Universität Leipzig
Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

Diplomarbeit

Diversität, vertikale Verteilung und saisonale Aspekte von blattbewohnenden endophytischen Pilzen im Kronenraum des Leipziger-Auwaldkran Untersuchungsgebietes

vorgelegt von

Almut Reiher
geb. am 04. Februar 1981 in Erfurt
Studentin im Diplomstudiengang Biologie

Leipzig, den 23. Juni 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **III**

1 Einleitung **1**
1.1 Endophytische Pilze . . . 1
1.1.1 Endophyten - eine Begriffsbestimmung . . . 2
1.1.2 Die Evolution endophytischer Pilze . . . 3
1.1.3 Ökologische Bedeutung endophytischer Pilze . . . 3
1.1.4 Taxonomie, Diversität und Verbreitung . . . 5
1.2 Isolation, Kultur und Bestimmung endophytischer Pilze . . . 10
1.3 Kronendachforschung . . . 11
1.4 Hypothesen und Zielsetzung . . . 12

2 Das Untersuchungsgebiet im Leipziger Auwald **14**
2.1 Auwälder . . . 14
2.2 Der Leipziger Auwald und das NSG Burgaue . . . 15
2.3 Der Leipziger Auwaldkran . . . 17

3 Material und Methoden **21**
3.1 Probennahme im LAK-Plot . . . 21
3.2 Bestimmung von Lichtexposition und Blattgröße . . . 22
3.3 Isolation endophytischer Pilze . . . 23
3.4 Morphogruppenbildung und morphologische Bestimmung . . . 24
3.5 Sequenzierung . . . 25
3.5.1 DNA-Isolierung . . . 25
3.5.2 PCR Amplifikation der D1/D2 variablen Region . . . 26
3.5.3 DNA Sequenzierung . . . 27
3.6 Sequenzanalyse . . . 28
3.7 Analyse von α- und β-Diversität . . . 31

4 Ergebnisse **33**
4.1 Allgemeine Beobachtungen . . . 33
4.2 Identifikation der Arten . . . 34
4.2.1 Morphologische Bestimmung . . . 34
4.2.2 Taxonomische Einordnung der Morphospezies mit Maximum Parsimonie Analysen . . . 35
4.2.3 Resultierende Artenliste . . . 46
4.3 Artenakkumulationskurven und Schätzwerte der Artenvielfalt . . . 47
4.4 Ergebnisse der Analysen mit multivariater Statistik . . . 50

4.4.1 NMS und DCA 50
4.4.2 Clusteranalyse 55
4.5 Zeitliche und räumliche Muster in der Verteilung der Arten 55

5 Diskussion 59
5.1 Die angewendeten Methoden und ihre Grenzen 59
5.1.1 Isolation der endophytischen Pilze 59
5.1.2 Morphologische Bestimmung 62
5.1.3 Phylogenetische Untersuchung 62
5.1.4 Artenakkumulationskurven und Abschätzung der Artenvielfalt 64
5.1.5 Multivariate Statistik 65
5.2 Platzierung der Arten im phylogenetischen Stammbaum 66
5.3 Häufigkeit der Arten 69
5.4 Einfluss der Lichtintensität auf die räumliche Verteilung der Endophyten 71
5.5 Wirtsspezifität der Endophyten 72
5.6 Vergleich der Endophytenflora im Frühjahr und im Herbst 73
5.7 Ausblick 75

6 Zusammenfassung 77

7 Literaturverzeichnis 79

8 Anhang 85
8.1 Rezept für Malzextraktagar (MEA) 85
8.2 Übersicht über die Merkmale der Morphospezies 85

Danksagung 92

Eigenständigkeitserklärung 93

Abkürzungsverzeichnis

ACE	-	Abundance-based Coverage Estimator (Verfahren zum Abschätzen der Diversität)
CA	-	Correspondence Analysis (Ordinationsverfahren)
CTAB	-	Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid
BLAST	-	Basic Local Alignment Search Tool (Programm zur Suche in der Datenbank GenBank)
bp	-	Basenpaare
DBH	-	Diameter Breast Height (Stammdurchmesser in Brusthöhe)
DCA	-	Detrended Correspondence Analysis (Ordinationsverfahren)
ddH_2O	-	doppelt destilliertes Wasser
DNA	-	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EtOH	-	Ethanol
EDTA	-	Ethyl-Diamin-Tetraacetat
HPLC	-	High Performence Liquid Chromatography
ICE	-	Incidence-based Coverage Estimator (Verfahren zum Abschätzen der Diversität)
ITS	-	Internal Transcribed Spacer (Region der DNA der LSU)
LAK	-	Leipziger Auwaldkran
LSU	-	Large Subunit (große ribosomale Untereinheit)
MEA	-	Malzextraktagar (Rezept s. Anhang)
Mg	-	Magnesium
$MgCl_2$	-	Magnesiumchlorid
MS	-	Morphospezies
NCBI	-	National Centre for Biotechnology Information, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)
NMS	-	Nonmetric Multidimensional Scaling (Ordinationsverfahren)
NSG	-	Naturschutzgebiet
PCR	-	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
rDNA	-	ribosomale DNA
RubisCO	-	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
TAE	-	Tris-Acetat-EDTA
TBR	-	Tree Bisection Reconnection (Verfahren zur Veränderung phylogenetischer Bäume)
UV	-	Ultraviolett

1 Einleitung

Erst in den letzten drei Jahrzehnten ist die Gesamtheit der Baumkronen eines Waldes als ökologisches System ins Blickfeld der Forscher gerückt. Auch wenn noch viele Fragen offen sind, ist ihre große Bedeutung für die Biodiversität der Erde und globale Prozesse wie Wasserhaushalt und Klima erkannt worden. Die Bedeutung von endophytischen Pilzen für den Lebensraum Baumkrone wurde bisher wenig untersucht. Studien über die Interaktionen von Endophyten mit ihren Wirtsbäumen und deren Herbivoren geben einen ersten Einblick in ihren Artenreichtum und ihre ökologische Bedeutung. Die vorliegende Diplomarbeit befasst sich mit der Artenvielfalt sowie der α- und β-Diversität endophytischer Pilze in einem mitteleuropäischen sommergrünen Laubmischwald.

1.1 Endophytische Pilze

Obwohl sie in allen Pflanzengruppen von Moosen und Farnen über Gymnosperme bis zu Angiospermen und in allen Klimazonen von den Polen bis zu den Wüsten vorkommen (Stone et al. 2004), ist bisher wenig über die Vielfalt von endophytischen Pilzen und Interaktionen mit ihren Wirten bekannt. In nahezu allen untersuchten Pflanzenarten wurden endophytische Pilze gefunden, jedoch behandelten etwa 75% der Veröffentlichungen zu diesem Thema Endophyten in Poaceen (Saikkonen et al. 1998). Diese sind von besonderem Interesse, da sie durch die Produktion von Toxinen (z. B. Alkaloiden) schwere Erkrankungen der Weidetiere und damit hohe wirtschaftliche Schäden hervorrufen können (Clay 1988). Andererseits können sie durch die Schädigung von Insekten die Ernteerträge wichtiger Nutzpflanzen erhöhen. Nur 17% der Untersuchungen beschäftigten sich mit anderen Pflanzen, vor allem mit Gehölzen (Saikkonen et al. 1998). Häufig wurden dabei die Interaktio-

nen einzelner Pilzarten mit dem Wirt und dessen Herbivoren bzw. Gallenbildnern (z. B. Pehl & Butin 1994, Faeth & Hammon 1996, 1997 a/b) sowie Ausbreitungstypen (z. B. Carroll 1988, Wilson & Carroll 1994), die räumliche (u. a. Wilson & Carroll 1994) und die zeitliche (z. B. Wilson & Carroll 1994, Faeth & Hammon 1997 a) Verteilung von Endophyten im Wirt untersucht. Nur wenige Arbeiten befassten sich mit der Diversität und Artenvielfalt endophytischer Pilze (u. a. Santamaria & Bayman 2005).

1.1.1 Endophyten - eine Begriffsbestimmung

Der Begriff Endophyt tauchte zum ersten Mal 1866 bei De Barry (zitiert bei Wilson 1995) auf und wurde seitdem in der Literatur vielfach verwendet. Allerdings gehen die Meinungen über seine Bedeutung auseinander. Ursprünglich wurden alle Organismen, die inter- oder intrazellular in Pflanzen leben als Endophyten bezeichnet. Da mit dieser Definition jedoch auch parasitische und pathogene Lebensformen erfasst werden, ist der Begriff in dieser Abgrenzung nicht sehr nützlich.

Wesentlich enger gefasst und allgemein anerkannt ist die Definition nach Wilson (1995), die auch für diese Arbeit die Grundlage bilden soll. Danach sind Endophyten Pilze oder Bakterien, die ihren Lebenszyklus oder zumindest einen Teil desselben in pflanzlichen Geweben verbringen und dort Infektionen hervorrufen, ohne jedoch Krankheitssymptome zu verursachen. Eingeschlossen in diese Definition sind demnach auch pathogene Pilze, die vor dem Ausbruch der Erkrankung einige Zeit latent in den Geweben verbringen, sowie Pilze, die als Pathogene bekannt sind, jedoch z. B. aufgrund von Mutationen keine Krankheitssymptome verursachen. Mykorrhizapilze werden aufgrund ihrer Besonderheiten ausgeschlossen. Bei dieser Definition wird deutlich, dass Endophyten ökologisch, also über ihre Lebensweise definiert werden. Es ist nicht immer möglich, einzelne Pilzarten in die Gruppe der Endophyten eindeutig einzuschließen oder auszugrenzen, da sich die Lebensweise innerhalb des Lebenszyklus einer Pilzart von mutualistisch bis hin zu parasitisch ändern kann und die Übergänge oft fließend sind.

In der vorliegenden Arbeit werden endophytisch lebende Bakterien, obwohl artenreich und sicherlich ökologisch bedeutsam, nicht berücksichtigt.

1.1.2 Die Evolution endophytischer Pilze

Oft wird angenommen, dass sich der Mutualismus zwischen endophytischen Pilzen und ihrem Wirt aus antagonistischen, insbesondere aus parasitischen Lebensformen entwickelt hat (u. a. Clay 1988). Dafür spricht, dass manche Endophyten in Gräsern und Gehölzen nahe verwandt sind mit Pathogenen. Sie könnten sich daraus durch eine Verlängerung der Latenzzeit und eine Reduktion der Virulenz entwickelt haben. Der Vorteil für den Pilz wäre eine gute Nährstoffversorgung. Saprobiontische Pilze hätten außerdem einen Konkurrenzvorteil, da sie die Blätter schon besiedelt haben, bevor diese absterben und damit früher als andere Arten mit der Zersetzung beginnen können (siehe Kapitel 1.1.3). Die Pflanze wiederum hätte den Vorteil, dass Alkaloide, die der Pilz produziert, sie vor Herbivoren schützen. Hauptursache für die Entwicklung, so vermutete Carroll (1988), ist die lange Lebensdauer von Gehölzen. Mutationen treten vor allem während der Meiose oder als somatische Mutationen auf. Sie bieten die Möglichkeit zur Anpassung der Produktion von Sekundärmetaboliten an die Entwicklung von Herbivoren. Da Gehölze mit bis zu mehreren hundert Jahren Lebensdauer einen sehr langen Lebenszyklus haben, kann eine Evolution durch Mutationen nur begrenzten Schutz gegen Fressfeinde mit ihrem häufig sehr kurzen, nur Wochen oder Monate dauernden Lebenszyklus bieten. Endophytische Pilze besitzen mit ihrem kurzen Lebenszyklus eine höhere Anpassungsfähigkeit als ihre Wirtspflanzen. Durch die Anpassung der Produktion von Toxinen durch die Endophyten erhöht sich auch die Abwehrfähigkeit langlebiger Gehölze gegen Herbivoren.

1.1.3 Ökologische Bedeutung endophytischer Pilze

Endophytische Pilze interagieren auf vielfältige Weise mit ihrer Umwelt. Vor allem Interaktionen von Endophyten mit den Herbivoren ihres Wirtes wurden häufig untersucht, da sie von land- und forstwirtschaftlichem Interesse sind. Aber auch direkte Einflüsse des Endophyten auf den Wirt, z. B. auf die Blattseneszenz bei Gehölzen und die Versorgung mit Nährstoffen sind bekannt.

Sehr komplex und schwierig zu erfassen sind Interaktionen von Endophyten untereinander. Untersuchungen von Kassen & Rainey (2004) an Mikroorganismen

zeigten, dass die Einflüsse von Arten, die die gleiche ökologische Nische besiedeln, aufeinander durch Konkurrenz um Ressourcen, produzierte Stoffe wie Abbauprodukte und Toxine und nicht zuletzt durch Prädatoren sehr vielfältig sein können. Ähnlich komplex ist die Situation vermutlich bei Endophyten, weshalb Studien über die Interaktionen von Endophyten untereinander schwierig zu bewerkstelligen sind.

Interaktionen zwischen Endophyten, Holzpflanzen und Herbivoren

Bei Gehölzen kann häufig ein negativer Effekt des Endophyten auf Schädlinge nachgewiesen werden. Die Wirte profitieren von Mykotoxinen, die der Endophyt gegen andere Pilze und Herbivoren produziert. Oft werden Minierer und Gallenbildner geschädigt, da deren Lebenszyklus eng mit dem Stoffwechsel des Wirtes verbunden ist. So fand beispielsweise Carroll (1988) einen negativen Effekt des Endophyten *Rhabdocline parkeri*, der Douglasfichten (*Pseudotsuga menziesii*) infiziert, auf Gallmückenarten der Gattung *Contrarinia* und vermutete Mykotoxine als Ursache dafür, da der Pilz die Gallen selbst nicht infizierte. Faeth & Hammon (1997 b) beobachteten einen indirekten Einfluss von Endophyten auf die Gallmücke *Cameraria* sp.. Endophyten der Gattung *Plectophomella* und eine Hefe töteten die Larven von *Cameraria* zwar nicht, verzögerten jedoch deren Entwicklung. Beim Laubfall war eine größere Anzahl Larven nicht fertig verpuppt. Sie starben am Boden durch Austrocknung ab oder wurden gefressen.

Allerdings kann ein negativer Effekt von Gehölzendophyten auf Herbivoren nicht verallgemeinert werden. Auch neutrale Beziehungen können auftreten (u. a. Faeth & Hammon 1996, 1997 a). Es kommt sogar vor, dass das Wachstum von Insekten durch Endophyten gefördert wird. Gange (1996) beschrieb z. B. einen positiven Effekt von *Rhytisma acerinum* auf die Blattlausarten *Drepanosiphum platanoidis* und *Periphyllus acericola* und nahm als Ursache den höheren Gehalt an löslichen Nährstoffen in infizierten Blätter an.

Der Einfluss von endophytischen Pilzen auf die Blattseneszenz

Eine starke Infektion mit Endophyten scheint eine vorzeitige Seneszenz von Blättern auszulösen. Experimente von Wilson (1993) mit infizierten und nicht infizierten

Blattstücken ließen vermuten, dass Endophyten mitverantwortlich für die Seneszenz und anschließende Zersetzung von Blättern waren. Wilson & Faeth (2001) bestätigten diese Vermutung und erklärten damit auch eine erhöhte Sterblichkeit der Larven von *Cameraria* sp. in infizierten Blättern. Infizierte Blätter fielen zeitiger ab und die Entwicklung der Larven war daher zum Zeitpunkt des Laubfalls noch nicht vollständig abgeschlossen.

Die Kosten für den Wirt sind bei nicht systemischen Infektionen gering, da der Pilz im Vergleich zur systemischen Infektion eine geringe Biomasse bezogen auf die Gesamtmasse des Wirtes besitzt. Allerdings können sich die indirekten Verluste durch den vorzeitigen Laubabwurf und damit den vorzeitigen Verlust photosynthetisch aktiver Gewebe über die Lebensspanne des Wirtes akkumulieren (Saikkonen et al. 1998).

1.1.4 Taxonomie, Diversität und Verbreitung

Taxonomische Einordnung und Wirtsspezifität endophytischer Pilze

In Gräsern sind endophytische Pilze, soweit bisher bekannt, auf die Clavicipitales (Ascomycetes) beschränkt. Sie sind dabei zum großen Teil wirtsspezifisch. So treten z. B. die Arten der Gattung *Neotyphodium* und ihrer Teleomorphe *Epichloë* fast ausschließlich bei den Pooidae auf und bilden dort oft genetisch verschiedene Stämme innerhalb eng verwandter Wirte aus (Schardl et al. 1997).

Auch die meisten endophytischen Pilze der holzigen Pflanzen gehören zu den Ascomycetes. Es treten jedoch auch Vertreter der Basidiomycetes, Deuteromycetes und Oomycota auf (Saikkonen et al. 1998). Die größere Diversität der Endophyten in Gehölzen kann durch verschiedene Faktoren erklärt werden. Die taxonomische Vielfalt der Wirte ist deutlich größer als bei Gräsern, wodurch es große Unterschiede z. B. bei pflanzlichen Inhaltsstoffen, wie Terpenen, Alkaloiden und Phenolen gibt, an die sich verschiedene Endophytenarten angepasst haben. Außerdem gibt es in Gehölzen mehr unterschiedliche Gewebetypen, die verschiedenen Pilzen als Lebensraum dienen können. Die Tatsache, dass Gehölzendophyten horizontal verbreitet werden (s. u.) trägt ebenfalls zu einer höheren Artenvielfalt bei. Obwohl einige Endophytengattungen in vielen Wirtsarten vorkommen, auch so wenig verwandten wie

Farnen und Mangroven (Petrini et al. 1992), sind die meisten Endophytenarten auch in Gehölzen vermutlich wirtsspezifisch (Petrini 1991).

