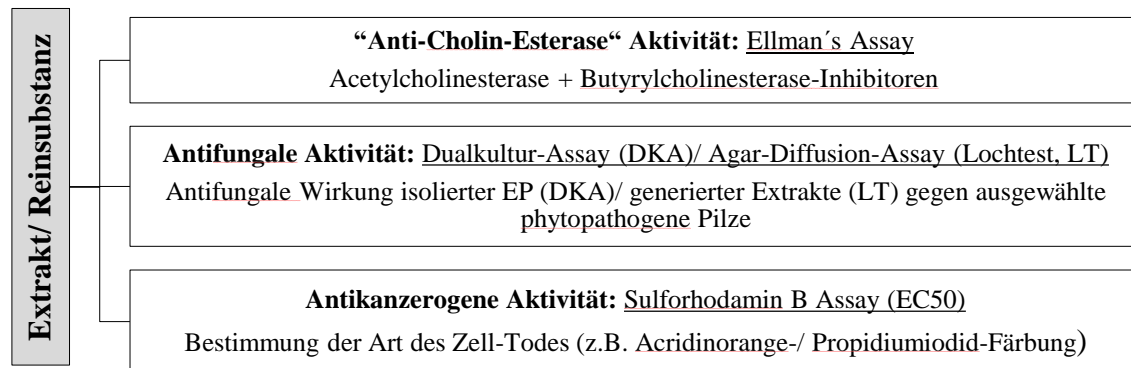


Abb. 1: Darstellung der Methoden in einem Drei-Phasen-Modell zur Bearbeitung des *MetaLine*-Projekts. EP = endophytische Pilze.

Fig. 1: Three-phase model: Methods used to reach the aims of the project. EP = endophytic fungi.

Tabelle 1: Ausgewählte Standorte für die Probenahme und die dazugehörigen Probenahmestellen.**Table 1:** Overview of the study areas and sampling sites.

Nr.	Standort	Probenahmestelle
1	Welfesholz, Mansfelder Land	Welfenschacht (WS) Preußenschacht (PS)
2	Harz	Goslar, an der Zinkhütte Recyclex (GS) Okeraue (OA) Schuler Hütte (SH)

**Abb. 2:** Screening-Plattform zur funktionellen Charakterisierung von Endophyten bzw. generierter Extrakte.**Fig. 2:** Screening platform for the functional characterisation of endophytic fungi and extracts.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Probenahme an Standort 1 erfolgte im Juli und September 2015 sowie im Juni und September 2016. Das Sammeln des Wurzelmaterials am Standort 2 fand im Juni 2017 statt. Hierbei wurden die Standorte 1 und 2 in einzelne Probenahmestellen unterteilt (Tabelle 1). Die Anzahl an entnommenen Pflanzenspezies pro Probenahmestelle ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Aufgrund natürlicher Schwankungen war es nicht möglich, eine gleichverteilte Anzahl an Pflanzen pro Probenahmestelle zu entnehmen. Zudem zeigte die Probenahmestelle Schuler Hütte (SH) zum Zeitpunkt der Beprobung keine Pflanzen der Spezies HG und KN sowie eine sehr geringe Verbreitung der ausgewählten Pflanzenspezies KB und TK. Daher wurde nur jeweils eine KB- bzw. TK-Pflanze gesammelt, um den Bestand zu schonen.

Das Anfärben des Wurzelmaterials zeigte eine Besiedlung des Wurzelinneren mit EP, Pilzsporen und Hyphen in allen untersuchten Wurzeln der Pflanzenspezies KB, TK und KN. In Abb. 3(a)-(d) sind Beispielbilder der mikroskopischen Visualisierung dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Probenahme: Aufschlüsselung an entnommenen Pflanzen pro Spezies und Probenahmestelle. Pflanzenspezies: KB = *M. verna* subsp. *hercynica*, TK = *S. vulgaris* var. *humilis*, HG = *A. maritima* subsp. *halleri*, KN = *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum*.**Table 2:** Overview of the sampling strategy: number of individuals per plant species at the sampling sites. Plant species: KB = *M. verna* subsp. *hercynica*, TK = *S. vulgaris* var. *humilis*, HG = *A. maritima* subsp. *halleri*, KN = *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum*.

