

4547 - 293 6

# **Pilze als Produzenten nematizider und anderer Sekundärmetabolite**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades

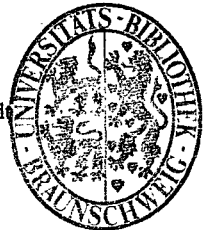
„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte  
DISSERTATION  
(D386)

vorgelegt von

**Bärbel Köpcke**

Vorsitzender:	Prof. Dr. B. Büdel
1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. H. Anke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. J. Schmidt



Tag der wissenschaftlichen Aussprache

9. November 1999

Kaiserslautern 1999

1.	<b>Einleitung</b>	1
2.	<b>Material und Methoden</b>	9
2.1.	<b>Chemikalien</b>	9
2.2.	<b>Medien, Puffer und Lösungen</b>	11
2.2.1.	Nährmedien für Pilze und Bakterien	11
2.2.2.	Medien zur Kultivierung von Nematoden	12
2.2.3.	Medien für Zellkulturen	13
2.2.4.	Puffer und Lösungen	13
2.3.	<b>Organismen</b>	14
2.3.1.	Bearbeitete Pilzstämmе	14
2.3.2.	Testorganismen für die biologische Charakterisierung	15
2.3.2.1.	Bakterien und Pilze	15
2.3.2.2.	Nematoden	15
2.3.2.3.	Zelllinien	16
2.3.2.4.	Pflanzen	16
2.3.2.5.	Insekten	16
2.4.	<b>Kultivierung von Nematoden</b>	17
2.4.1.	Sterile Kultivierung von <i>Meloidogyne incognita</i> und Gewinnung der L2-Larven (nach MAYER et al., 1996)	17
2.4.2.	Sterile Kultivierung von <i>Caenorhabditis elegans</i> (nach SULSTON & HODGKIN, 1988)	17
2.5.	<b>Screening nach Pilzen mit nematizider Wirkung</b>	18
2.5.1.	Gewinnung von Rohextrakten für das Screening	18
2.5.2.	Screening nach nematiziden Wirkstoffen	19
2.5.3.	Untersuchungen zum Einsatz von Pilzen zur biologischen Bekämpfung von Nematoden	19
2.5.3.1.	Vergleich des Metabolitenspektrums in Schüttelkultur und im Körnerbrutpulver	19
2.5.3.2.	Wasseragartest (Antagonistentest)	20
2.5.3.3.	Modifizierter Wasseragartest	20
2.6.	<b>Kultivierung der Pilze in Submerskultur</b>	21
2.6.1.	Fermentation der im Screening aufgefallenen Pilzstämmе in Schüttelkultur	21
2.6.2.	Fermentation von Stämmen mit nematizider Aktivität und Herstellung von Rohextrakten für die Aufreinigung	21
2.6.3.	Fermentationsanalysen	23
2.6.3.1.	pH-Wert	23
2.6.3.2.	Enzymatische Bestimmung des Glucose- und Maltosegehaltes	23
2.6.3.3.	Mycelrockengewicht	24
2.6.3.4.	Abgasanalytik	24
2.6.3.5.	Bestimmung der biologischen Aktivität	24
2.6.3.6.	Wirkstoffbestimmung mittels analytischer HPLC	24
2.6.4.	Medienversuch	25
2.6.5.	Taxonomischer Vergleich verschiedener <i>Lycoperdon</i> -Stämme	25