Infektions- und Ausbreitungstypen

Es gibt für Endophyten zwei unterschiedliche Wege, sich im Wirt auszubreiten und damit verbunden auch zwei Arten, neue Wirtspflanzen zu infizieren. Endophyten in Gräsern rufen meist systemische Infektionen hervor. Dabei kann allerdings die Pilzbiomasse ungleichmäßig über die Pflanze verteilt sein. Aus solchen systemischen Infektionen geht gewöhnlich eine vertikale Ausbreitung des Pilzes hervor. Pilzhyphen wachsen in die Samen ein und die nächste Generation des Wirtes wird schon auf der Mutterpflanze mit dem Endophyten infiziert. Auch über Klone des Wirtes, wie z. B. Ausläufer oder Ableger kann der Endophyt asexuell mit ausgebreitet werden (Carroll 1988).

Im Gegensatz dazu treten bei Holzpflanzen in der Regel lokale durch Pilze verursachte Infektionen auf (Carroll 1988). Sie können sich z. B. bei Alterung und Seneszenz von Geweben stark ausbreiten. Es ist jedoch noch zu wenig bekannt, um sagen zu können, dass Endophyten in Gehölzen niemals systemische Infektionen hervorrufen. Es gibt vereinzelt in der Literatur Funde von Endophyten in Samen von anderen Pflanzen als Gräsern. Unter anderem stellte Bose (1947 in Stone et al. 2004) fest, dass Hyphen von *Phomopsis casuarinae* jedes Gewebe, auch die Samenhülle von *Casuarina equisetifolia* durchdrangen.

Da bei einer lokalen Infektion der Pilz nicht in den Samen hineinwächst, findet die Übertragung auf neue Wirtspflanzen horizontal statt. Dabei war die Verbreitung der Sporen einiger Endophyten nach Faeth & Hammon (1997 a) mit den Regenzeiten gekoppelt. Dies bestätigt die Vermutung von Carroll (1988), dass die großen Mengen schleimiger Konidien die manche Endophyten produzieren für eine Verbreitung der Sporen durch Regen sprechen. Die Konidien werden gewöhnlich auf den toten, herabgefallenen Blättern oder Ästen gebildet. So können besonders die am Boden wachsenden Keimlinge leicht infiziert werden, wie Wilson & Carroll (1994) am Beispiel von *Discula quercina* Infektionen bei *Quercus garryana*-Keimlingen belegten.

Der Übertragungsweg des Endophyten auf die Wirtspflanze könnte für den Grad von Antagonismus oder Mutualismus von Bedeutung sein. Beispielsweise verhält sich *Epichloë* bei horizontaler Übertragung eher antagonistisch, bei vertikaler Übertragung durch einwachsen der Pilzhyphen in den Samen eher mutualistisch. Endophyten, die vertikal verbreitet werden, sind in ihrer Reproduktion und somit in ihrer Fitness eng mit dem Wirt verknüpft. Eine antagonistische Lebensweise würde daher nicht nur dem Wirt, sondern auch dem Pilz schaden. Endophyten, die über Sporen verbreitet werden sind dagegen in ihrer Ausbreitung vom Wirt unabhängig, weshalb keine bevorzugte Evolution mutualistischer Partner stattgefunden hat (Schardl et al. 1997).

Akkumulation blattbewohnender Endophyten im Verlauf einer Vegetationsperiode

Bei horizontal durch Sporen verbreiteten Endophyten kommt es mit zunehmendem Alter der Blätter zu einer Akkumulation von Endophyteninfektionen im Blatt. Wie stark diese Akkumulation ist, hängt vor allem von der Anzahl der Sporenquellen in der Umgebung, aber auch vom Wetter, von Schäden am Blatt z. B. durch Herbivoren, von der Beschaffenheit der Blattoberfläche (Allen et al. 1991) und vom Gesundheitszustand des Wirtes ab. Sporenquellen können z. B. ältere infizierte Blätter an der gleichen Pflanze oder an anderen benachbarten Pflanzen sowie die Laubstreu am Boden sein. Das Wachstum und die Entwicklung der Sporen ist vor allem vom Klima abhängig.

Die Akkumulation erfolgt bei einjährigen Pflanzen und laubabwerfenden Bäumen im Jahresverlauf, bei ausdauernden und immergrünen Pflanzen mit zunehmendem Alter der Blätter über mehrere Jahre. So stieg z. B. bei *Quercus emoryi* die Zahl der Infektionen pro Blatt nach dem Neuaustrieb im Frühjahr im Jahresverlauf an. Blätter die den Winter überdauert hatten, hatten bereits im Frühjahr eine hohe Infektionsrate und waren deutlich stärker infiziert als die Blätter des Neuaustriebes (Faeth & Hammon 1997 a). Die Infektionsraten einzelner Endophytenarten müssen nicht zwangsläufig über den gesamten Zeitraum ansteigen. Wilson & Carroll (1994) beobachteten bei der Infektion von *Quercus garryana* mit dem Endo-

phyten *Discula quercina* einen starken Anstieg der Infektionsrate vom Blattaustrieb im April bis Anfang Juni. Danach war ein deutlicher, allerdings nicht signifikanter, Trend zu einer Verringerung der Infektionsrate zu erkennen.

Werden Endophyten vertikal verbreitet, so kann kein Anstieg der Infektionen innerhalb einer Pflanze stattfinden, da diese Endophyten nur gemeinsam mit der Wirtspflanze über deren Samen bzw. Klone verbreitet werden. Die Pflanze wird also nur einmal infiziert und der Endophyt breitet sich dann in der Pflanze aus. Allerdings kann sich die Infektionsrate innerhalb einer Wirtspopulation im Lauf der Zeit verändern, da infizierte und nicht infizierte Individuen unterschiedlich gut wachsen und sich verbreiten können (Saikkonen et al. 1998).

Räumliche Muster der Infektion

Unabhängig vom Alter der Blätter gibt es zum Teil deutliche Unterschiede der Infektionsdichte von Endophyten innerhalb einzelner Blätter, zwischen Blättern einer Pflanze und zwischen Pflanzen der gleichen Art. Sowohl Pehl & Butin (1994) als auch Wilson & Carroll (1994) zeigten, dass einzelne Blätter von Gehölzen an der Blattbasis im Bereich der Mittelrippe am stärksten infiziert waren. Zur Blattspitze hin und von der Mittelrippe zum Blattrand nahm die Infektionsdichte ab. Wilson & Carroll (1994) fanden verschiedene Erklärungen für diese Unterschiede. Zum einen wachsen Blätter an der Blattspitze stärker durch Zellstreckung als an der Blattbasis, wodurch bestehende Infektionen sich in der Blattspitze stärker voneinander entfernen. Von größerer Bedeutung sind aber vermutlich Unterschiede in der Durchlässigkeit der Blätter für Infektionen, der Regenexposition und der Abtrocknungsgeschwindigkeit der Blätter. Wasser sammelt sich entlang der Blattadern und läuft zur Blattbasis hin ab. Die Oberflächenstruktur sorgt zusätzlich für Unterschiede in der Sporenablagerung und -verweildauer. Besonders an der Blattbasis und entlang der Rippen können Haare wachsen und als Sporenfallen wirken (Allen et al. 1991). Die in diesen Bereichen länger anhaltende Feuchtigkeit sorgt für gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche Infektion des Blattes durch Endophyten. Ähnlich sah das Bild in der Untersuchung von Halmschlager et al. (1993) aus, allerdings fanden sie für die Blattbasis und die Spitze im Bereich der Mittelrippe eine höhere

Infektionsrate als im mittleren Blattbereich.

Unterschiede zwischen Sonnen- und Schattenblättern finden sich u. a. in Untersuchungen von Wilson et al. (1997). Danach war die Infektionsrate für *Ophiognomonia cryptica* in Sonnenblättern von *Quercus emoryi* höher als in Schattenblättern, wobei nicht geklärt werden konnte, ob dies ein Effekt der unterschiedlichen Blattfläche oder der Position in der Baumkrone war, da beide miteinander korreliert sind. Auch Wilson & Faeth (2001) beobachteten Unterschiede in der Infektionsrate von Licht- und Schattenblättern von *Quercus emoryi*. Anders als in den Untersuchungen von 1997 unterschieden sie zwischen der ersten Saisonhälfte, in der die Schattenblätter stärker infiziert waren und der zweiten Hälfte der Saison, in der die Sonnenblätter eine höhere Infektionsdichte aufwiesen. Sie nahmen an, dass Sonnenblätter aufgrund der stärkeren Lichtexposition dichter behaart sind, was zum verstärkten Ansammeln von Sporen führen kann (s. o.). Andererseits ist gerade in der ersten Saisonhälfte die Lichtintensität und damit auch die UV-Strahlung sehr hoch, wofür Sporen sehr empfindlich sind. Die weniger exponierten Schattenblätter bieten dann bessere Voraussetzungen für eine erfolgreiche Infektion.

Unterschiede in der Besiedlung verschiedener Individuen einer Wirtsart können genetisch bedingt sein. Todd (1988) bestätigte diese Vermutung durch Untersuchungen von Infektionen des Endophyten *Meria parkeri* in mehreren Gruppen („Familien“) miteinander verwandter Douglasfichten (*Pseudotsuga menziesii*). Die Infektionsrate war innerhalb der Familien sehr ähnlich, zwischen den Familien mit einer Bandbreite von 2 bis 50% jedoch sehr variabel und signifikant verschieden.

Endophyten in Gehölzen der temperaten Zone

Endophyten in mitteleuropäischen Laubbäumen sind bisher wenig bearbeitet worden. Unter anderem untersuchten Pehl & Butin (1994) *Acer pseudoplatanus*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur* und *Tilia cordata* auf das Vorkommen endophytischer Pilze und darauf aufbauend ihren Einfluss auf gallenbildende Insekten. Sie erfassten, nach eigener Aussage, vor allem häufig vorkommende Endophyten. Für jede Baumart fanden sie eine eigene Pilzflora, die durch bestimmte Charakterarten gekennzeichnet ist.

Halmschlager et al. (1993) untersuchten das Vorkommen von Endophyten in Ästen und Blättern von *Quercus petraea*, Sieber und Hugentobler (1987) von *Fagus sylvatica*. Sie fanden zahlreiche Arten, für die sie z. T. Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Verbreitung fanden, ohne jedoch näher auf deren Ursachen einzugehen. Motivation beider Arbeiten war es, den Zusammenhang von Endophyten mit einer Schädigung der Bäume zu untersuchen. Sie stellten fest, dass das Endophytenvorkommen in geschädigten Bäumen zwar anders sein kann als in gesunden, die Endophyten jedoch nicht ursächlich für die Schädigung verantwortlich sind.

Ein weiteres Beispiel für die Untersuchung der Besiedelung der Äste von immergrünen und laubabwerfenden Baumarten durch Endophyten ist die Arbeit von Kowalski & Kehr (1992). Ihr Ziel war es herauszufinden, ob Pilze, die tote Äste an Bäumen zersetzen, bereits im lebenden, unversehrten Ast als Endophyten zu finden sind. Es konnten in nahezu allen untersuchten Ästen Endophyten gefunden werden. Vor allem die äußeren, toten Rindenschichten waren stark besiedelt. Im lebenden Rindengewebe und im Holz wurden deutlich weniger Endophyten gefunden. Auch Kowalski & Kehr konnten sowohl wirtsspezifische als auch ubiquistische Arten ermitteln.

1.2 Isolation, Kultur und Bestimmung endophytischer Pilze

Es gibt verschiedene Methoden, Endophyten in Blättern zu erfassen und zu bestimmen. Zunächst werden die Blätter gesammelt. Nach der Oberflächensterilisation, die meist mit einer Abfolge von Ethanol, Natrium-Hypochlorid und noch einmal Ethanol durchgeführt wird, werden die Proben auf einem Nährmedium (häufig 2% Malzextrakt-Agar, MEA) kultiviert (Petrini et al. 1992). Die aus dem Blatt wachsenden Endophyten werden einzeln auf Kulturplatten übertragen. So gewonnene Isolate können morphologisch untersucht werden. Häufig ist es jedoch unmöglich die Isolate morphologisch zu bestimmen, da in Kultur keinerlei Sporen gebildet werden (Stone et al. 2004). Es können dann bestenfalls Morphospezies unterschie-

den werden und auch das ist nicht immer möglich. Eine zusätzliche Sequenzierung bestimmter Genomabschnitte kann helfen, Morphospezies in einen Verwandschaftskreis einzuordnen. So sequenzierten z. B. Guo et al. (2000) die 5.8S Region und die flankierenden „internal transcribed spacer“ Regionen (ITS1 und ITS2) der ribosomalen DNA von Mophospezies, die sie aus *Livistona chinensis* isoliert hatten. Um diese Morphospezies bestimmten Verwandschaftskreisen (Ordnungen, Familien und Gattungen) zuzuordonen, wurde aus den Sequenzen und Referenzsequenzen aus Internetdatenbanken mit Maximum Parsimonie Analysen ein phylogenetischer Baum berechnet. Ein solcher Baum erlaubt Aussagen über die taxonomische Einordnung des Probenmaterials. Auch wenn für eine sichere Zuordnung der Morphospezies zu einzelnen Arten oft Informationen über die Variabilität der Gensequenzen innerhalb der Art fehlen, kann die Annäherung Informationen liefern, wie die Kulturbedingungen variiert werden müssen, um die Sporulation zu forcieren und eine morphologische Bestimmung zu ermöglichen.

1.3 Kronendachforschung

Lange Zeit lagen die Baumkronen außerhalb der Aufmerksamkeit der Forscher. Erst seit etwa 25 Jahren gibt es vermehrte Aktivitäten zu ihrer Erforschung. Dies lag zum einen an den begrenzten technischen Möglichkeiten. Die Baumkronen waren nur durch zeit- und kraftraubende Klettertechniken erreichbar. Der Forscher blieb dabei auf den Stammbereich bzw. starke Äste beschränkt, der äußere Kronenbereich war unerreichbar. Daher konnten gerade Orte besonders hoher Stoffwechselaktivität, an denen z. B. Blattaustrieb, Blüten- und Fruchtentwicklung und Photosynthese stattfinden, nicht untersucht werden. Zum anderen erwartete man wenig Neues und Spektakuläres in den Baumkronen zu finden. Neue Techniken, wie das Benebeln der Baumkronen mit Insektiziden und anschließende Auffangen der Insekten (Erwin 1982) zeigten jedoch, dass es noch viel zu entdecken gibt. Heute wissen die Forscher, welche entscheidende Rolle das Kronendach für die Biodiversität spielt. So sind 22 von 25 globalen Biodiversitäts-Hotspots Waldgebiete. Schätzungsweise 20 bis 25% der Invertebraten kommen nur in Baumkronen vor und 10% aller Gefäßpflanzen

sind epiphytische Baumbewohner (Ozanne et al. 2003). Besonders die äußersten Kronenschichten, die früher nicht erreichbar waren, scheinen eine große biologische Aktivität und hohen Artenreichtum aufzuweisen (Basset et al. 2003).

Die konsequente Erforschung des Kronendaches von Wäldern begann Anfang der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Technik so weit entwickelt, dass das Besteigen der Bäume deutlich einfacher wurde und weniger störend in das System eingriff. Es verbreiteten sich fest installierte Systeme wie Baumkronenpfade, Türme und Kräne ebenso, wie die Nutzung von Luftschiffen (Hallé et al. 2000, Nadkarni et al. 2004). Dabei haben sich vor allem Kräne in den letzten Jahrzehnten weltweit etabliert (Pennisi 2005). Die Vorteile von Kränen gegenüber anderen Techniken sind die geringen Eingriffe in die Ökosysteme bei der Installation und die geringe Wetterabhängigkeit. Es können auch die äußeren Kronenbereiche gut erreicht werden und die genau gleichen Stellen immer wieder angesteuert werden. Durch die vielfache Nutzung von Kränen auf Baustellen sind sie leicht bedienbar und die Beschaffung von Material und Ersatzteilen ist einfach.

So ist es möglich, Bäume als ganzheitliche Organismen zu studieren und u. a. Artenzusammensetzung, Nährstoffkreisläufe, Energietransfer und Pflanze-Tier-Interaktionen zu erforschen. Die Integration von abiotischen Einflüssen, wie Bewegung von Wasserdampf, CO_2 (Körner et al. 2005) und Energie, ermöglicht ein erweitertes Verständnis von Vorgängen wie Photosynthese und Transpiration. Umgekehrt beeinflussen die Baumkronen abiotische Faktoren. So erhöht die Evapotranspiration den Wasserdampfgehalt der Luft und trägt zur Wolkenbildung bei. Andererseits werden bis zu 25% des Niederschlags von den Baumkronen zurückgehalten (Ozanne et al. 2003), anstatt abzufließen und dadurch zur Erosion von Böden beizutragen. Solche Erkenntnisse zeigen die Notwendigkeit der Kronendachforschung für das Verständnis komplexer biologischer Abläufe in Waldökosystemen.