Probenahmestelle	Anzahl entnommener Pflanzen pro Spezies			
	KB	TK	HG	KN
Welfenschacht (WS)	8	8	8	6
Preußenschacht (PS)	3	4	4	4
Goslar/Zinkhütte (GS)	2	2	2	0
Okeraue (OA)	2	2	1	0
Schuler Hütte (SH)	1	1	0	0

Pilzliche Endophyten sind hier durch die intensivere Magenta-Färbung zu erkennen. Konkrete Aussagen bezüglich Art und Spezies eines Pilzes können mit dieser Methode nicht getroffen werden. Die dunkelbraune Färbung der Sporen in Abb. 3(d) spricht jedoch für eine Besiedlung der Wurzel mit Dark septate endophytes (DSE). Diese Endophyten sind ubiquitär, vor allem in Extremhabitaten, verbreitet und zeichnen sich durch eine dunkle Färbung aus, welche durch die Einlagerung von Melanin verursacht wird (Likar & Regvar 2009; Regvar et al. 2010; Yuan et al. 2010; Li et al. 2012). Untersuchungen zeigten auf, dass DSE häufig mit schwermetalltoleranten Pflanzengesellschaften assoziiert sind und selbst hohe Toleranzen gegenüber Schwermetallen besitzen (Deram et al. 2008; Li et al. 2012; Ban et al. 2015). Generell ist über die Bedeutung dieser Endophyten wenig bekannt. Doch lässt die häufige Verbreitung in schwermetallbelasteten Gebieten vermuten, dass sie für das Bestehen der Wirtspflanze in solchen Habitaten eine wichtige Rolle spielen (Likar 2011; Ban et al. 2017).

Zur Einschätzung der abiotischen Bodenbedingungen des Standortes 1 wurden insgesamt 21 Rhizosphären-Bodenproben u. a. auf ihren Schwermetallgehalt untersucht. Mittels Atomabsorptionsspektroskopie wurde der Gehalt an Cadmium, Kupfer, Blei, Eisen, Zink und Mangan ermittelt. Der Gesamtschwermetallgehalt jeder untersuchten Probe schwankte zwischen 25,65 mg/g Boden und 171,63 mg/g Boden. Schwermetallanalysen am Verlauf der Oker (Standort 2), welche von Herrn Dr. Friedhart Knolle (Pressesprecher des Nationalparks Harz) zur Verfügung gestellt wurden, zeigten vergleichbar hohe Konzentrationen an Schwermetallen. Der Gesamtschwermetallgehalt der untersuchten Proben (n = 9) lag hier zwischen 20,58 mg/g Boden sowie 72,15 mg/g Boden. Schwermetalle wirken bereits ab einem Bodengehalt von 1 mg/g (0.1 %) vitalitätsmindernd oder letal (Ernst 1974). Jede Probe sowohl an Standort 1 als auch an Standort 2 überschritt diese Grenze um ein Vielfaches. Die Charakterisierung als Schwermetallstandort und Extremhabitat kann für beide Standorte somit bestätigt werden. Dem Isolationsprotokoll folgend, konnten insgesamt 703 Pilze isoliert werden. Für eine Reduzierung des Probenumfangs erfolgte während des Isolationsprozesses eine Selektion von Endophyten mit phänotypischer Ähnlichkeit.