<b>2.7.</b>	<b>Methoden zur Reinigung und physikalisch-chemischen Charakterisierung der Sekundärmetabolite</b>	<b>26</b>
2.7.1.	Chromatographie-Methoden	26
2.7.2.	Dünnschichtchromatographie	27
2.7.3.	HPLC-Analytik	29
2.7.4.	Spektroskopie	29
2.7.5.	Saure Hydrolyse zur qualitativen Feststellung der Aminosäurezusammensetzung von isolierten Verbindungen	30
2.7.6.	Aminosäureanalytik mittels Vorsäulenderivatisierung mit OPA und FMOC	30
2.7.7.	Aminosäureanalytik mittels Derivatisierung mit Marfey's Reagenz (MR)	31
2.7.8.	GC/MS-Messungen	32
<b>2.8.</b>	<b>Biologische Charakterisierung</b>	<b>33</b>
2.8.1.	Mikrotiterplattentest	33
2.8.2.	Migrationstest (Sephadextest)	34
2.8.3.	Nematizidtest an Gurkenkeimlingen	34
2.8.4.	Agardiffusionstest	34
2.8.5.	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration im Reihenverdünnungstest (MIK)	35
2.8.6.	Cytotoxizitätstest	36
2.8.6.1.	Suspensionskulturen (HL-60, L1210)	36
2.8.6.2.	Monolayerkulturen (HeLa S3, COS7)	36
2.8.7.	Einbau radioaktiver Vorstufen in säurefällbares Material <i>in vivo</i>	37
2.8.8.	Mutagenitätstest nach AMES	38
2.8.9.	Pflanzenkeimungstest	38
2.8.10.	Hämolysetest	38
2.8.11.	Reaktion mit L-Cystein	39
2.8.12.	Tests auf insektizide Aktivität	39
2.8.13.	NBT-Differenzierungstest	40
2.8.14.	Hemmung der Thrombocytenaggregation	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>3.1.</b>	<b>Screening und Auswahl der Produzentenstämme für die weitere Bearbeitung</b>	<b>41</b>
<b>3.2.</b>	<b>Untersuchungsergebnisse des Wasseragartests</b>	<b>43</b>
<b>3.3.</b>	<b>Vergleich der nematiziden Aktivität und der gebildeten Sekundärmetabolite von Schüttelkultur- und Körnerbrutpulverextrakten</b>	<b>45</b>
<b>3.4.</b>	<b>Nematizide Verbindungen aus höheren Pilzen</b>	<b>47</b>
3.4.1.	Suche nach nematiziden Wirkstoffen aus dem Basidiomyceten TA 90009	47
3.4.1.1.	Produzentenstamm TA 90009	47
3.4.1.2.	Kultivierung von TA 90009 in Submerskultur	47
3.4.1.3.	Kultivierung von TA 90009 in verschiedenen Medien	49
3.4.1.4.	Reinigung der nematiziden Wirkstoffe aus TA 90009	50
3.4.1.5.	Untersuchungen mit angereinigten aktiven Fraktionen	52
3.4.1.5.1.	Aminosäurezusammensetzung von aktiven Fraktionen	52
3.4.1.5.2.	Dünnschichtchromatographie	56
3.4.1.6.	Vorläufige biologische Charakterisierung angereinigter nematizider Fraktionen aus TA 90009	57
3.4.1.6.1.	Nematizide Aktivität im Mikrotiterplattentest	57

3.4.1.6.2.	Antimikrobielle Aktivität	57
3.4.1.6.3.	Cytotoxizitätstest	57
3.4.2.	Sekundärmetabolite aus dem Ascomyceten A111-95	59
3.4.2.1.	Produzentenstamm A111-95	59
3.4.2.2.	Fermentation von A111-95	59
3.4.2.3.	Reinigungsschema der Sekundärmetabolite aus A111-95	61
3.4.2.4.	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Sekundärmetabolite aus dem Ascomyceten A111-95	62
3.4.2.5.	Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung des Substanzgemisches 4A/4B	75
3.4.2.6.	Biologische Charakterisierung der aus A111-95 isolierten Verbindungen	77
3.4.2.6.1.	Test auf nematizide Aktivität	77
3.4.2.6.2.	Migrationstest	78
3.4.2.6.3.	Antimikrobielle Wirkung	78
3.4.2.6.4.	Cytotoxizitätstest	79
3.4.2.6.5.	Einfluß auf die Makromolekülsynthese <i>in vitro</i>	80
3.4.2.6.6.	Einfluß auf die Samenkeimung von Pflanzen	80
3.4.2.6.7.	Reaktion mit L-Cystein	81
3.4.2.6.8.	Insektizide Aktivität	82
3.4.2.6.9.	NBT-Differenzierungstest	82
3.4.2.6.10.	Weitere biologische Testsysteme	83
3.4.3.	Sekundärmetabolite aus dem Basidiomyceten <i>Lycoperdon pyriforme</i> 79131	83
3.4.3.1.	Produzentenstamm <i>Lycoperdon pyriforme</i> 79131	83
3.4.3.2.	Fermentation von <i>Lycoperdon pyriforme</i> 79131	84
3.4.3.3.	Reinigung der Sekundärmetabolite aus <i>L. pyriforme</i> 79131	85
3.4.3.4.	Physikalisch-chemische Charakterisierung der aus <i>L. pyriforme</i> 79131 isolierten Verbindungen	86
3.4.3.5.	Biologische Charakterisierung der aus <i>L. pyriforme</i> 79131 isolierten Verbindungen	96
3.4.3.5.1.	Test auf nematizide Aktivität	96
3.4.3.5.2.	Nematizidtest an Gurkenkeimlingen	97
3.4.3.5.3.	Migrationstest	98
3.4.3.5.4.	Antimikrobielle Wirkung	98
3.4.3.5.5.	Cytotoxizitätstest	100
3.4.3.5.6.	Ames-Test auf mutagene Eigenschaften	101
3.4.3.5.7.	Einfluß auf die Samenkeimung von Pflanzen	101
3.4.3.5.8.	Insektizide Wirkung	102
3.4.3.5.9.	Reaktion mit L-Cystein	102
3.4.3.5.10.	Weitere biologische Testsysteme	102
3.4.3.6.	Taxonomischer Vergleich von Pilzen der Gattung <i>Lycoperdon</i> bezüglich der produzierten Sekundärmetabolite	103
3.4.4.	Nematizide Verbindungen aus dem Basidiomyceten <i>Oudemansiella badia</i> 82088	104
3.4.4.1.	Produzentenstamm <i>Oudemansiella badia</i> 82088	104
3.4.4.2.	Fermentation von <i>Oudemansiella badia</i> 82088	104
3.4.4.3.	Reinigung von Dekansäure aus dem Mycelextrakt von <i>Oudemansiella badia</i> 82088	105
3.4.4.4.	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Dekansäure	106
3.4.4.5.	Biologische Charakterisierung der Dekansäure	106
3.4.4.5.1.	Test auf nematizide Aktivität	107