1.4 Hypothesen und Zielsetzung

Folgende Hypothesen lagen der Arbeit zugrunde:

1. Es gibt eine spezifische Endophytenflora für jede Wirtsart. Sie wird von wirts-

spezifischen Arten dominiert, die gemeinsam mit ubiquistischen Arten auftreten.

2. Es gibt Unterschiede in der Artenzusammensetzung und Artendichte zwischen Licht- und Schattenblättern.

3. Es gibt Unterschiede in der Artenzusammensetzung und Artendichte zwischen Frühjahr und Herbst (Für Aussagen darüber müssen Ergebnisse einer anderen Studie [Finstermeier 2006] herangezogen werden).

Um diese Hypothesen zu überprüfen, sollte das Vorkommen von Endophyten im LAK-Untersuchungsgebiet in verschiedenen Baumarten und unterschiedlichen Lichtverhältnissen untersucht werden. Von den vier Baumarten *Acer pseudoplatanus* (Bergahorn), *Fraxinus excelsior* (Gemeine Esche), *Quercus robur* (Stieleiche) und *Tilia cordata* (Winterlinde) sollten jeweils Blätter aus der Licht- und Schattenkrone auf das Vorkommen von endophytischen Pilzen im Herbst untersucht werden. Die isolierten Arten sollten mittels Amplifikation und phylogenetischer Analyse eines Abschnitts der 28S rDNA kodierenden Region der großen ribosomalen Untereinheit (LSU) sowie mit morphologischen Untersuchungen so weit wie möglich bestimmt werden. Anschließend sollte die Diversität und Verteilung der Arten an unterschiedlichen Sammelpunkten ermittelt und verglichen sowie ein Vergleich zu einer entsprechenden Untersuchung im Frühjahr angestellt werden. Es sollte eine Diskussion der gewonnenen Ergebnisse mit Blick auf bisher veröffentlichte Untersuchungen zum Thema erfolgen.

2 Das Untersuchungsgebiet im Leipziger Auwald

2.1 Auwälder

Auwälder sind besondere Ökosysteme, die stark von Überschwemmungen und einem hohen Grundwasserspiegel beeinflusst werden. Der als Aue bezeichnete Lebensraum erstreckt sich entlang eines Fließgewässers und reicht bis zu der Linie, zu der das höchste Hochwasser vordringt. Durch die periodischen Überschwemmungen und den hohen Grundwasserstand sind Auenböden häufig wassergesättigt und auch während der Trockenperioden noch sehr feucht. Außerdem führt das Hochwasser Sedimente und Nährstoffe mit sich, die beim Rückgang des Wassers in der Aue abgelagert werden. Aus diesen Ablagerungen bildet sich über dem Flussschotter der bis zu mehrere Meter mächtige, nährstoffreiche Auenlehm. Auenböden gehören daher zu den fruchtbarsten natürlichen Böden (Colditz 1994).

Durch den starken Einfluss des Wassers bildet sich in den Auen eine azonale Vegetation aus, die sich mit zunehmender Entfernung vom Wasser und damit seltener werdender Überflutung verändert. Nach Ellenberg (1996) gliedert sich der Querschnitt der Aue in die gehölzfreie Aue, die sich direkt am Flussufer befindet und sehr häufig überflutet wird. Sie wird dominiert von annuellen und ausdauernden Kräutern. Daran schließt sich die Weichholzaue an, in der vor allem verschiedene Weidenarten, wie *Salix alba* und *S. fragilis*, sowie *Alnus incana* (Grauerle) die Landschaft prägen. Die Hartholzaue wird nur noch selten von Spitzenhochwasser überflutet. Verschiedene Ulmenarten (*Ulmus glabra*, *U. laevis* und *U. minor*), *Fraxinus excelsior* (gemeine Esche) und *Quercus robur* (Stieleiche) tolerieren Überflutungs-

perioden von bis zu mehreren Monaten und bilden den Hauptbaumbestand. Die Hartholzaue geht zunehmend in die zonale Vegetation über. Die strukturelle Vielfalt der Auen sowie das hohe Nährstoffangebot und eine gute Wasserversorgung sind die wichtigsten Faktoren für die hohe pflanzliche Diversität in diesem Lebensraum. Daraus entstehen wiederum ökologische Nischen für zahlreiche Tierarten. Pflanzliche und tierische Vielfalt erzeugen reichlich Substrat für symbiontische, parasitische und saprobiontische Pilze.

Heutzutage sind Auwälder selten geworden. Sie gehören zu den am meisten bedrohten Waldkomplexen Mitteleuropas (Frey & Lösch 2004). Über 90% der ehemaligen Auenwälder wurden durch Flussbegradigung, Eindeichung, Kies- und Sandabbau und die Errichtung von Staustufen bereits zerstört (Colditz 1994).

2.2 Der Leipziger Auwald und das NSG Burgaue

Der Leipziger Auwald durchzieht die Stadt wie ein grünes Band von Nord nach Süd entlang der Flüsse Weiße Elster, Pleiße, Luppe, Parthe und verschiedener kleinerer, teils künstlich angelegter Fließgewässer (Abb. 2.1).

Der fast lückenlose Waldbestand teilt mit einer Breite von 2 bis 4 km den Großraum Leipzig in zwei Hälften. Er ist nicht nur aufgrund seiner innerstädtischen Lage und daher seiner Funktion als grüne Lunge der Stadt sowie als Naherholungsgebiet von großer Bedeutung. Das von Natur aus schon reich verzweigte Gewässernetz wurde bereits im 10. bis 12. Jahrhundert künstlich erweitert (Müller & Zäumer 1992) und bietet so reichlich Lebensraum für viele auetypische Pflanzen- und Tierarten.

Mit Beginn der Industriealisierung zu Anfang des 19. Jahrhunderts wurden weite Bereiche der Aue durch zunehmende Bebauung sowie Kies- und Braunkohleabbau zerstört. Noch schwerwiegender wirkten sich die Regulierungs- und Hochwasserschutzprogramme seit 1852 aus. Um die häufigen Überflutungen einzuschränken und die bis 1864 endemisch in Leipzig auftretende Malaria auszurotten, wurden zahlreiche Deiche, Wehre und Rückhaltebecken gebaut, so unter anderem 1911/12 das Palmengartenwehr und 1922 das Elsterflutbecken. Auf den nördlichen Teil des Auwaldes wirkten sich besonders regulierende Baumaßnahmen am Flusslauf der Luppe

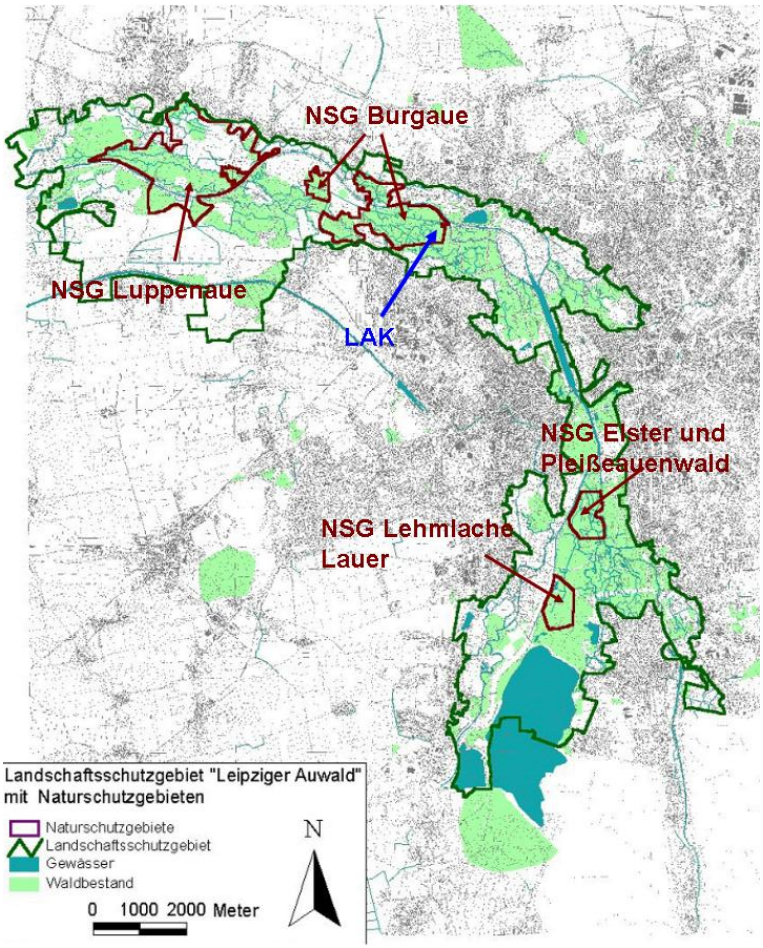

Abbildung 2.1: Landschafts- und Naturschutzgebiete im Raum Leipzig. Der blaue Pfeil zeigt den Standort des Leipziger Auwaldkranes (LAK) im NSG Burgaue. (Quelle: www.leipzig.de, verändert)

ab 1934 aus. Der intensive Braunkohleabbau im Großraum Leipzig ab Mitte des 20. Jahrhunderts führte zudem zu einem starken Absinken des Grundwasserspiegels. Als Folge dieser Maßnahmen bleiben regelmäßige Überschwemmungen in weiten Teilen des Auwaldes seit Jahrzehnten aus und zahlreiche Altarme und Kleingewässer verlanden zunehmend (Müller & Zäumer 1992).

Trotz schwerwiegender menschlicher Eingriffe vor allem im 20. Jahrhundert verfügt der Leipziger Auwald noch immer über die für Auenlandschaften typische große Artenvielfalt. Dies ist nicht zuletzt den Lehmstichen zu verdanken, die durch den kleinflächigen Lehm- und Kiesabbau entstanden sind und nach Ende der Nutzung Rückzugsgebiet für zahlreiche Arten der Flussaue wurden. So ist die Biodiversität

des Leipziger Auwaldes heute trotz oder gerade wegen seiner Großstadtnähe einzigartig in Europa (Mäkert & Oertner 2000).

Im nördlichen Auwald nördlich des Stadtteils Böhlitz-Ehrenberg liegt das NSG Burgaue (Abb. 2.1). 1959 mit ca. 43 ha als Waldschutzgebiet ausgewiesen und 1961 als Naturschutzgebiet festgesetzt, umfasst es heute eine Fläche von ca. 270 ha. Davon sind etwa 14 ha stillliegende Lehmstiche, der Rest des Gebiets besteht aus der, für den Leipziger Auwald typischen Hartholzaue (Querco-Ulmetum minoris Issler 1924 (= Fraxino-Ulmetum R.Tx. 1952) nach Pott 1995) (Jansen & Kirmse 2002).

2.3 Der Leipziger Auwaldkran

Das Leipziger Auwaldkran-Projekt ist initiiert worden,um die Ökologie eines mitteleuropäischen temperaten Auwaldes unter besonderer Berücksichtigung des Kronendaches in seiner Gesamtheit zu untersuchen. Es wurde 2001 von Prof. Dr. W. Morawetz von der Universität Leipzig in Kooperation mit dem Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle (UFZ) und mit Unterstützung der Stadt Leipzig ins Leben gerufen (Morawetz & Horchler 2002). Unter anderem soll dabei herausgefunden werden

- welche Arten im Gebiet vorkommen,
- wie das System räumlich strukturiert ist, insbesondere ob es vertikale und horizontale Unterschiede in der Verbreitung von Arten und im Mikroklima gibt,
- ob es zeitliche Veränderungen in der Verbreitung von Arten und im Mikroklima gibt,
- welche Funktion diese Strukturen im Ökosystem haben
- und vor allem, welche ökologische Bedeutung all diese Zusammenhänge besitzen.

Um diese Fragen für die Baumkronen zu beantworten, wurde ein Turmdrehkran (Typ Liebherr 71EC, Höhe 40 m, Auslegerlänge 45 m) fahrbar auf einer 120 m

langen Schienentrasse installiert (Abb. 2.2). In einer am Ausleger hängenden Gondel können so die Baumkronen auf einer Fläche von ca. 1,6 ha erreicht werden.

Abbildung 2.2: Der Leipziger Auwaldkran im Frühjahr (Quelle: LAK-Projekt)

Errichtet wurde der Leipziger Auwaldkran am östlichen Rand des NSG Burgaue (51°20' 16"N, 12°22'26"O) (Abb. 2.1). Verschiedene Kriterien waren ausschlaggebend für die Wahl des NSG Burgaue als Standort:

- es existierten schon viele Daten zum Gebiet, die die Grundlage der Untersuchungen bilden konnten,
- der Standort hatte eine hohe Artenzahl an Bäumen und nahezu den natürlichen Artenbestand eines Hartholzauwaldes (Querco-Ulmetum minoris) und
- das Gebiet war auch mit öffentlichen Verkehrsmitteln gut zu erreichen und eine dauerhafte Stromversorgung war gewährleistet.

Der exakte Standort ergab sich, da ein alter Damm die Möglichkeit bot, die Krantrasse ohne große Störungen im Gebiet zu errichten. Ein nahegelegenes Gebäude dient den Wissenschaftlern zudem als Basisstation (Morawetz & Horchler 2003).

Das Untersuchungsgebiet befindet sich klimatisch im Übergangsgebiet zwischen maritimem und kontinentalem Klima auf einer Höhe von 102 m über NN. Die

mittlere Jahrestemperatur im Gebiet beträgt 8,8°C, der mittlere Jahresniederschlag 512 mm. Bei der Pflanzengesellschaft handelt es sich um ein Querco-Ulmetum minoris Issler, wobei durch die seit Jahrzehnten fehlende Überflutung zunehmend auch wenig überflutungstolerante Arten, wie *Acer pseudoplatanus* (Feldahorn) und *Tilia cordata* (Winterlinde) auftreten. Insgesamt kommen 15 Baumarten (> 5 cm Durchmesser in Brusthöhe - DBH) im Untersuchungsgebiet vor. Ihre Verteilung im Plot und ihr DBH sind der Abbildung 2.3 zu entnehmen (Morawetz & Horchler 2003).

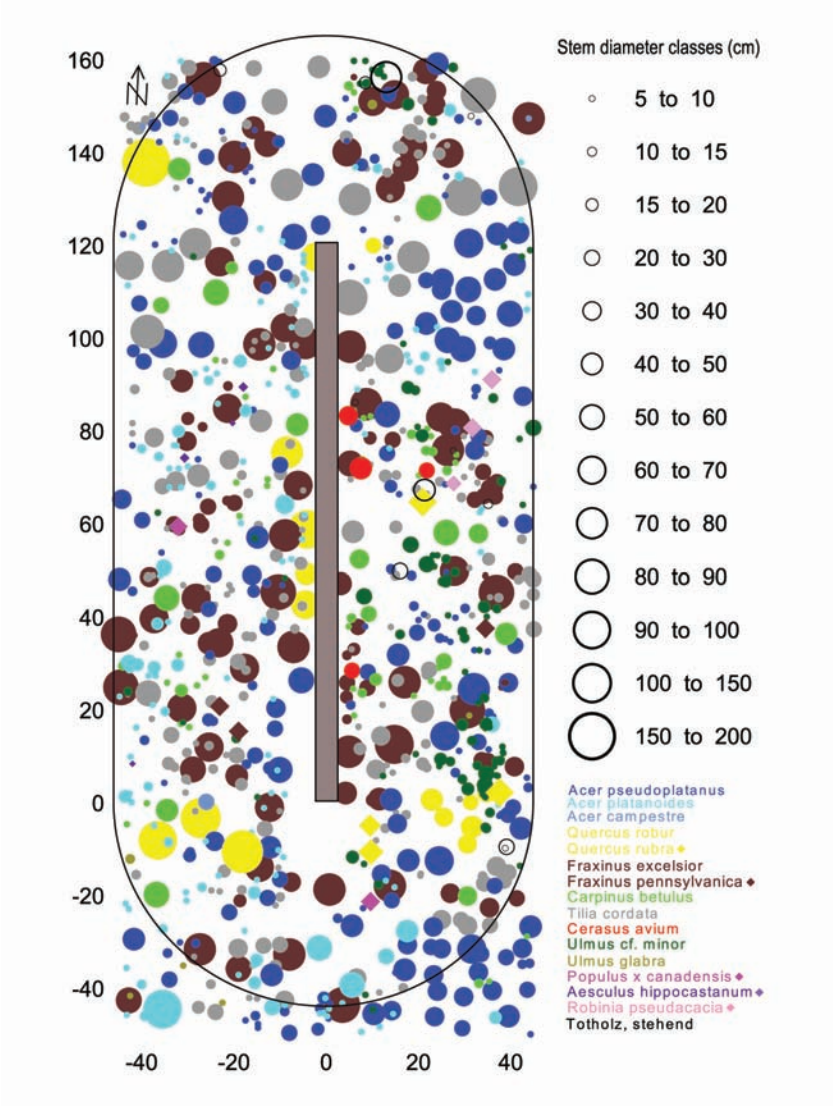

Abbildung 2.3: Verteilung der Bäume mit mehr als 5 cm Durchmesser in Brusthöhe (DBH) im Untersuchungsgebiet des Leipziger Auwaldkranes (Quelle: Morawetz & Horchler 2003).