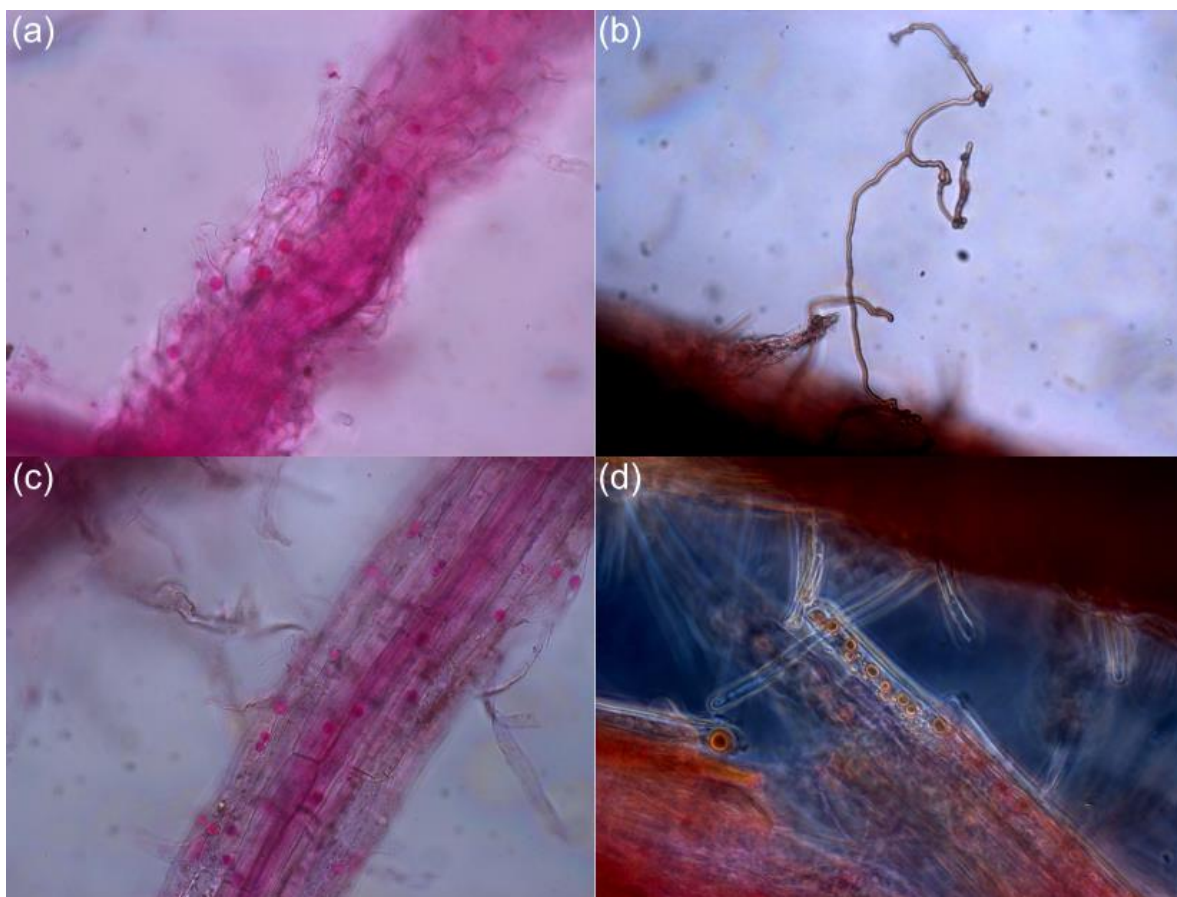


Abb. 3: Mit Säure-Fuchsin angefärbte Wurzeln zur mikroskopischen Visualisierung endophytischer Pilze. (a) *M. verna*, Preußenschacht, Wurzel mit Pilzspore (400x; 0,75); (b) *D. carthusianorum*, Welfenschacht, Pilzhyphe (400x; 0,75); (c) *S. vulgaris*, Welfenschacht, Sporen in Wurzelhaar (400x; 0,75); (d) *D. carthusianorum*, Preußenschacht, Dark septate endophyte in Wurzel (400x; 0,75).

Fig. 3: Acid fuchsin stained roots for microscopic visualizaition of endophytic fungi. (a) *M. verna*, Preußenschacht, Root with fungal spores (400x; 0,75); (b) *D. carthusianorum*, Welfenschacht, fungal hypha (400x; 0,75); (c) *S. vulgaris*, Welfenschacht, fungal spore in a root hair (400x; 0,75); (d) *D. carthusianorum*, Preußenschacht, dark septate endophyte in a root (400x; 0,75).