3.4.4.5.2.	Migrationstest	108
3.4.4.6.	Vergleich der nematiziden Aktivität von Fettsäuren	108
3.4.5.	Der Deuteromycet SE14-93 als Produzent nematizider Verbindungen	110
3.4.5.1.	Produktionsstamm <i>Penicillium</i> sp. SE14-93	110
3.4.5.2.	Fermentation von <i>Penicillium</i> sp. SE14-93	110
3.4.5.3.	Isolierung der nematiziden Verbindung aus <i>Penicillium</i> sp. SE14-93	110
3.4.5.4.	Physikalisch-chemische Charakterisierung von Citrinin	111
3.4.5.5.	Biologische Charakterisierung von Citrinin	112
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113</b>
<b>4.1.</b>	<b>Screeningergebnisse</b>	<b>114</b>
4.1.1.	Screening nach Pilzen, die nematizide Naturstoffe bilden	114
4.1.2.	Vergleich der nematiziden Aktivitäten der Screeningextrakte in verschiedenen Testsystemen	115
4.1.3.	Screening nach antagonistischen Pilzen	116
4.1.4.	Vergleich des Sekundärmetabolismus in Submerskultur und auf anderen Medien	117
<b>4.2.</b>	<b>Einsatz von <i>Lycoperdon pyriforme</i> 79131 als Biokontrollorganismus</b>	<b>118</b>
<b>4.3.</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung nematizider Verbindungen</b>	<b>118</b>
4.3.1.	Nematizide Verbindungen aus dem Basidiomyceten TA 90009	118
4.3.2.	Untersuchungen des Sekundärmetabolismus von A111-95	121
4.3.3.	Untersuchungen des Sekundärmetabolismus von <i>Lycoperdon pyriforme</i> 79131	127
4.3.4.	Nematizide Verbindungen aus <i>Oudemansiella badia</i> 82088	133
4.3.5.	Citrinin, ein nematizider Sekundärmetabolit aus <i>Penicillium</i> sp. SE14-93	136
<b>4.4.</b>	<b>Schlußbetrachtung</b>	<b>137</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>139</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>141</b>
<b>6.1.</b>	<b>Weitere Testsysteme</b>	<b>141</b>
6.1.1.	Durchführung des nematiziden <i>in vitro</i> -Tests	141
6.1.2.	<i>In vivo</i> -Test an Gurkenpflanzen	141
<b>6.2.</b>	<b>Weitere Testergebnisse</b>	<b>142</b>
6.2.1.	Ergebnisse des <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Tests der Screeningextrakte	142
6.2.2.	Nematizide Aktivität von angereinigten Fraktionen von TA 90009 im <i>in vivo</i> -Test an Gurkenpflanzen	142
6.2.3.	Nematizide Wirkung im <i>in vivo</i> -Test an Gurkenpflanzen der Verbindung 4-Methoxybenzol-1-ONN-azoxyformamid	142
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>144</b>