Das Untersuchungsgebiet hat mit einer recht hohen Zahl an Baumarten und einer Mischung aus alten und jungen Bäumen eine große Heterogenität. Dies spiegelt sich auch in der stark zerklüfteten Oberfläche des Kronendaches wider (Abb. 2.4).

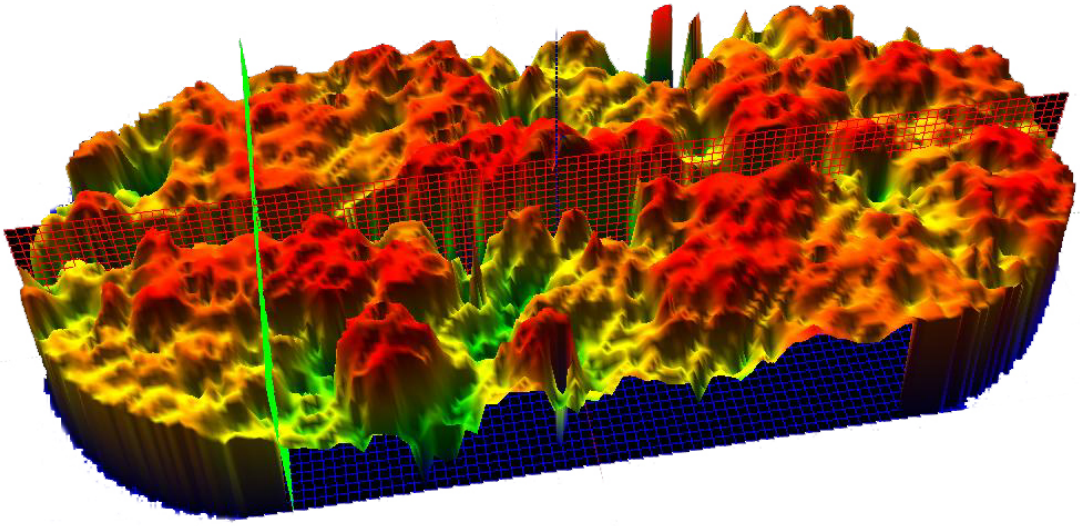

Abbildung 2.4: Computer-generiertes 3-D Modell der Kronendach-Oberfläche des LAK-Untersuchungsgebietes basierend auf 4500 Messpunkten. Die Lücke von rechts nach links, in der das vertikale Koordinatengitter liegt, ist die Schneise, in der der Kran bewegt werden kann. (Quelle: LAK-Projekt, M. Rohrschneider)

3 Material und Methoden

Um die Diversität und Verteilung endophytischer Pilze im LAK-Plot zu erfassen, wurden zunächst Blätter gesammelt und die endophytischen Pilze daraus isoliert. Die so gewonnenen Kulturen wurden in Gruppen mit gleicher Morphologie (Morphospezies) unterteilt. Jede Morphospezies wurde soweit wie möglich morphologisch bestimmt und von mindestens einem Vertreter die DNA-Sequenz der D1/D2 variablen Region der großen ribosomalen Untereinheit (LSU) ermittelt. Es wurden Vergleichssequenzen in Internetdatenbanken ermittelt und phylogenetische Analysen zur taxonomischen Einordnung der Morphospezies durchgeführt. Mithilfe der morphologischen und genetischen Bestimmung wurde eine Artenliste erstellt, die die Grundlage für eine Arten-Akkumulationskurve und Diversitätsstudien sowie die Analyse mit multivariater Statistik bildete. Zusätzlich flossen in die Analyse Angaben zur Wirtsart, zur Lichtexposition, zur Blattgröße und zur Sammelhöhe ein, die während der Feldarbeiten ermittelt wurden.

3.1 Probennahme im LAK-Plot

Die Probennahme erfolgte wenige Wochen vor dem Laubfall Ende September 2005 im Untersuchungsgebiet des LAK-Projektes. Von den vier untersuchten Baumarten *Acer pseudoplatanus* (Bergahorn), *Fraxinus excelsior* (Gemeine Esche), *Quercus robur* (Stieleiche) und *Tilia cordata* (Winterlinde) wurden jeweils zwei Individuen aus der Gesamtzahl der im Plot vorhandenen Bäume zufällig ausgewählt. Einschränkende Kriterien für die Auswahl waren die Erreichbarkeit der Bäume mit der Krangondel, eine Baumhöhe von mindestens 25 m und ein deutlicher ($>$ 20 m) Abstand der Individuen einer Art voneinander. Pro Baum wurden vier Sammelpunkte, die mindestens fünf Meter voneinander entfernt lagen, ausgewählt. Zwei davon im obe-

ren Kronenbereich (eindeutige Lichtblätter) und zwei senkrecht darunter im unteren Kronenbereich (eindeutige Schattenblätter).Alle Blätter wurden ein Höhen zwischen 15 und 33 m gesammelt.

An jedem dieser 32 Sammelpunkte wurden zehn Blätter innerhalb eines Würfels mit 50 cm Kantenlänge (Abb. 3.1) zufällig entnommen. Bei Fraxinus wurde je ein Fiederblättchen aus der Blattmitte der zehn Blätter ausgewählt. Um Schäden und nachträgliche Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Blätter gekühlt in Papiertüten transportiert und gelagert und innerhalb von 2 Tagen weiter bearbeitet.

Abbildung 3.1: Würfel mit 50 cm Kantenlänge, in dem die Blätter gesammelt wurden.

3.2 Bestimmung von Lichtexposition und Blattgröße

Von jedem Sammelpunkt wurde im Spätsommer bei bedecktem Himmel ein Foto mit einem Fischaugen-Objektiv gemacht, um quantitative Aussagen über die Lichtexposition zu ermöglichen. Das Fischaugen-Objektiv ermöglichte die Aufnahme des gesamten Lichteinfallsbereiches über dem Sammelpunkt in einem Bild (Abb. 3.2). Mit dem Programm WinSCANOPY (Regent Instruments) wurden die Bilder

ausgewertet. Dabei wurde der Anteil von hellen Bereichen (Himmel) und dunklen Bereichen (Schatten) ermittelt und damit die Lichtexposition bestimmt.

Zur Bestimmung der mittleren Blattgröße jedes Sammelpunktes wurden die zehn gesammelten Blätter eingescannt. Mit Hilfe des Programmes Adobe Photoshop wurde die Blattfläche ermittelt. Dazu wurden die Blattflächen markiert und mit der Histogrammfunktion die Pixelzahl der markierten Fläche ermittelt. Mit Hilfe der Pixelzahl einer bekannten Fläche (DIN A4 Blatt) bei gleicher Einstellung konnte so die Blattfläche ermittelt werden.

3.3 Isolation endophytischer Pilze

Pro Sammelpunkt wurden drei Blätter zur weiteren Bearbeitung zufällig ausgewählt. Zunächst wurde nach der Methode von Gamboa et al. (2002) die Blattoberfläche sterilisiert. Dazu wurden die Blätter in 0,01% Tween20 gewaschen. Danach erfolgte die Sterilisation in 75% Ethanol (1 min.), 0,5% Natriumhypochlorid (NaClO in H_2O; 3 min.) und noch einmal 75% Ethanol (30 sec.). Nach dem Trocknen wurde ein 2 x 2 cm großer Bereich in der Blattmitte entlang der Mittelrippe herausgeschnitten und in 16 Quadrate mit jeweils 0,5 cm Seitenlänge geteilt. Diese 16 Stücke aus einem Blatt wurden in Petrieschalen (Ø 90 mm) mit Malzextraktagar (MEA; Rezept im Anhang) ausgelegt (insgesamt 96 Platten). MEA hat sich als geeignetes Medium für die Isolation endophytischer Pilze erwiesen (Petrini et al. 1992). Die Kultivierung erfolgte bei Raumtemperatur und Tageslicht.

Nach 6 bis 8 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien (s. Abb. 3.3) gezählt und anschließend einzeln auf Platten mit MEA übertragen. Es trat eine sehr hohe Zahl Kolonien auf (nach acht Tagen wurden bis zu 34 Kolonien auf einer Platte gezählt), die aus Zeitgründen nicht alle untersucht werden konnten. Daher wurden von jeder Platte von gleich aussehenden Kolonien jeweils nur ein bis zwei isoliert (bis zu acht Kolonien pro Platte). Es ergab sich eine Gesamtzahl von 412 Isolaten. Da so meist nicht alle Kolonien einer Art, die aus einem Blatt wuchsen, erfasst werden konnten, wurden in der Auswertung als Abundanzwerte nicht die Zahl der isolierten Kolonien einer Art genutzt, sondern nur deren Präsenz oder Fehlen in einem Blatt. Da

Abbildung 3.2: Fischaugenfoto von Sammelpunkt 20.

pro Sammelpunkt drei Blätter untersucht wurden, konnte die Abundanz einer Art an einem Sammelpunkt also zwischen null (nicht aufgetreten) und drei (aus allen drei Blättern isoliert) liegen. Die Pilze wurden solange bei Raumtemperatur kultiviert, bis sie einen Großteil des Agars bedeckten und dann im Kühlschrank bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Sofern noch keine Sporulation aufgetreten war, wurden die Platten nach einigen Wochen erneut bei Raumtemperatur gelagert, um die Sporulation zu erreichen.

3.4 Morphogruppenbildung und morphologische Bestimmung

Die Kulturen wurden anhand ihres makroskopischen und mikroskopischen Erscheinungsbildes in Morphospezies eingeteilt. Die Merkmale der einzelnen Morphospezies sind Tabelle 8.1 im Anhang zu entnehmen. Sporulierende Isolate wurden so weit wie möglich morphologisch identifiziert. Dazu wurde Bestimmungsliteratur aus dem europäischen Raum genutzt, u. a. Sutton (1980), Ellis (1971 & 1976) und Lundqvist (1972). Die Namensgebung folgte der Nomenklatur im Dictionary of the

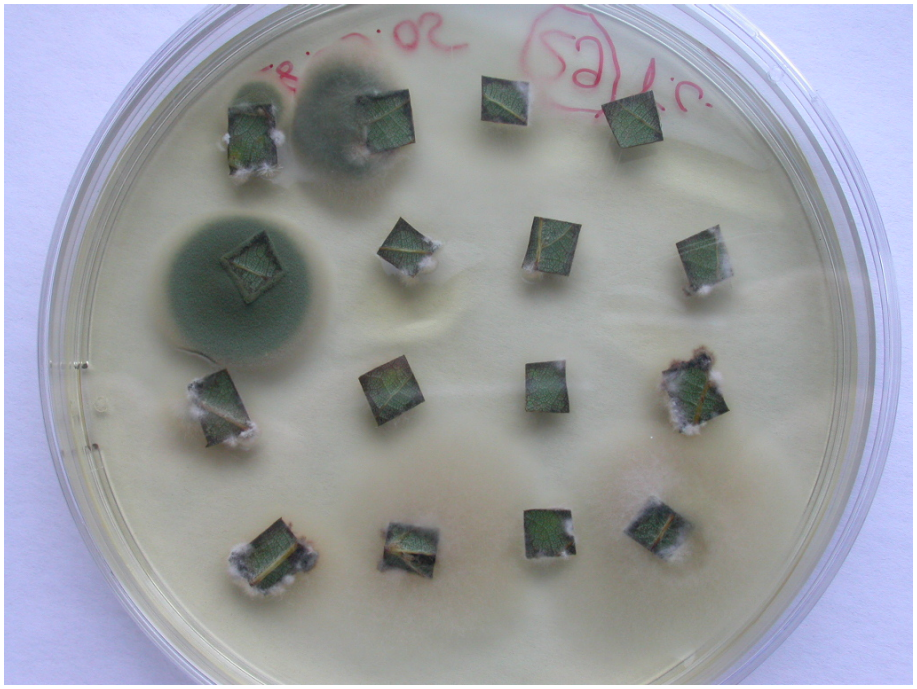

Abbildung 3.3: Petrieschale mit Blattstücken von *Tilia cordata* und daraus gewachsenen Kolonien endophytischer Pilze sieben Tage nach dem Auslegen der oberflächensterilisierten Blattstückchen auf Malzextrakt-Agar.

Fungi (Kirk et al. 2001) und Index Fungorum (http://www.indexfungorum.org).

3.5 Sequenzierung

Für mindestens einen Vertreter jeder Morphospezies erfolgte die Isolierung der DNA, Amplifizierung der Zielregion und Sequenzierung nach den folgenden Vorschriften.

3.5.1 DNA-Isolierung

Um die DNA zu isolieren, wurde eine kleine Menge der Pilzkultur (etwa eine Fläche von 1 bis 2 cm^2) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Die Probe wurde in 100 μl CTAB (20 g/l CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit einem sterilen Plastikpistill gemörsert und mit 400 μl CTAB aufgefüllt. Anschließend erfolgte für 30 min bei 60°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) der thermische Aufschluss. Jeweils 250 μl Phenol und 250 μl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wurden zugegeben und durch Schütteln des Reaktionsgefäßes gemischt. Das Gemisch wurde mit 1600 g bei 4°C für 5 min zentrifugiert,

wodurch sich zwischen zwei flüssigen Phasen eine Schicht mit festen Bestandteilen bildete. Die obere flüssige Phase, in der sich die DNA befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 μl Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und noch einmal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μl Isopropanol (4°C) versetzt, um die DNA zu fällen. Zentrifugieren für 15 min (13 000 g bei 4°C) sorgte dafür, dass sich die DNA in einem Pellet sammelte. Der Überstand wurde verworfen, 200 μl Ethanol zum Waschen des Pellets zugefügt und noch einmal unter gleichen Bedingungen für 10 min zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 10 bis 15 min bei 37°C im Thermomixer (bei geöffnetem Reaktionsgefäß) getrocknet. Zum Schluss wurden 100 μl destilliertes Wasser zugegeben und die Proben bei -80°C aufbewahrt.

3.5.2 PCR Amplifikation der D1/D2 variablen Region

Die D1/D2 Region, eine variable Region am 5' Ende der 28S rDNA der LSU wurde mit den Primern NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') und NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') amplifiziert (O'Donnell 1993). NL1 und NL4 schließen eine Region von ca. 600 bp ein (Abb. 3.4). Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden 49,2 μl eines Gemisches bestehend aus 5 μl 10x Reaktionspuffer (Mg frei; Promega, Mannheim, Deutschland), 4 μl $MgCl_2$ (25 mM; Promega), 4 μl dNTP Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 34 μl ddH_2O, je 1 μl der Primer NL1 und NL4 (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) und 0,2 μl *Taq* DNA Polymerase (Promega) mit 1 μl der isolierten DNA versetzt. Die PCR wurde im Thermocycler PTC-200^{TM} (MJ Research) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierungsphase von 3 min bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94°C, 45 sec Annealing bei 54°C und 1 min Elongation bei 72°C, abschließend folgte eine Elongationsphase von 7 min bei 72°C.

Je 3 μl PCR-Produkt wurden mit 1 μl Stoppmix in einem 1,5% (w/v) Agarosegel in 0,5x TAE-Puffer bei 100 V für ca. 20 min aufgetrennt. Im Ethidium-Bromid-Bad wurde die DNA markiert und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Bei erfolgreicher PCR war eine DNA-Bande bei ca. 600 bp zu sehen.

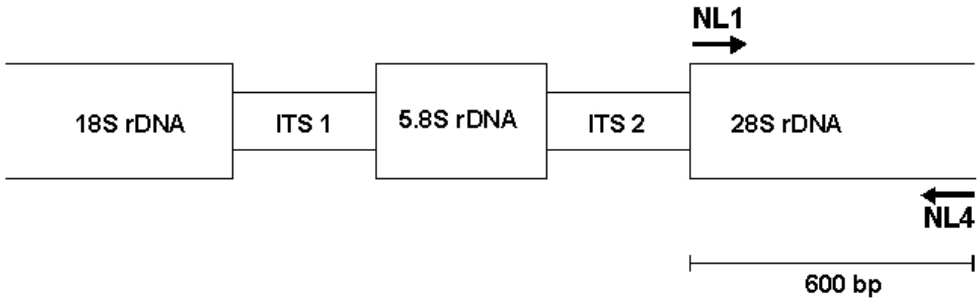

Abbildung 3.4: Darstellung eines Teils der rDNA Region. Dargestellt sind die kodierenden und die Spacer-Regionen (ITS = Internal Transcribed Spacer) der großen ribosomalen Untereinheit (LSU). Die amplifizierte 28S rDNA Region wird von den Primern NL1 und NL4 eingegrenzt (nach O'Donnell 1993, verändert).

3.5.3 DNA Sequenzierung

Das PCR-Produkt wurde mit dem NucleoSpin Extract II Kit (MacheryNagel, Düren, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

Beide DNA-Stränge wurden sequenziert. Dafür wurden zu einem Gemisch aus 6 μl H_2O (destilliert), 3,5 μl 5x Puffer (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequenzing Kit, Applied Biosystems, Warrington, UK), 1 μl Terminatormix (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequenzing Kit) und 1 μl Primer (NL1 oder NL4) 3 μl der aufgereinigten DNA gegeben. Im Thermocycler (Mastercycler der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) erfolgten 24 Zyklen mit 10 sec Denaturierung bei 96°C, 5 sec Annealing bei 50°C und 4 min Elongation bei 60°C.