Im Rahmen des DKA-Screenings wurden folglich 431 von den insgesamt 703 Pilzisolaten auf ihre antifungale Wirkung gegen die phytopathogenen Pilze *Alternaria brassicicola* (Abra), *Botrytis cinerea* (Bcin), *Fusarium culmorum* (Fcul), *Fusarium graminearum* (Fgram), *Rhizoctonia solani* AG2 (AG2) und *Sclerotinia sclerotiorum* (Scsc) sowie gegen die Oomyceten *Phytophthora capsici* Isolat LT1534 (Pcap1) bzw. *Phytophthora capsici* Isolat 213110 (Pcap2) untersucht. Etwa ein Drittel (34 %) der getesteten Endophyten zeigten eine antifungale Wirkung mit unterschiedlich ausgeprägter Wirkungsstärke gegen die im Screening enthaltenen Phytopathogene (Abb. 4(a)). Wirkungen gegen Abra sind dabei am häufigsten zu verzeichnen (55 % Standort 1, Abb. 4(b); 26 % Standort 2, Abb. 4(c)). Im Fall einer Co-Kultivierung mit Fgram können nur wenige Hemmhofbildungen registriert werden (1 % Standort 1, Abb. 4(b); 2 % Standort 2, Abb. 4(c)). Es stellt sich nun die Frage der Reproduzierbarkeit der ermittelten Wirksamkeiten im DKA der EPs über einen längeren Zeitraum ohne Pflanzenwirt. Ein Versuch mit dem Pilzisolat P16.9 (*Aspergillus* sp.), isoliert aus einer Wurzel eines Taubenkropf-Leimkrautes des Preußenschachts (Probenahme Pflanze und EP-Isolation: September 2015), zeigt eindeutig, dass trotz Plattenkultivierung und einer zwischenzeitlichen Lagerung bei -80 °C, die Wirkung erhalten bleibt (s. Abb. 5). Eine Produktion von wirksamen Sekundärmetaboliten durch den EP unabhängig vom Pflanzenwirt ist demzufolge wahrscheinlich. Inwieweit dies auf andere EP zutrifft, muss noch überprüft werden.

Die Anwendung der entwickelten Extraktionsprotokolle zur Herstellung diverser Extrakte aus Kulturbrühe bzw. Myzel führte zur erfolgreichen Generierung von bioaktiven Extrakten mit sehr guter antifungaler und enzyminhibitorischer Wirkung. Zur Überprüfung der antifungalen Wirkung wurde hierbei der Lochtest angewendet. In Abb. 6 sind die Ergebnisse des DKA der EP P29.2 (*Alternaria* sp.) und P17.11 (*Embellisia* sp.) denen des LT gegenübergestellt. Das Pilzisolat P29.2 zeigte im DKA eine sehr gute antagonistische Wirkung sowohl gegen Scsc (Abb. 6(a)) als auch gegen Abra (Abb. 6(b)). Im anschließenden LT kann der methanolische Extrakt des Pilzmyzels, hergestellt aus der Kaefer-Medium-Kultur, eine sehr gute antifungale Wirkung gegen beide phytopathogene Pilze erzielen (Abb. 6(d)+(e)). Im Fall des Pilzisolates P17.11 sind ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen. Auch hier kann die sehr gute antagonistische Wirkung im DKA gegen Scsc (Abb. 6(c)) auf die Extrakt-Wirkung im LT (Abb. 6(f)) übertragen werden.