Anschließend wurden die Cycle-Sequenzing Produkte gefällt. Dazu wurden 16 μl HPLC-H_2O und 64 μl 96% EtOH zum Cycle-Sequenzing Produkt gegeben, gevortext, alles 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 250 μl 70% EtOH gewaschen und noch einmal 15 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet ca. 10 bis 15 min in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac, ArrayIT) getrocknet.

Das Pellet wurden in Formamid gelöst und die DNA im ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) aufgetrennt und sequenziert.

3.6 Sequenzanalyse

Mit Hilfe des Programmes Multalign (Corpet 1988) wurden die beiden DNA-Sequenzen einer Probe zusammengefügt und im Programm BioEdit Version 7.0.5.2 (Hall 1999) von Hand nachbearbeitet. Die so ermittelte Sequenz wurde als 'Query'-Sequenz genutzt, um mit BLAST (Altschul et al. 1997) ähnliche Sequenzen in der Internetdatenbank GenBank (NCBI) zu suchen. Die ähnlichsten Referenzsequenzen sowie weitere Sequenzen ausgewählter Taxa wurden für die nachfolgenden phylogenetischen Analysen genutzt (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Für die phylogenetische Analyse genutzte Sequenzen aus GenBank

Taxa	**aktuelles Synonym**	**GenBank-Zugangsnummer**
Ascomycota		
Achaetomium strumarium	*Chaetomium strumarium*	AY681170
Alternaria alternata		AB100675
Alternaria arborescens		AY154706
Alternaria brassicicola		AY154707
Alternaria citri		AY154705
Alternaria japonica		AY154703
Alternaria longipes		AY154684
Alternaria mali		AY154683
Alternaria tenuissima		AY154712
Alternaria triticina		AY154695
Anthostomella sp.		AY780050
Apiognomonia errabunda		AF408334
Aporothielavia leptoderma		AF096186
Arecophila sp.		AF452039
Asordaria arctica	*Sordaria arctica*	AY681141
Asordaria prolifica	*Sordaria prolifica*	AY681140
Asordaria sibutii	*Sordaria sibutii*	AY681146
Asordaria tenerifae	*Sordaria tenerifae*	AY681138
Astrocystis cocoes		AY083823
Aureobasidium pullulans		AM040215
Bertia moriformis		AY695261
Bionectria pityrodes		AY489728
Bombardia bombarda		DQ470970
Byssothecium circinans		AY016357
Cainia graminis		AF431949
Caliciopsis orientalis		DQ470987
Capnodium coffeae		DQ247800
Chaetomium cupreum		AF286400
Chaetomium globosum		AF286403
Chaetomium microascoides		AY346273
Chaetosphaeria myriocarpa		AF178552
Cladosporium cladosporioides		AY213694
Cladosporium fulvum	*Mycovellosiella fulva*	AY352597
Cladosporium malorum		AY354914
Cladosporium nigrellum		AY352588
Cladosporium porophorum		AY354913
Cladosporium tenuissimum		AY342117
Cladosporium uredinicola		AY342131
Cladosporium vignae		AY342132
Clypeosphaeria uniseptata		AY083830
Cochliobolus heliconiae		AF163978

Tabelle 3.1: (Fortsetzung)

Cochliobolus heterostrophus		AY544645
Colletotrichum acutatum		AF275542
Colletotrichum lupini		AJ301975
Colletotrichum nymphaeae		AY705728
Coniochaeta ostrea	???	DQ470959
Cordyceps sinensis		AB067737
Cosmospora coccinea		AY489734
Cryptendoxyla hypophloia		AB191035
Cryptodiaporthe aesculi		AF408342
Cryptodiaporthe hystrix		AF408344
Cryptodiaporthe salicella		AF408345
Curvularia eragrostidis	*Pseudocochliobolus eragrostidis*	AF163983
Daldinia concentrica		U47828
Dendryphiella arenaria	*Scolecobasidium arenarium*	DQ470971
Diaporthe eres		AF362565
Diaporthe melonis var. *brevistylospora*		AB107262
Diaporthe oncostoma		AF408353
Diaporthe phaseolorum		AB107256
Diatrype disciformis		DQ470964
Didymella cucurbitacearum		AY293792
Discula campestris		AF277140
Dothidea insculpta		DQ247802
Dothiora cannabinae		DQ470984
Epicoccum nigrum		AY093414
Fasciatispora petrakii		AY083828
Fusarium acutatum		AY213704
Fusarium chlamydosporum var. *fuscum*		AY213706
Fusarium lateritium	*Gibberella baccata*	AF310980
Fusarium oxysporum		AY188919
Fusarium proliferatum		AF291060
Fusarium tricinctum	*Gibberella tricincta*	AY188923
Gelasinospora tetrasperma		AY346281
Gibberella avenacea		AY188925
Gibberella fujikuroi		AY188916
Glomerella cingulata		AJ301952
Glomerella phacidiomorpha		AF275496
Gnomoniella fraxini		AY455817
Graphostroma platystoma		AY083827
Halorosellinia oceanica		AY083822
Hercospora tiliae		AF408365
Hortaea werneckii		AB079595
Hypocrea rufa		AY489726
Hyponectria buxi		AY083834
Hypoxylon fragiforme		AY083829
Hysteropatella clavispora		AY541493
Lewia infectoria		AY154692
Letendraea helminthicola		AY016362
Macroventuria anomochaeta		AY787936
Melanconis stilbostoma		AF408374
Mycosphaerella heimioides		AF309577
Mycosphaerella molleriana		AF309584
Mycosphaerella punctiformis		AY490776
Myriangium duriaei		AY016365
Nectria cinnabarina		L36625
Nectria haematococca		AB084303
Neurospora crassa		U40124
Neurospora intermedia		AY681149
Neurospora pannonica		AY780070
Neurospora tetrasperma		AY681159
Phaeosphaeria avenaria		AY544684
Phoma glomerata		AY293784
Phoma herbarum		AY293791
Phoma sp. 1		AY293785
Phoma sp. 2		AY293786

Tabelle 3.1: (Fortsetzung)

Phomopsis vaccinii	*Diaporthe vaccinii*	AF439630
Plagiostoma euphorbiae		AF277131
Pleospora herbarum var. herbarum		AF382386
Preussia minima	*Sporormiella minima*	AY510392
Preussia intermedia	*Sporormiella intermedia*	AY510381
Rosellinia necatrix		AY083824
Scolecobasidium terreum		AB161065
Sordaria alcina		AY681164
Sordaria fimicola		AY681160
Sordaria humana		AY780078
Sordaria lappae		AY780080
Sordaria macrospora		AY346301
Sordaria superba		AY681139
Sordaria tomentoalba		AY681161
Spilocaea oleaginea		AF338397
Sydowia polyspora		AY544675
Venturia hanliniana	*Caproventuria hanliniana*	AB100681
Xylaria acuta		AY544676
Xylaria curta		U47840
Xylaria hypoxylon		AY544648
Basidiomycota		
Puccinia graminis		AF522177
Phragmidium violaceum		DQ142910
Resupinatus applicatus		AY571022
Thanatephorus cucumeris		DQ097888
Zygomycota		
Glomus mosseae		DQ469131

Aus den Referenzsequenzen und eigenen Sequenzen wurden Alignments mit dem Programm ClustalX (Thompson et al. 1997) erstellt und im Programm BioEdit von Hand nachbearbeitet.

Maximum Parsimonie Analysen wurden mit PAUP* 4.0b10 (Swofford 2003) durchgeführt. Aufgrund der großen Zahl an Sequenzen wurde eine heuristische Suche gewählt: Durch schrittweise Addition der einzelnen Taxa in zufälliger Reihenfolge wurde ein Startbaum ermittelt, der durch TBR-Transformationen optimiert wurde. Die schrittweise Addition erfolgte zufallsbedingt mit 10 Replikaten. Alle Taxa wurden als ungeordnet und gleichwertig betrachtet. Lücken wurden als fehlende Information behandelt. Aus allen sparsamsten so ermittelten Bäumen wurde ein strikter Konsensusbaum gebildet.

Um die generelle taxonomische Einordnung ins Reich der Pilze zu ermitteln, wurde jeweils eine Sequenz eines repräsentativen Vertreters von 36 Morphospezies (von vier MS lag keine Sequenz vor), zwei Sequenzen aus der Gruppe der Isolate, die nicht in Morphospezies sortiert werden konnten und 38 Referenzsequenzen mit einer

Maximum Parsimonie Analyse untersucht. Referenzsequenzen waren 33 Arten der Ascomycota, 4 Arten der Basidiomycota und einer Art der Zygomycota, die zugleich die Außengruppe bildete.

Anhand des Konsensusbaumes (Abb. 4.2) wurden fünf Gruppen ausgewählt (siehe Ergebnisse), für die mit weiteren Referenztaxa ebenfalls Maximum Parsimonie Analysen durchgeführt wurden. Die Zuverlässigkeit der Äste wurde für diese Bäume durch 1000 Bootstrap Replikate abgesichert. Für die Bootstrap Replikate wurde die schrittweise Addition auf „simple“ gestellt, da die Bootstrap-Werte davon nicht signifikant beeinflusst werden (Müller 2005), die Analyse jedoch deutlich weniger Zeit in Anspruch nahm. Diese Einstellung war günstiger, als die Zahl der Bootstrap-Replikate herunterzusetzen, was eine größere Ungenauigkeit der Bootstrap-Werte zur Folge hätte.

3.7 Analyse von α- und β-Diversität

Zur Abschätzung der Diversität endophytischer Pilze im Untersuchungsgebiet wurde mit dem Programm EstimateS Version 7.5 (Colwell 2005) eine auf den Sammelpunkten basierende Rarefaction-Kurve (geglättete Artenakkumulationskurve) ermittelt und Chao2 (Chao 1987) und ICE (incidence-based coverage estimator; Lee & Chao 1994) als Schätzwerte für die Artenzahl berechnet. Die Standardeinstellungen des Programms wurden beibehalten. Auch die voreingestellten 50 Randomisierungen wurden übernommen, da eine weitere Erhöhung der Randomisierungsläufe keine Veränderungen im Ergebnis zur Folge hatte. Für Chao2 wurde die Einstellung entsprechend den Empfehlungen des Autors auf „classic formula“ geändert.

Der Artenreichtum verschiedener ökologischer Nischen, wie Wirtsbaumarten oder Licht- und Schattenblätter wurde ebenfalls mit EstimateS berechnet. Es wurden auf den Sammelpunkten basierende Rarefaction-Kurven erstellt, im Programm mit Sobs (MaoTau) bezeichnet, da Gotelli & Colwell (2001) diese für sammelpunktbezogene Daten empfehlen.

Die Verteilung der Arten im Hinblick auf Wirtsart, Lichtexposition und Blattfläche wurde mit dem Programm PC-ORD Version 4.25 (McCune & Mefford

1999) untersucht. Es wurde jeweils eine Ordination mit NMS (Nonmetric Multidimensional Scaling) für das gesamte Artenspektrum und für eine kleinere Matrix ohne Singletons (Arten, die nur an einem Sammelpunkt vorkommen) durchgeführt. Verwendet wurden „Presence/Absence“ Daten, die aufgrund zahlreicher Nullen mit der „Beals Smoothing“-Funktion in PC-ORD modifiziert wurden (Beals 1984, McCune & Grace 2002). Die Ordinationen wurden im Autopilot-Modus mit der Einstellung „slow and thorough“ durchgeführt. Als Distanzmethode wurde Sørensen (Bray-Curtis) gewählt. Außerdem wurden Ordinationen mit DCA (Detrended Correspondence Analysis) für das gesamte Artenspektrum und für einen reduzierten Datensatz mit häufigen Arten (auf mindestens fünf Blättern gefunden) durchgeführt. Da für die DCA eine Modifikation des Datensatzes auch bei vielen Nullen nicht erforderlich ist, konnten hier die quantitativen Werte (gefunden auf 1 bis 3 Blättern pro Sammelpunkt) beibehalten werden. Die DCA wurde mit den Standardeinstellungen (Rescale axes = ein, Rescaling threshold = 0. und Number of Segments = 26) durchgeführt. Für alle Ordinationen wurde zunächst eine Ausreißer-Analyse mit Euklidischer Distanz-Messung durchgeführt. Da jedoch die Standardabweichungen nicht übermäßig hoch waren (nur wenig über dem Grenzwert 2), wurden die ermittelten Ausreißer nicht ausgeschlossen (vgl. Hinweise von McCune & Grace 2002, S. 58-61).

Eine Clusteranalyse der Sammelpunkte und der Pilzarten wurde ebenfalls mit dem Programm PC-ORD durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Beobachtungen

In den Petrieschalen bildeten sich Pilzkolonien jeweils an den Schnittflächen am Rand der Blattstückchen aus (Abb. 4.1). Von den Blattflächen, die mit MEA in Berührung waren, ging kein Pilzwachstum aus. Häufig war zu erkennen, dass die Pilze direkt aus den Leitbündeln wuchsen.

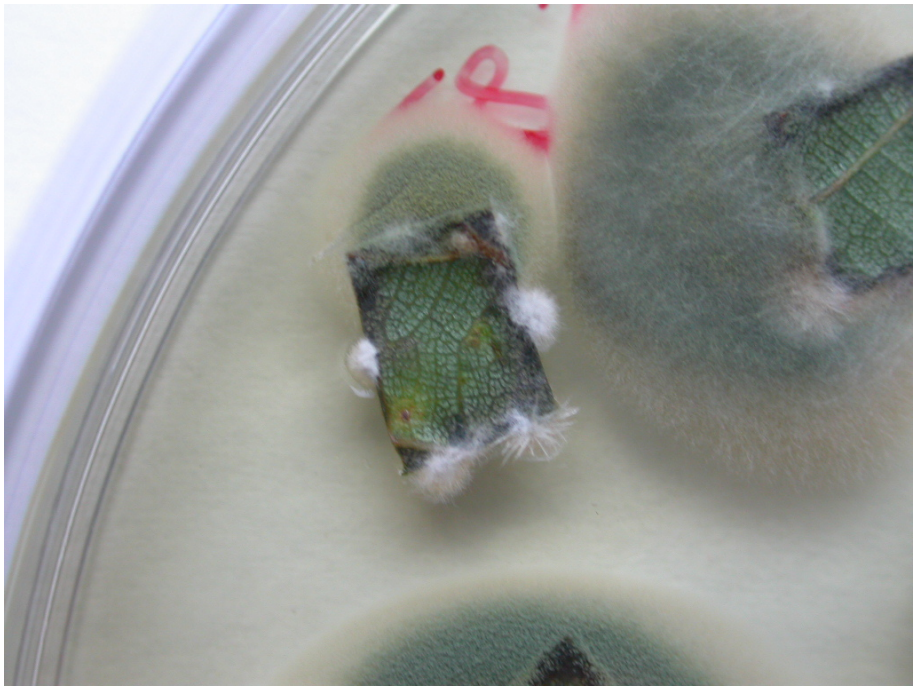

Abbildung 4.1: Oberflächensterilisierte Blattstücken von *Tilia cordata* auf Malzextrakt-Agar. Zu erkennen ist, dass die Pilzkolonien aus den Schnittflächen des Blattes herauswachsen.

Insgesamt war die Anzahl der entstehenden Pilzkolonien und ihre Ausbreitungsgeschwindigkeit über das Nährmedium deutlich größer als bei einer Vergleichsstudie im Frühjahr. Während im Frühjahr z. T. mehrere Wochen vergingen, bis die ersten

Kolonien auftraten und 24,7% der Blätter überhaupt keine Endophyten aufwiesen, waren im Herbst bereits nach sechs Tagen auf allen Platten zahlreiche Kolonien zu erkennen. Dies entsprach einer Infektionsrate der Blätter von 100%.

Von den 406 reinen Isolaten (6 zusätzliche Isolate waren verunreinigt und konnten nicht mehr in Reinkulturen überführt werden) wurden 361 (88,9%) zu 40 Morphospezies (MS) zusammengefasst. Die Merkmale zur Abgrenzung der Gruppen sind Tabelle 8.1 im Anhang zu entnehmen. Die restlichen 45 Isolate (11,1%) konnten nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden. Sie wurden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt, da nur exemplarisch von zwei Vertretern eine Sequenzanalyse gemacht wurde.

4.2 Identifikation der Arten

Von den 40 MS konnten 15 anhand ihrer morphologischen Merkmale bis auf Gattungs- oder Artebene bestimmt werden. Weitere 7 MS sporulierten zwar, konnten jedoch aus Zeitgründen nicht bestimmt werden. 18 MS hatten bis zum Abschluss der Untersuchung keinerlei Sporen gebildet und konnten nur mithilfe der genetischen Untersuchung taxonomisch eingeordnet werden.

4.2.1 Morphologische Bestimmung

Anhand der morphologischen Merkmale konnten 15 der 40 MS auf Gattungs- oder Artebene bestimmt werden:

Alternaria alternata (Fr.) Keissl.

Apiognomonia errabunda (Roberge ex Desm.) Höhn.

Aspergillus niger var. *niger* Tiegh.

Aureobasidium pullulans (de Bary) G. Arnaud

Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G.A. de Vries

Diplodina acerina (Pass.) B. Sutton

Epicoccum nigrum Link

Mycovellosiella fulva (Cooke) Arx

Periconia cookei E.W. Mason & M.B. Ellis

Phoma sp. 1

Phoma sp. 2

Phomopsis sp.

Sordaria fimicola (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.

Sordaria humana (Fuckel) G. Winter

Xylaria sp.