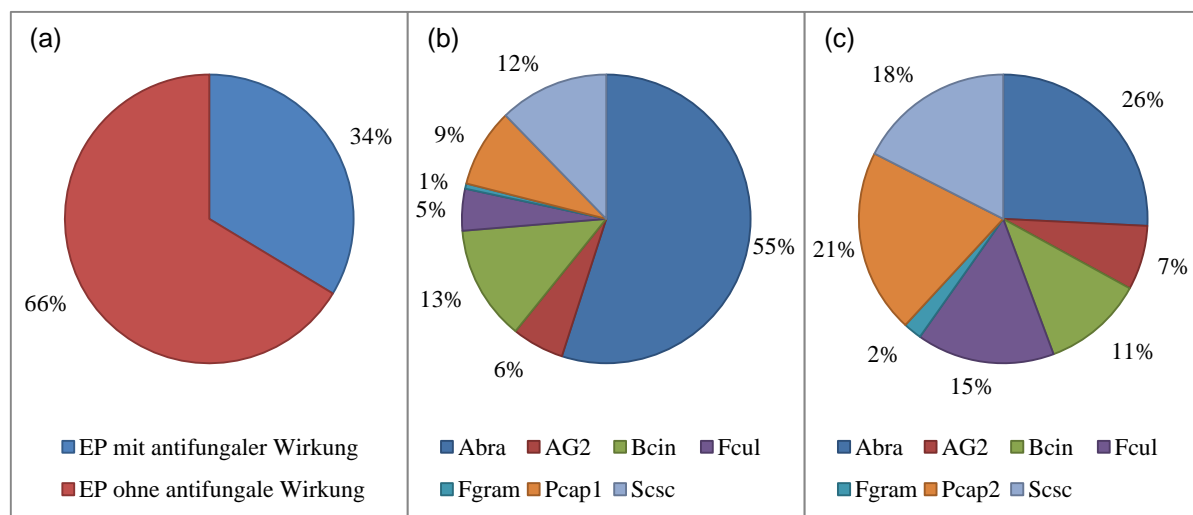


Abb. 4: Antifungale Wirkung isolierter endophytischer Pilze gegenüber phytopathogenen Pilzen und Oomyceten ermittelt via Dualkultur-Assay. (a) Relative Häufigkeit der antifungalen Wirkung in Prozent, EP = endophytische Pilze; (b) Relative Häufigkeit der antifungalen Wirkung Standort 1 in Prozent, Abra = *A. brassicicola*, AG2 = *R. solani*, Bcin = *B. cinerea*, Fcul = *F. culmorum*, Fgram = *F. graminearum*, Pcap1 = *P. capsici* Isolat LT1534, Scsc = *S. sclerotiorum*; (c) Relative Häufigkeit der antifungalen Wirkung Standort 2 in Prozent, Pcap2 = *P. capsici* Isolat 213110.

Fig. 4: Antifungal activity of endophytic fungi against phytopathogenic fungi and oomycetes, detected in dual-culture assay. (a) Relative frequency of fungicidal effects of endophytic fungi, EP = endophytic fungi; (b) Relative frequency of fungicidal effects at site 1 [%], Abra = *A. brassicicola*, AG2 = *R. solani*, Bcin = *B. cinerea*, Fcul = *F. culmorum*, Fgram = *F. graminearum*, Pcap1 = *P. capsici* isolate LT1534, Scsc = *S. sclerotiorum*; C: relative frequency of fungicidal effects at site 2 [%], Pcap2 = *P. capsici* isolate 213110.

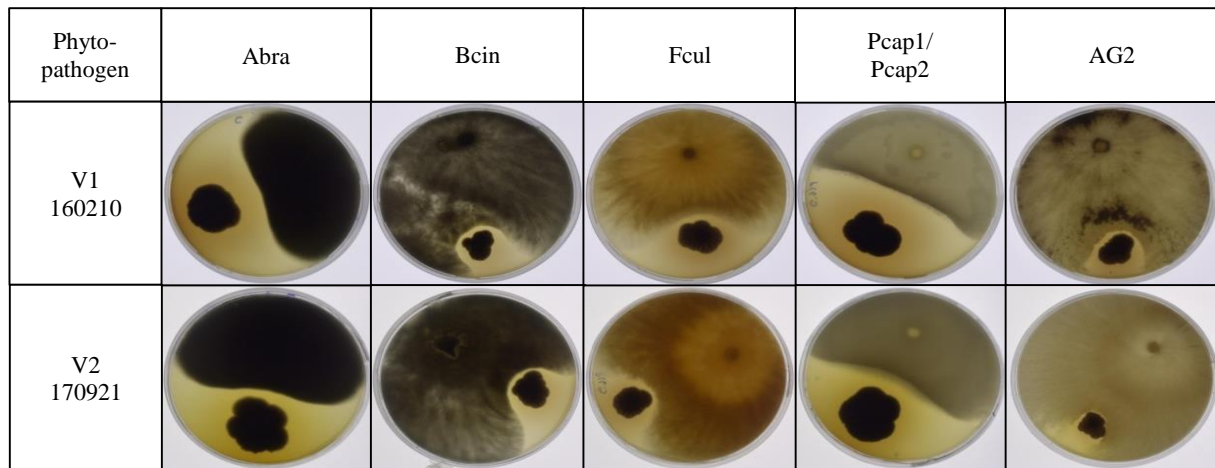


Abb. 5: Vergleich der antagonistischen Wirkung im DKA des Pilzisolates P16.9 (*Aspergillus* sp.) gegen die phytopathogenen Pilze *A. brassicicola* (Abra), *B. cinerea* (Bcin), *F. culmorum* (Fcul) und *R. solani* AG2 (AG2) sowie gegen die Oomyceten *P. capsici* Isolat LT1534 (Pcap1) bzw. *P. capsici* Isolat 213110 (Pcap2) im Versuch 1 (V1) vom 10.02.2016 und Versuch 2 (V2) vom 21.09.2017.