4.2.2 Taxonomische Einordnung der Morphospezies mit Maximum Parsimonie Analysen

Im strikten Konsensusbaum einer Maximum Parsimonie Analyse formten die 40 MS einen Ast mit 31 Referenzarten der Ascomycetes (Abb. 4.2). Dieser wiederum teilte sich in zwei Clades, von denen einer die Vertreter der Sordariomycetidae, der zweite die Vertreter der Dothideomycetidae umfasste. Bei den Sordariomycetidae wurden vier Gruppen unterschieden, die in weiteren Maximum Parsimonie Analysen untersucht wurden: Vertreter der Sordariales clusterten mit MS 15 und MS 23 sowie *Sordaria fimicola* und *Sordaria humana*, zwei MS, die morphologisch bestimmt werden konnten. In einem Clade mit Vertretern der Valsaceae lagen *Phomopsis* sp., *Apiognomonia errabunda*, *Diplodina acerina* und MS 28. Weiterhin clusterten *Xylaria* sp. 1, MS 13 und MS 20 mit Vertretern der Xylariaceae. Die restlichen MS, die sich in die Sordariomycetidae einordneten (MS 16, 17 und 24) clusterten mit *Fusarium lateritium* bzw. *Colletotrichum acutatum* und wurden in einer gemeinsamen Analyse untersucht. Bei den Dothideomycetidae konnten in der ersten Analyse zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen clusterten in einem Clade zahlreiche Vertreter der Ordnung Pleosporales mit 16 MS und den beiden Sequenzen aus der Restgruppe, die keiner MS zugeordnet werden konnte. Zum anderen clusterten auf drei parallelen Ästen sechs MS mit Vertretern der Mycosphaerellales. In einen dieser Äste ordnete sich auch ein Vertreter der Venturiaceae. Diese drei Äste wurden gemeinsam untersucht.

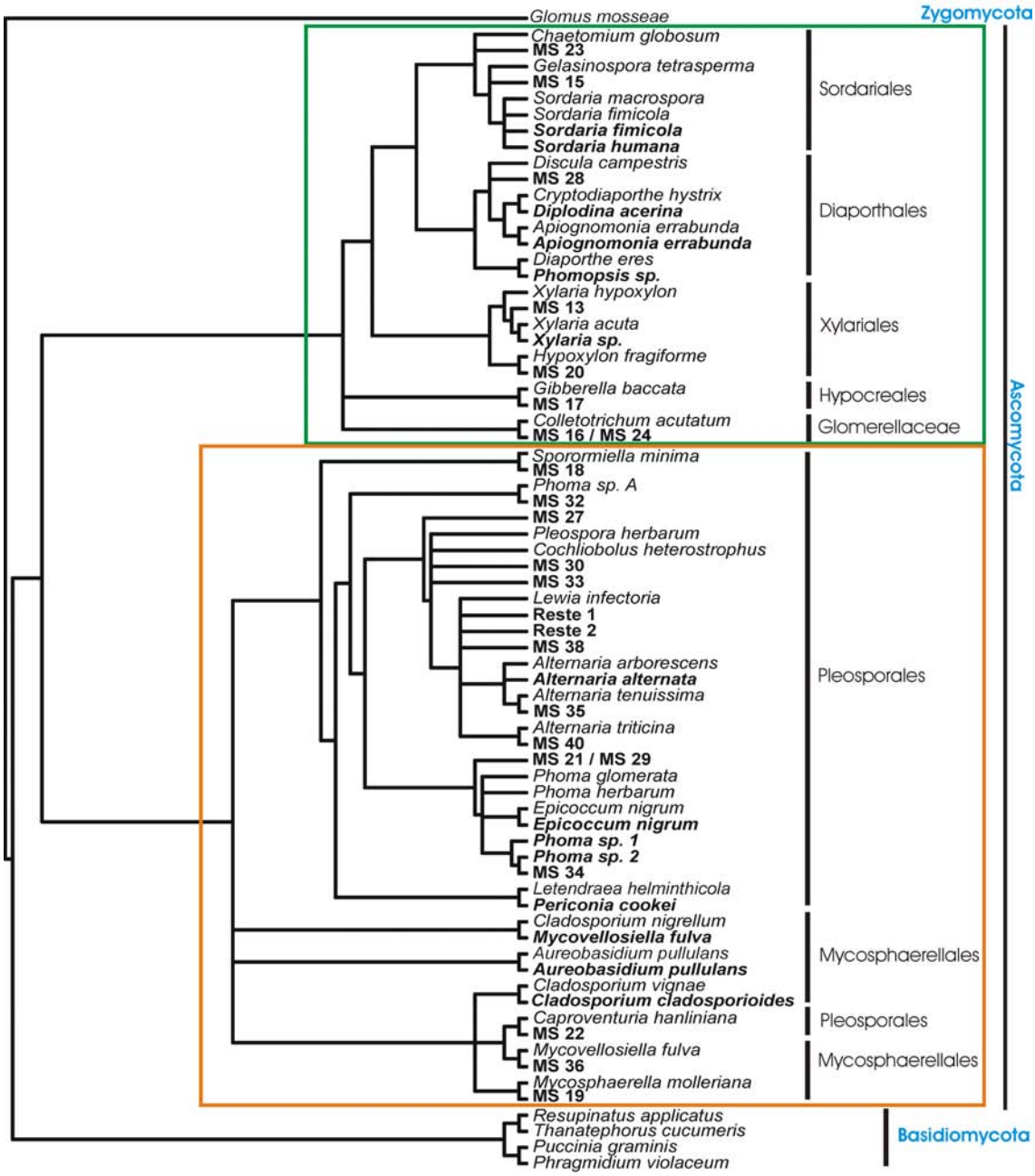

Abbildung 4.2: Phylogenetischer Baum von endophytischen Pilzen, die aus verschiedenen Baumarten isoliert wurden (fett gedruckt), sowie Referenzsequenzen. Dargestellt ist ein strikter Konsensusbaum einer Maximum Parsimonie Analyse von Sequenzen der D1/D2 Region der großen ribosomalen Untereinheit (CI=0,48; RI=0,85). *Glomus mossae* diente als Außengruppe. Grün eingerahmt ist die Unterklasse Sordariomycetidae, orange die Unterklasse Dothideomycetidae.

MS 15 und MS 23

Basierend auf der anfänglichen Analyse wurden für die genauere Einordnung von MS 15 und 23 sechzehn Arten aus der Familie Sordariaceae und fünf Arten der Chaetomiaceae gewählt, die die besten in GenBank gefundenen Vergleichssequenzen umfassten und zusätzlich je ein Vertreter aus fünf weiteren Familien der Ordnung Sordariales (Cephalothecaceae, Chaetosphaeriaceae, Coniochaetaceae, Lasiosphaeriaceae und Nitschkiaceae). Dazu kam je eine Sequenz von *Sordaria fimicola* und *Sordaria humana*, zwei Arten, die bereits in der morphologischen Untersuchung bestimmt werden konnten. Als Außengruppe wurde *Cladosporium cladosporioides*, ein Vertreter der Dothideomycetidae, gewählt. Das Alignment dieser 31 Sequenzen hatte eine Länge von 491 Basen. Davon waren 292 konstant, 101 variabel, aber parsimonie-uninformativ und 98 parsimonie-informativ.

Der strikte Konsensusbaum (Baumlänge = 365) zeigte, dass *Sordaria humana*, *Sordaria fimicola* und MS 15 einen Zweig mit den anderen Sordariaceen-Arten mit einem Bootstrap-Wert von 100% bildeten (Abb. 4.3). Der Clade innerhalb der Sordariaceen mit einem Bootstrap-Wert von 70%, in dem sowohl MS 15 als auch *S. humana* und *S. fimicola* lagen, umfasste nur Arten der Gattung *Sordaria*. Der Subclade, in den sich *Sordaria fimicola* und *Sordaria humana* einordneten, nicht aber MS 15, trennte sich mit einem Bootstrap-Wert von 95% ab. MS 23 lag in einem Clade mit allen untersuchten Arten der Chaetomiaceae. Der Bootstrap-Wert für diesen Clade betrug 58%.

MS 28 und *Phomopsis* sp.

Für die genauere systematische Analyse von *Phomopsis* sp. und MS 28 wurden zwölf Vertreter der Valsaceae ausgewählt. Diese schlossen die besten Suchergebnisse in GenBank für die vier MS ein, die sich in diese Gruppe einordneten. Zusätzlich wurden *Melanconis stilbostoma* und *Hercospora tiliae* (Melanconidaceae, Diaporthales) einbezogen sowie mit zwei Sequenzen von *Apiognomonia errabunda* und einer Sequenz von *Diplodina acerina* Vertreter zweier Morphogruppen, die morphologisch bestimmt werden konnten. Wieder wurde *Cladosporium cladosporioides* als Außengruppe gewählt. Das Alignment dieser 20 Sequenzen hatte eine Länge von 497 Ba-

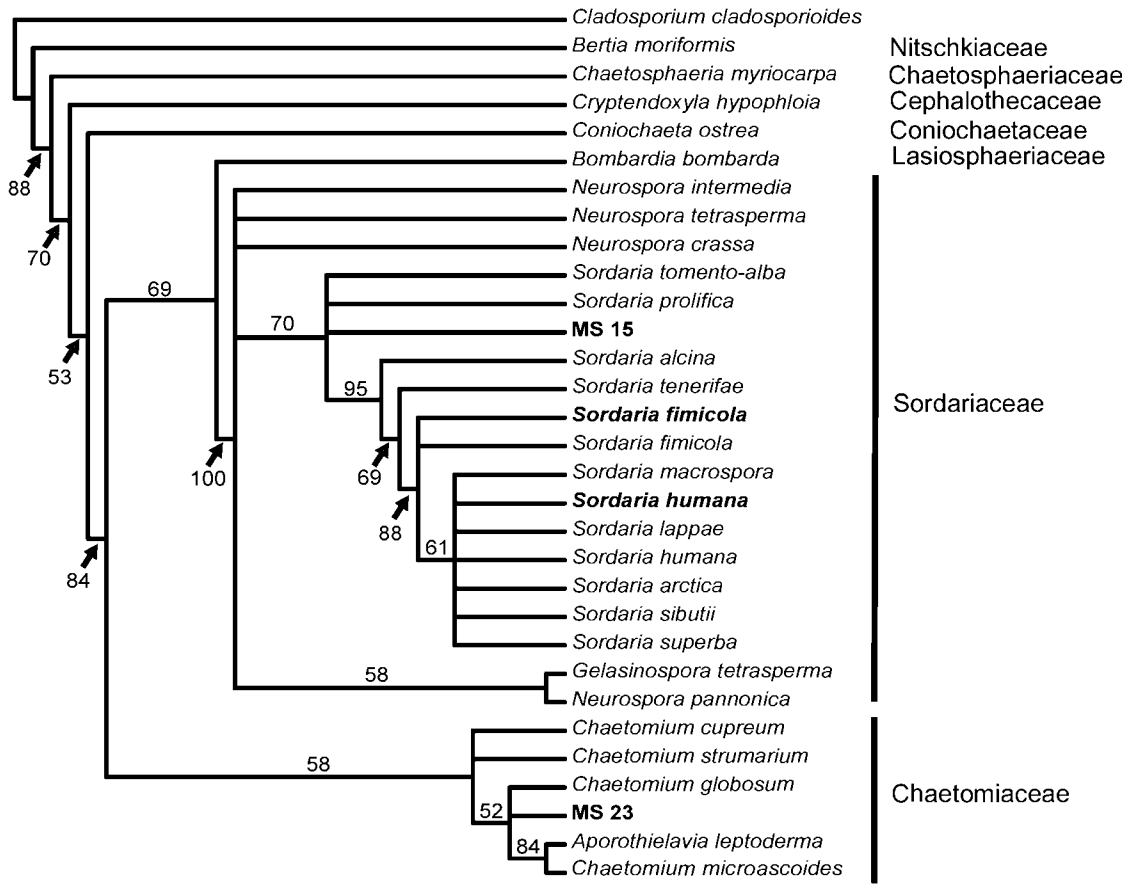

Abbildung 4.3: Phylogenetischer Baum von blattbewohnenden endophytischen Pilzen des Untersuchungsgebiets (fett gedruckt) und Referenzsequenzen aus der Ordnung Sordariales. Dargestellt ist der strikter Konsensusbaum einer Maximum Parsimonie Analyse von Sequenzen der D1/D2 Region der großen ribosomalen Untereinheit (CI=0,71; RI=0,75). *Cladosporium cladosporioides* diente als Außengruppe. Die Zahlen auf den Ästen zeigen die Bootstrap-Werte von 1000 Replikaten.

sen. 361 waren konstant, 68 variable Stellen waren parsimonie-uninformativ und 68 waren parsimonie-informativ.

Der strikte Konsensusbaum (Abb. 4.4) hatte eine Baumlänge von 208. *Phomopsis* sp. clusterte in einen Clade mit 100% Bootstrap-Wert mit fünf Arten von *Diaporthe*, der Teleomorphen von *Phomopsis*. Alle sechs Sequenzen in diesem Clade waren zu einer Polytomie zusammengefasst.

MS 28 lag in einem Clade mit 68% Bootstrap-Wert mit Vertretern verschiedener Gattungen der Familie Valsaceae. In einem Subclade mit 100% Bootstrap Bestätigung clusterten die beiden Sequenzen von *Apiognomonium errabunda* mit einer Referenzsequenz dieser Art. Die Gruppierung von *Diplodina acerina* mit einer Re-

ferenz der zugehörigen Teleomorphe *Cryptodiaporthe hystrix* in einem zweiten Subclade war mit einem Bootstrap-Wert von 79% abgesichert.

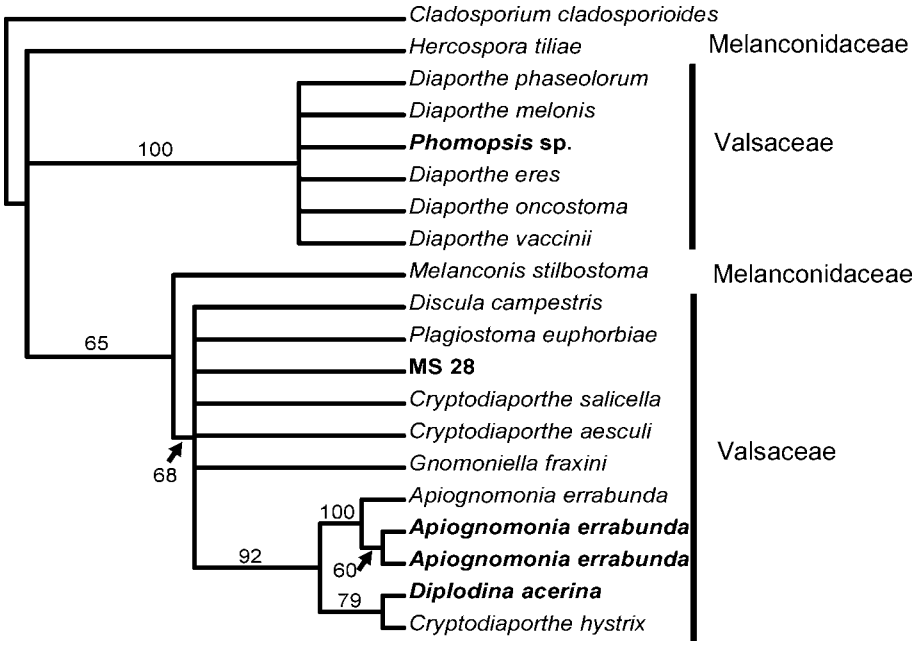

Abbildung 4.4: Phylogenetischer Baum von blattbewohnenden endophytischen Pilzen des Untersuchungsgebietes (fett gedruckt) sowie Referenzsequenzen aus der Ordnung Diaporthales. Dargestellt ist der strikte Konsensusbaum einer Maximum Parsimonie Analyse von Sequenzen der D1/D2 Region der großen ribosomalen Untereinheit (CI=0,80; RI=0,88). *Cladosporium cladosporioides* diente als Außengruppe. Die Zahlen auf den Ästen zeigen die Bootstrap-Werte von 1000 Replikaten.

MS 13, MS 20 und *Xylaria* sp.

Für die Einordnung von MS 13 und 20 sowie von zwei Sequenzen einer MS, die als *Xylaria* sp. morphologisch bestimmt werden konnte, wurden zehn Referenzsequenzen der Familie Xylariaceae und sechs Vertreter von fünf weiteren Familien der Xylariales (Cainiaceae, Diatrypaceae, Graphostromataceae, Hyponectriaceae und Clypeosphaeriaceae) ausgewählt. Zusätzlich wurde je ein Vertreter der Ordnungen Diaporthales, Hypocreales, Phyllachorales und Sordariales, die wie die Xylariales zur Unterklasse Sordariomycetidae gehören, eingeschlossen. *Cladosporium cladosporioides* fungierte als Außengruppe. Das Alignment dieser 28 Sequenzen war 490 Basen lang. Davon waren 324 konstant, 67 parsimonie-uninformativ und 106 parsimonie-informativ.

Da die Maximum Parsimonie Analyse eine hohe Homoplasie aufwies (Retention

Index RI=0,10) und Parsimonie-Analysen für Datensätze mit großer Homoplasie problematisch sind (Knoop & Müller 2006, Kapitel 9.2), wurde zusätzlich eine Analyse mit der Neighbor-Joining Methode (Kimura 2-parameter Modell) durchgeführt. In dem so ermittelten Baum gruppieren die Vertreter der Xylariales zusammen mit den untersuchten MS in einem Clade, der durch einen Bootstrap-Wert von 67% abgesichert war (Abb. 4.5). Darin bildeten die Xylariaceae jedoch keinen eigenen Subclade.

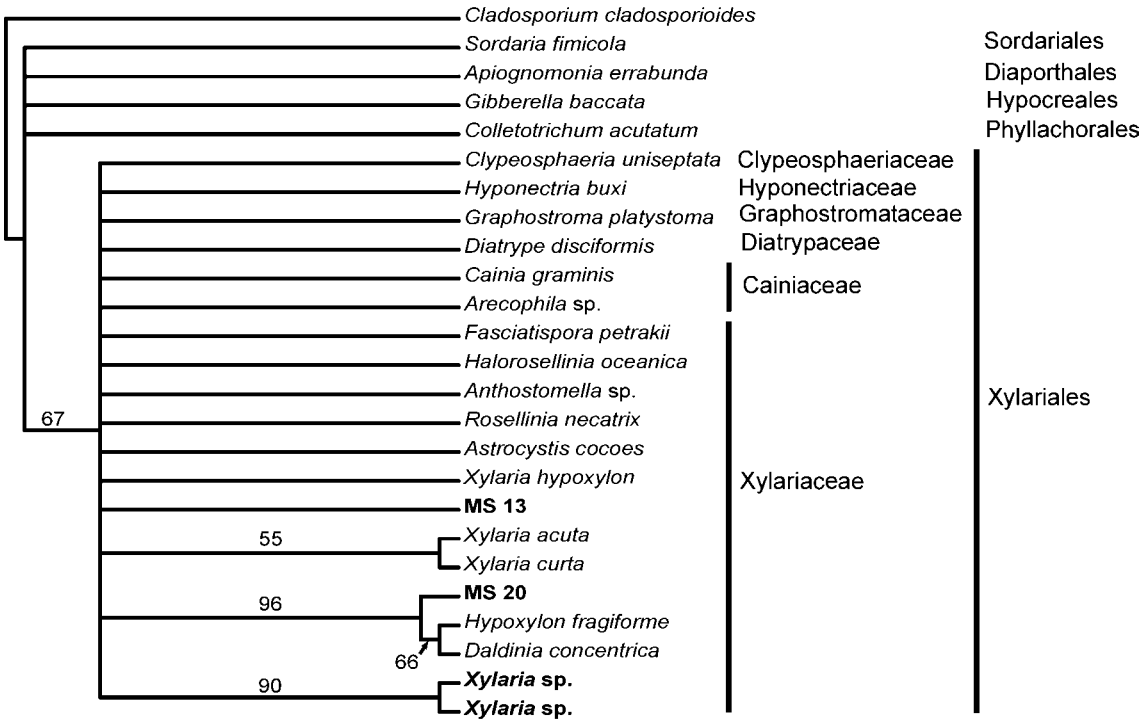

Abbildung 4.5: Phylogenetischer Baum von blattbewohnenden endophytischen Pilzen des Untersuchungsgebietes (fett gedruckt) sowie Referenzsequenzen der Sordariomycetidae. Dargestellt ist der strikte Konsensusbaum einer Neighbor-Joining Analyse (Kimura 2-parameter Modell) von Sequenzen der D1/D2 Region der großen ribosomalen Untereinheit. *Cladosporium cladosporioides* diente als Außengruppe. Die Zahlen auf den Ästen zeigen die Bootstrap-Werte von 1000 Replikaten.

MS 16, MS 17 und MS 24

Für die Untersuchung von MS 17 wurde zunächst von den besten Treffer in GenBank jeweils ein Vertreter pro Art ausgewählt. Insgesamt acht verschiedene Arten der Gattung *Gibberella* und ihrer Anamorphe *Fusarium* aus der Familie Nectriaceae wurden einbezogen. Zusätzlich wurden mit *Nectria haematococca*, *N. cinnabarina*

und *Cosmospora coccinea* drei Vertreter aus anderen Gattungen der Nectriaceae eingeschlossen. Je eine Art der Familien Bionectriaceae, Clavicipitaceae und Hypocreaceae (alles Hypocreales) wurden ebenfalls einbezogen. Die besten Treffer in GenBank für MS 16 bzw. MS 24 (die untersuchte Sequenz war für beide MS identisch) gehörten alle zur Gattung *Glomerella* und ihrer Anamorphen *Colletotrichum* aus der monotypischen Familie Glomerellaceae. Zusätzlich wurde je ein Vertreter der Sordariales, Xylariales und Diaporthales in die Analyse einbezogen. Das Alignment dieser 25 Arten umfasste 523 Basen, von denen 337 konstant, 66 variabel, aber parsimonie-uninformativ und 120 parsimonie-informativ waren.

Im strikten Konsensusbaum mit einer Baumlänge von 494 clusterten alle Vertreter der Hypocreales und der Glomerellaceae in einem Clade mit einem Bootstrap-Wert von 61% (Abb. 4.6). In einem mit 100% Bootstrap-Wert abgesicherten Subclade trennten sich wiederum alle Vertreter der Gattung *Glomerella* und ihrer Anamorphe *Colletotrichum* sowie MS 16 und 24 von den Hypocreales ab. Obwohl die Sequenz für MS 16 und 24 im untersuchten Bereich identisch war, waren beide Gruppen morphologisch deutlich verschieden (s. Tab. 8.1) und wurden daher als zwei getrennte Arten behandelt.

MS 17 ordnete sich innerhalb der Hypocreales in einen Zweig ein, der alle untersuchten Vertreter der Gattung *Gibberella* und ihrer Anamorphe *Fusarium* umfasste und mit einem 99% Bootstrap-Wert sehr gut abgesichert war.

MS 19, 22 und 36

MS 19, 22 und 36 wurden gemeinsam mit Vertretern der Dothideomycetidae untersucht. Es wurden jeweils die besten Treffer der Suche in GenBank sowie weitere Arten eingeschlossen. Insgesamt umfasste die Untersuchung acht Arten der Gattung *Mycosphaerella* und ihrer Anamorphen *Cladosporium* und *Mycovellosiella* (Mycosphaerellaceae, Mycosphaerellales). Zusätzlich wurden zwei Arten mit unsicherem Stand, jeweils ein Vertreter der Ordnungen Hysteriales und Coryneliales, fünf Arten der Dothideales sowie drei Vertreter der Pleosporales, davon zwei Venturiaceen, eingeschlossen. Von den bereits morphologisch bestimmten Arten wurden zwei Sequenzen von *Cladosporium cladosporioides*, eine von *Mycovellosiella fulva* und eine von

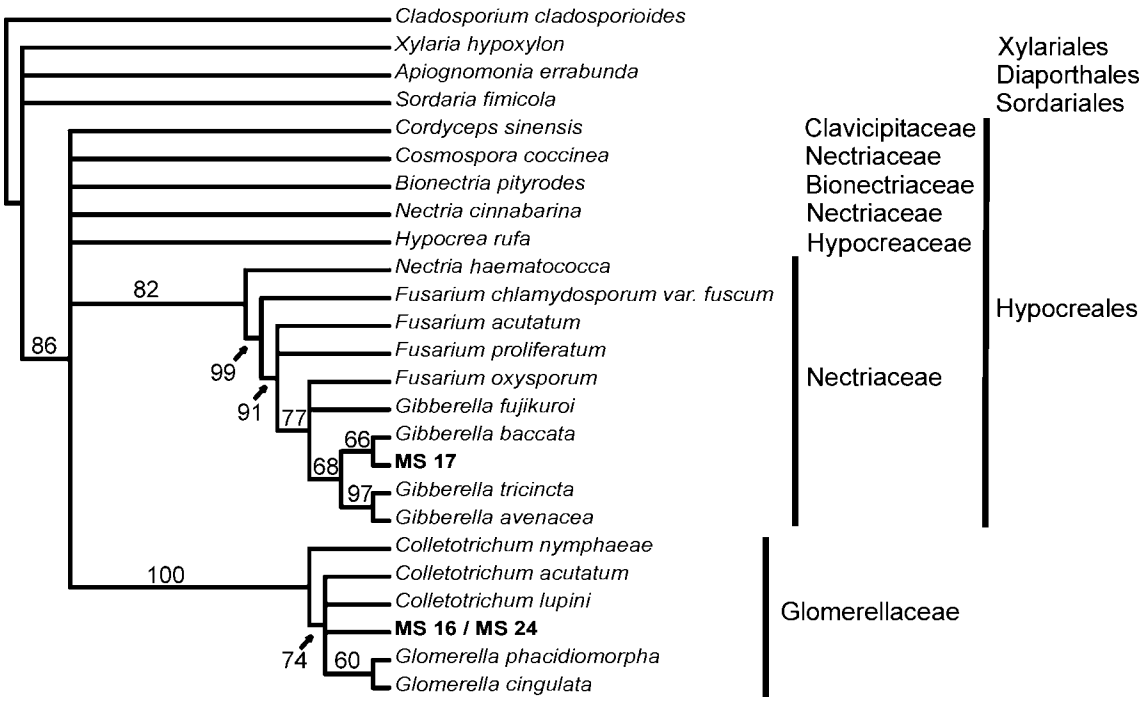

Abbildung 4.6: Phylogenetischer Baum von blattbewohnenden endophytischen Pilzen des Untersuchungsgebietes (fett gedruckt) sowie Referenzsequenzen der Sordariomycetidae. Dargestellt ist der strikte Konsensusbaum einer Maximum Parsimonie Analyse von Sequenzen der D1/D2 Region der großen ribosomalen Untereinheit (CI=0,59; RI=0,72). *Cladosporium cladosporioides* diente als Außengruppe. Die Zahlen auf den Ästen zeigen die Bootstrap-Werte von 1000 Replikaten.

Aureobasidium pullulans in die Untersuchung einbezogen. *Sordaria fimicola* diente als Außengruppe. Das Alignment der insgesamt 30 Sequenzen umfasste 490 Basen, wovon 254 konstant, 60 parsimonie-uninformativ und 176 parsimonie-informativ waren. Der Baum hatte eine Länge von 654.

MS 19, 22 und 36 clusterten in einem Clade mit 82% Bootstrap-Wert mit zahlreichen *Mycosphaerella*-Arten bzw. deren Anamorphen *Cladosporium* und *Mycovellosiella* sowie einer der beiden Venturiaceen-Arten und *Hortaea werneckii*, einer Art mit unsicherem Stand (Abb. 4.7). MS 36 clusterte darin in einem Subclade (Bootstrap-Wert 93%) mit zwei Mycosphaerellaceen-Arten. MS 22 lag mit *Venturia hanliniana* (Venturiaceae) in einem Subclade mit 76% Bootstrap-Wert innerhalb der Mycosphaerellaceae. In einem Subclade (Bootstrap-Wert 98%) mit MS 19 lag neben *Mycosphaerella molleriana* auch *Hortaea werneckii*, eine Art mit unsicherem systematischen Stand innerhalb der Ascomycetes.

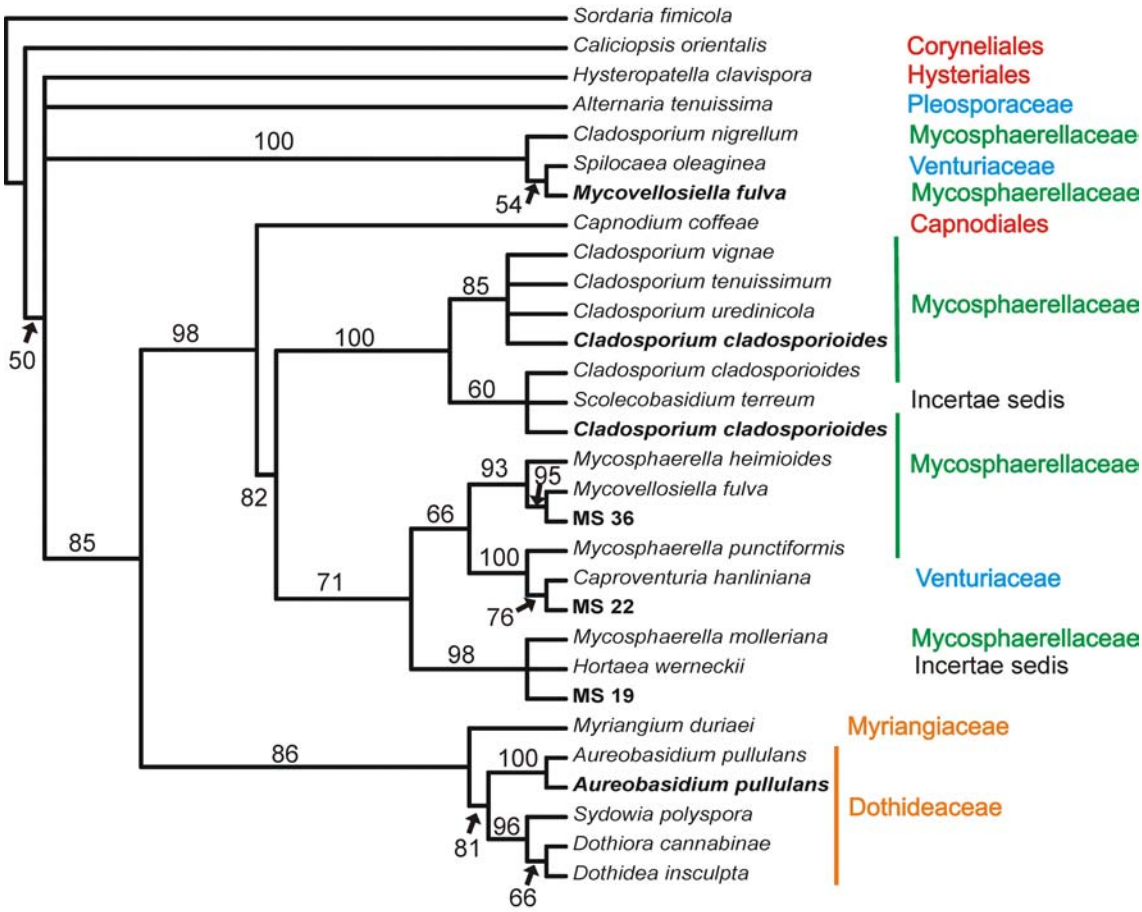

Abbildung 4.7: Phylogenetischer Baum von blattbewohnenden endophytischen Pilzen des Untersuchungsgebietes (fett gedruckt) sowie Referenzsequenzen der Dothideomycetidae. Dargestellt ist der strikte Konsensusbaum einer Maximum Parsimonie Analyse von Sequenzen der D1/D2 Region der großen ribosomalen Untereinheit (CI=0,60; RI=0,76). *Sordaria fimicola* diente als Außengruppe. Die Zahlen auf den Ästen zeigen die Bootstrap-Werte von 1000 Replikaten. Die Farben stellen die Zugehörigkeit zu den Ordnungen Pleosporales (blau), Mycosphaerellales (grün), Dothideales (orange) sowie anderen Ordnungen (rot) dar.

Die restlichen 11 Morphospezies sowie *Phoma* sp. 1 und 2

Um die restlichen 11 MS und die *Phoma* Spezies 1 und 2 genauer einzuordnen, wurden jeweils die besten Treffer in GenBank sowie weitere Vertreter der Pleosporales ausgewählt. Insgesamt wurden 24 Vertreter aus sechs Familien der Ordnung Pleosporales, eine Art mit unsicherem Stand innerhalb der Pleosporales und zwei Arten mit unsicherem Stand innerhalb der Dothideomycetidae in die Untersuchung einbezogen. Drei Arten, die bereits morphologisch bestimmt werden konnten, wurden ebenfalls eingeschlossen. Als Außengruppe diente *Sordaria fimicola*. Das Alignment aus diesen 47 Sequenzen umfasste 488 Basen. Davon waren 330 konstant, 75 parsimonie uninformativ und 83 parsimonie informativ. Die Maximum Parsimonie Analyse ergab einen strikten Konsensusbaum mit einer Baumlänge von 326.

Einen mit 100% Bootstrap-Wert abgesicherten Clade bildete MS 18 mit zwei *Sporormiella*-Arten (Abb. 4.8). Der Clade, in dem MS 35, 38 und 40 lagen, hatte einen Bootstrap-Wert von 59%. Er umfasste alle zehn Arten der Gattung *Lewia* und deren Anamorphe *Alternaria*, die in die Analyse eingeschlossen wurden, auch die beiden Sequenzen von *Alternaria alternata*, die bereits morphologisch bestimmt werden konnten. MS 27, 30 und 33 lagen in einem größeren Clade mit 100% Bootstrap-Absicherung, in dem bis auf eine Art mit unsicherem Stand nur Pleosporaceen gruppierten.

Der Clade, in dem MS 21 und 29 lagen, umfasste vorwiegend Leptosphaeriaceae. Es lagen jedoch auch eine Art der Pleosporaceen sowie zwei Arten mit unsicherem Stand darin. In einem Subclade, der mit 100% Bootstrap-Wert als sicher angesehen werden konnte, clusterte MS 34 mit einer *Phoma*-Art. Ebenfalls in diesen Ast ordneten sich die Phoma-Arten 1 und 2, die morphologisch nur bis auf Gattungsrang bestimmt werden konnten.