Fig. 5: Comparison of antifungal activity (DKA) of the fungal isolate P16.9 (*Aspergillus* sp.) against the phytopathogens *A. brassicicola* (Abra), *B. cinerea* (Bcin), *F. culmorum* (Fcul), *P. capsici* isolate LT1534 (Pcap1), *P. capsici* isolate 213110 (Pcap2) and *R. solani* AG2 (AG2). Experiment 1 (V1): 2016-02-10, experiment 2 (V2) 2017-09-21.

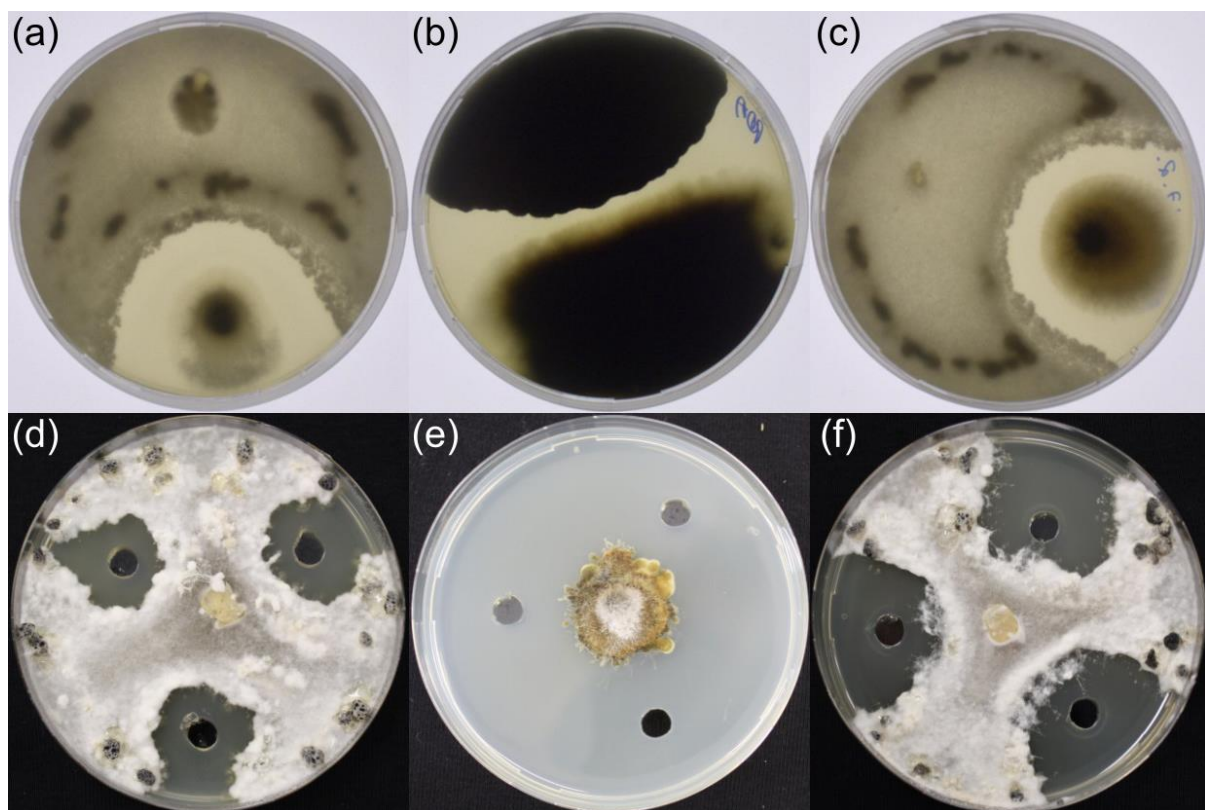


Abb. 6: Vergleich der antifungalen Wirkungen ermittelt im Dualkultur-Assay (DKA; (a)-(c)) und im Lochtest (LT; (d)-(f)). Antagonistische Wirkung des Pilzisolats P29.2 (*Alternaria* sp.) im DKA gegen (a) *S. sclerotiorum* und (b) *A. brassicicola* sowie des Pilzisolats P17.11 (*Embellisia* sp.) gegen (c) *S. sclerotiorum*. Antifungale Wirkung generierter Extrakte im LT: Methanolischer Extrakt des Pilzmyzels von P29.2 (Kultivierung in Käfer-Medium) gegen (d) *S. sclerotiorum* und (e) *A. brassicicola*; Methanolischer Extrakt des Pilzmyzels von P17.11 (Kultivierung in Potato-Dextrose-Medium) gegen (f) *S. sclerotiorum*.

Fig. 6: Comparison of antifungal effects observed in dual-culture assays (DKA; (a)-(c)) and in cavity assays (LT; (d)-(f)). Antagonistic activity in DKA of fungal isolate P29.2 (*Alternaria* sp.) against (a) *S. sclerotiorum* and (b) *A. brassicicola* as well as of fungal isolate P17.11 (*Embellisia* sp.) against (c) *S. sclerotiorum*. Antifungal activity of generated extracts in LT: Methanolic mycelium extract of P29.2 (cultivation in Kaefer media) against *S. sclerotiorum* and *A. brassicicola*; Methanolic mycelium extract of P17.11 (cultivation in potato-dextrose media) against *S. sclerotiorum*.

Zur Herstellung des Extraktes wurde das Myzel einer Potato-Dextrose-Kultur mit Methanol extrahiert. Aufgrund der erst kurzen Laufzeit des Projekts und des großen Probenumfangs, liefen alle Versuche bezüglich der Überprüfung der antifungalen Aktivität generierter Extrakte in Einfachbestimmung. Sie deuten jedoch das hohe Potential der EP in der Produktion aktiver Verbindungen an. Ein Teil der Extrakte konnte auch bereits in photometrischen Sulforhodamin B Assays hinsichtlich möglicher zytotoxischer Aktivitäten untersucht werden. Während die meisten Extrakte keine oder nur sehr geringe Zytotoxizität an bis zu sieben unterschiedlichen humanen Krebszelllinien sowie non-malignen Mausfibroblasten (NIH 3T3) zeigten, erwies sich ein Extrakt als sehr stark zytotoxisch. Die analytische Untersuchung dieses Extrakts ergab, dass es sich dabei um ein Multikomponentengemisch handelt. In weiteren Versuchen wird nun festgestellt, ob eine Einzelsubstanz für die hohe Zytotoxizität verantwortlich ist, oder synergistische Effekte diese Wirkung verursachen. Zukünftig soll die Kultivierung aktiver Pilzisolates hinsichtlich ihrer Biomasse und aktiven Verbindungen biotechnologisch optimiert werden. Hierfür wird unter anderem der Zusatz von Stressfaktoren in den Kultivierungsprozess in Betracht gezogen. Weiterhin besteht die Überlegung, die Screening-Plattform zur Überprüfung der biologischen Aktivität auf antiinflammatorische, antibiotische sowie antivirale Effekte auszubauen.

5. Summary

The aim of the project MetaLine is evaluating bioactive secondary metabolites from endophytic fungi obtained from heavy-metal plant communities for cosmetic, pharmacological and agricultural applications as part of a multi-stage program. Endophytic fungi, invading root tissues of heavy-metal-tolerant plants, have not been studied in biotechnology, but are to be taxonomically identified, functionally characterised and examined for effective secondary metabolites in a targeted biological screening. More than 700 endophytic fungi could be isolated. After a selection based on phenotypical comparisons, nearly 400 isolates were tested for their antifungal activity against seven phytopathogenic fungi and oomycetes using dual-culture assay. One third (34 %) of the tested microorganisms show positive effects; they were then cultivated in three different media followed by extractions. By conducting cavity assays and sulforhodamine B assays, first antifungal and anticarcinogenic extracts were discovered.

4. Literatur

- Ban, Y., Xu, Z., Zhang, H., Chen, H. & Tang, M. (2015): Soil chemistry properties, translocation of heavy metals, and mycorrhizal fungi associated with six plant species growing on lead-zinc mine tailings. *Annals of Microbiology* 65(1), 503–515.
- Ban, Y., Xu, Z., Yang, Y., Zhang, H., Chen, H. & Tang, H. (2017): Effect of Dark Septate Endophytic Fungus *Gaeumannomyces cylindrosporus* on Plant Growth, Photosynthesis and Pb Tolerance of Maize (*Zea mays* L.). *Pedosphere* 27(2): 283–292.
- Baumbach, H. & Schubert, R. (2008): Neue taxonomische Erkenntnisse zu den Charakterarten der Schwermetallvegetation und mögliche Konsequenzen für den Schutz von Schwermetallstandorten. *Feddes Repertorium* 119(5–6): 543–555.
- BMEL (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft) (Hrsg.) (2016): Nationaler Aktionsplan Pflanzenschutz (NAP).
- Deram, A., Languereau-Leman, F., Howsam, M., Petit, D. & Van Haluwyn, C. (2008): Seasonal patterns of cadmium accumulation in *Arrhenatherum elatius* (Poaceae): Influence of mycorrhizal and endophytic fungal colonisation. *Soil Biology and Biochemistry* 40(3): 845–848.
- Ernst, W. (1974): *Schwermetallvegetation der Erde*. Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Gisi, U. & Leadbeater, A. (2010): The Challenge of Chemical Control as Part of Integrated Pest Management. *Journal of Plant Pathology* 92(4): 11–15.
- Glick, B.R. (2014): Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169(1): 30–39.
- Hardoim, P. R., van Overbeek L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. & Sessitsch, A. (2015): The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79(3): 293–320.
- Koske, R. E. & Gemma, J. N. (1989): A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92(4): 486–488.
- Li, H.-Y., Li, D.-W., He, C.-M., Zhou, Z.-P., Mei, T. & Xu, H.-M. (2012): Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb–Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology* 5(3): 309–315.
- Likar, M. & Regvar, M. (2009): Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. *Science of The Total Environment* 407(24): 6179–6187.
- Likar, M. (2011): Dark Septate Endophytes and Mycorrhizal Fungi of Trees Affected by Pollution. In: Pirttilä, A. M. & Frank, A. C. (eds): *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 189–201.
- Martinez-Klimova, E., Rodríguez-Peña, K. & Sánchez, S. (2017): Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology* 134: 1–17.
- Mefteh, F. B., Daoud, A., Chenari Bouket, A., Alenzi, F. N., Luptakova, L., Rateb, M. E., Kadri, A., Gharsallah, N. & Belbahri, L. (2017): Fungal root microbiome from healthy and brittle leaf diseased date palm trees (*Phoenix dactylifera* L.) reveals a hidden untapped arsenal of antibacterial and broad spectrum antifungal secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology* 8(307).
- Regvar, M., Ligar, M., Piltaver, A., Kugonic, N., Smith & J. E. (2010): Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site:

- the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant and Soil* 330(1): 345–356.
- Reimer-Michalski, E.-M. & Conrath, U. (2016): Innate immune memory in plants. *Seminars in Immunology* 28(4): 319–327.
- Yuan, Z., Zhang, C., Lin, F. & Kubicek, C. (2010): Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Applied and environmental microbiology* 76(5): 1642–1652.

Anschriften der Autor(inn)en:

Hummel, Johanna*; **Baltruschat, Helmut**; **Schellenberg, Ingo**: Institute of Bioanalytical Sciences, Center of Lifesciences, Hochschule Anhalt, Strenzfelder Allee 28, D-06406 Bernburg (Saale). E-Mail: johanna.hummel@hs-anhalt.de; helmut.baltruschat@hs-anhalt.de; ingo.schellenberg@hs-anhalt.de.

Csuk, René: Institut für Organische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Kurth-Mothes-Straße 2, D-06120 Halle (Saale). E-Mail: rene.csuk@chemie.uni-halle.de.

*Korrespondierende Autorin