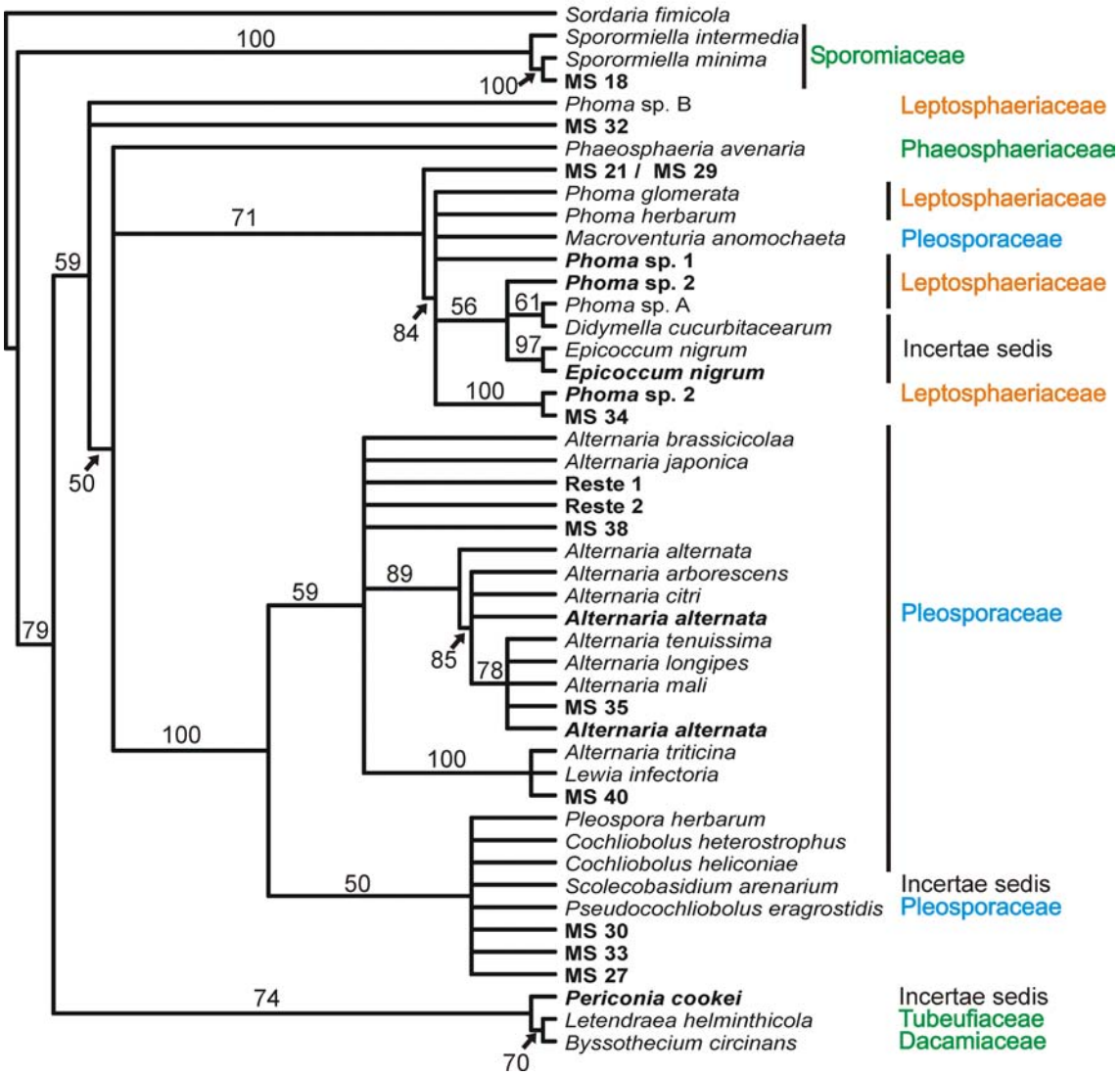

Abbildung 4.8: Phylogenetischer Baum von blattbewohnenden endophytischen Pilzen des Untersuchungsgebietes (fett gedruckt) sowie Referenzsequenzen der Pleosporales. Dargestellt ist der strikte Konsensusbaum einer Maximum Parsimonie Analyse von Sequenzen der D1/D2 Region der großen ribosomalen Untereinheit (CI=0,62; RI=0,81). *Sordaria fimicola* diente als Außengruppe. Die Zahlen auf den Ästen zeigen die Bootstrap-Werte von 1000 Replikaten. Die Farben verdeutlichen die Zugehörigkeit zu den Familien Pleosporaceae (blau), Leptoshaeriaceae (orange) und anderen Familien (grün).

4.2.3 Resultierende Artenliste

Als Resultat der morphologischen und genetischen Untersuchungen wurde die in Tabelle 4.1 aufgeführte Artenliste erstellt. Für die MS 26, 37 und 39 konnte keine erfolgreiche PCR bzw. Sequenzierung erzielt werden. Auch eine morphologische Identifizierung dieser Isolate war nicht möglich, da keine Sporen gebildet wurden.

Tabelle 4.1: Artenliste blattbewohnender endophytischer Pilze des Untersuchungsgebietes. Für Arten, die nur über die phylogenetische Untersuchung der D1/D2-Region bestimmt wurden, ist die in der Untersuchung verwendete Morphospeziesnummer mit angegeben. Morphospezies, bei denen keinerlei taxonomischer Rang angegeben ist, konnten weder morphologisch noch genetisch näher bestimmt werden.

Art / taxonomische Einordnung	**Morphospezies**
Alternaria alternata (Fr.) Keissl.	
Apiognomonia errabunda (Roberge ex Desm.) Höhn.	
Aspergillus niger var. *niger* Tiegh.	
Aureobasidium pullulans (de Bary) G. Arnaud	
Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G.A. de Vries	
Diplodina acerina (Pass.) B. Sutton	
Epicoccum nigrum Link	
Gibberella sp.	MS 17
Glomerella sp. 1	MS 16
Glomerella sp. 2	MS 24
Lewia sp. 1	MS 38
Lewia sp. 2	MS 35
Lewia sp. 3	MS 40
Mycovellosiella fulva (Cooke) Arx	
Periconia cookei E.W. Mason & M.B. Ellis	
Phoma sp. 1	
Phoma sp. 2	
Phomopsis sp.	
Sordaria fimicola (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	
Sordaria humana (Fuckel) G. Winter	
Sordaria sp.	MS 15
Xylaria sp.	
Chaetomiaceae	MS 23
Leptosphaeriaceae	MS 34
Mycosphaerellaceae 1	MS 36
cf. Mycosphaerellaceae 2	MS 19
Pleosporaceae 1	MS 27
Pleosporaceae 2	MS 30
Pleosporaceae 3	MS 33
Pleosporales 1	MS 21
Pleosporales 2	MS 29
Pleosporales 3	MS 32
Sporormiaceae	MS 18
Valsaceae	MS 28
cf. Venturiaceae	MS 22
Xylariales 1	MS 13
Xylariales 2	MS 20
MS 26	
MS 37	
MS 39	

In Abbildung 4.9 ist die Anzahl der mit den jeweiligen Arten infizierten Blätter dargestellt. Auffällig dabei war, dass nur drei Arten (*Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* und *Aureobasidium pullulans*) sehr häufig waren, d. h. in mehr als 30 der untersuchten 96 Blätter vorkamen. 13 Arten waren häufig, sie tauchten in fünf bis 17 Blättern auf. Die restlichen 24 Arten, also 60% der gesamten Artenzahl, waren selten oder sehr selten. Sie konnten nur in maximal drei Blättern gefunden werden.

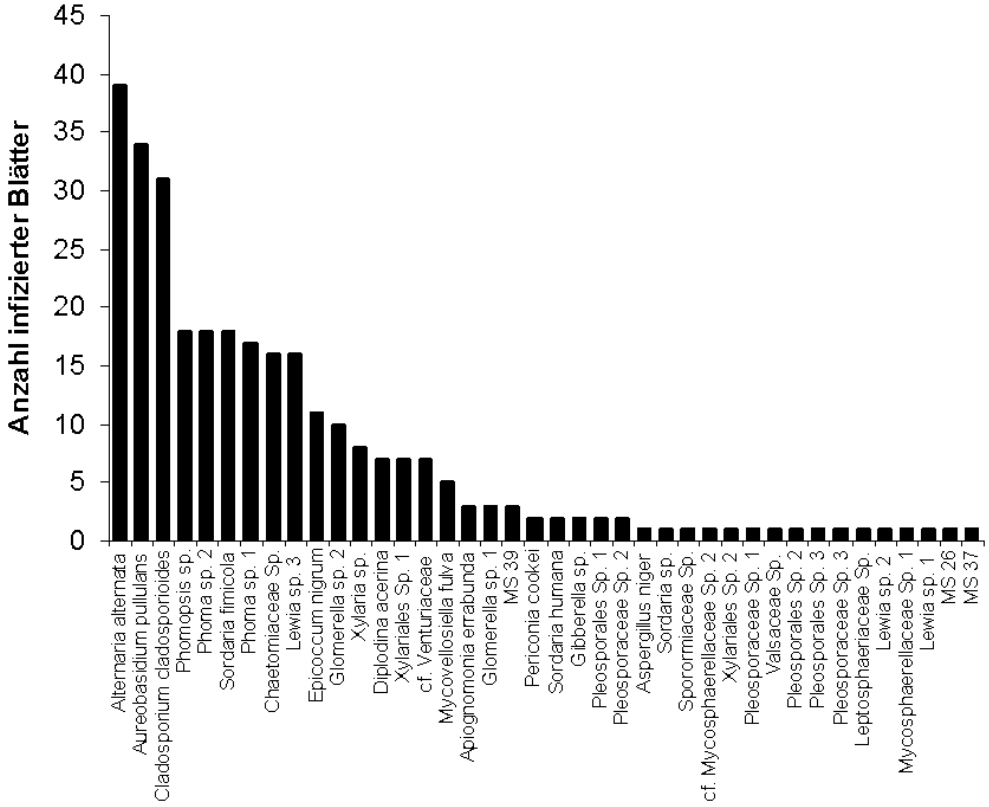

Abbildung 4.9: Häufigkeit der endophytischen Pilze, die im Untersuchungsgebiet gefunden werden konnten, geordnet nach der Zahl der von ihnen infizierten Blätter.

4.3 Artenakkumulationskurven und Schätzwerte der Artenvielfalt

Beim Betrachten der auf Sammelpunkten basierenden Rarefaction-Kurve war zu erkennen, dass sich die Kurve noch keiner Sättigung annäherte, sondern kontinuier-

lich anstieg. Dementsprechend gingen auch die Schätzwerte mit 61,33 (Chao2) und 64,06 (ICE) noch weit über die ermittelten 40 Arten hinaus. Allerdings lagen die Schätzwerte der beiden Estimatoren dicht beieinander (Abb. 4.10).

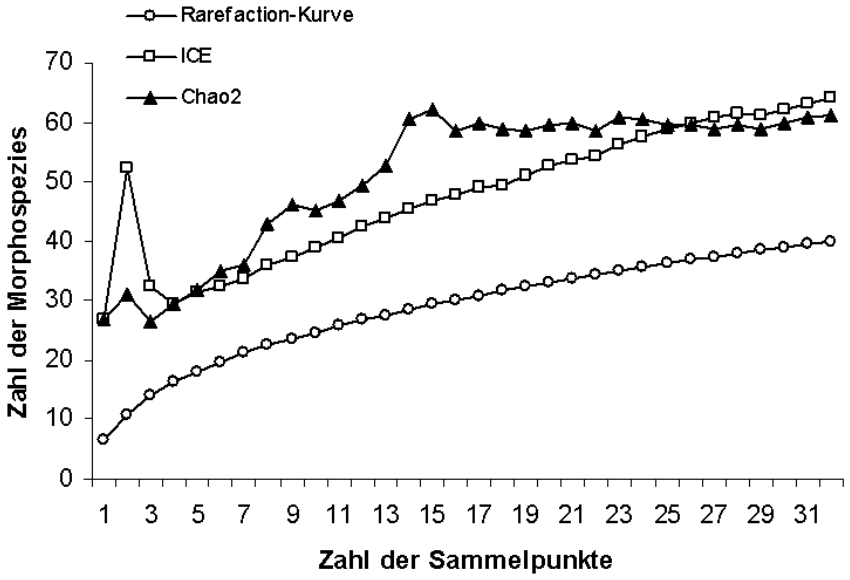

Abbildung 4.10: Sammelpunkt-basierte Rarefaktion-Kurve der endophytischen Pilze (Morphospezies), die im Untersuchungsgebiet gefunden wurden. Außerdem sind die Estimatoren Chao2 und ICE aufgetragen.

Der Vergleich der Rarefaction-Kurven verschiedener Habitate, nämlich zum einen der vier Baumarten (Abb. 4.11) und zum anderen von Licht- und Schattenblättern (Abb. 4.12), zeigte kaum Unterschiede in der Diversität der verschiedenen Habitate. Insgesamt wurden in *Acer* 22 Arten, in *Fraxinus* und *Tilia* 21 Arten, in *Quercus* 20 Arten gefunden, in den Lichtblättern waren es 27, in den Schattenblättern 31 Arten. Zur Verdeutlichung wurden für die Kurven der Licht- und Schattenblätter jeweils die 95% Intervalle mit eingezeichnet. Jede Kurve lag im 95% Intervall der anderen, war also nicht signifikant von ihr verschieden. Für alle Rarefaction-Kurven war der Sättigungsbereich noch nicht erreicht.

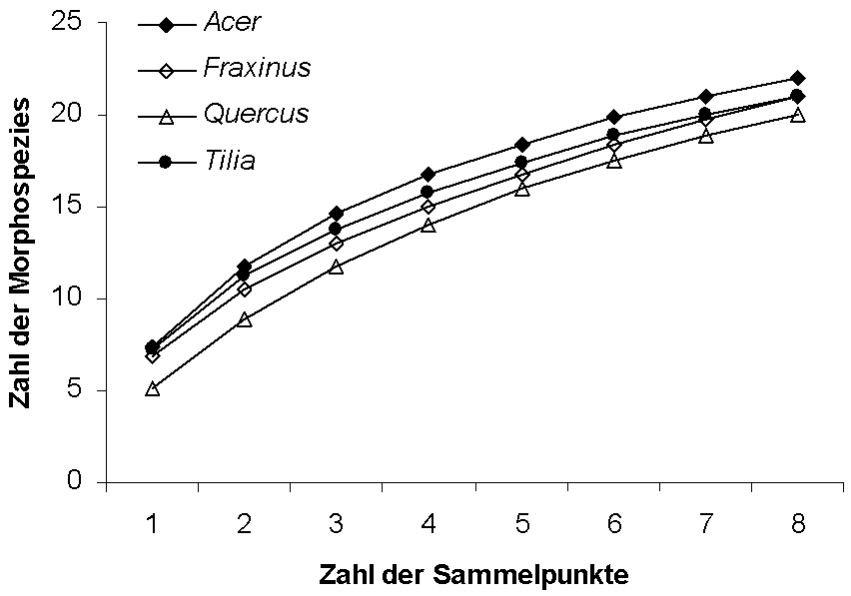

Abbildung 4.11: Sammelpunkt basierte Rarefaction-Kurven für endophytische Pilze, die aus Blättern von *Acer pseudoplatanus*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur* und *Tilia cordata* im Untersuchungsgebiet an acht Sammelpunkten pro Baumart isoliert wurden.

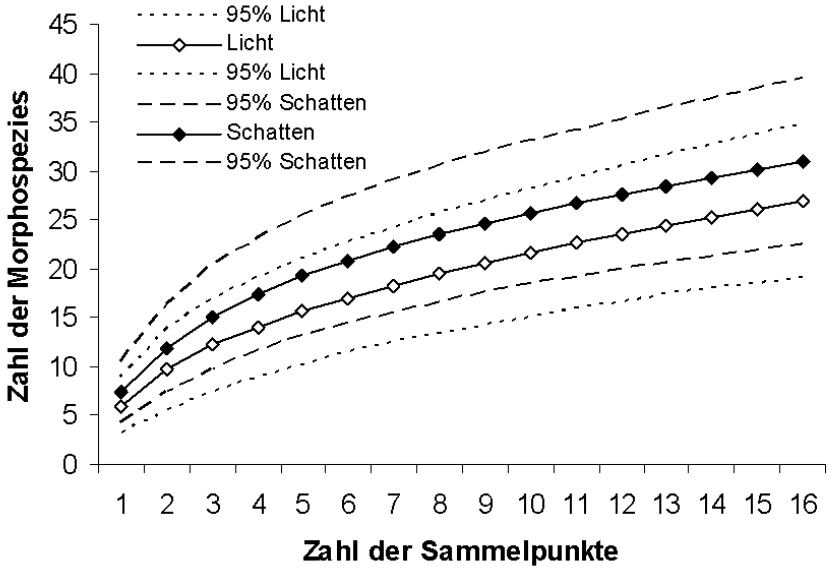

Abbildung 4.12: Sammelpunkt basierte Rarefactionkurven für endophytische Pilze, die aus Licht- und Schattenblättern verschiedener Baumarten im Untersuchungsgebiet an jeweils 16 Sammelpunkten isoliert wurden. Zu jeder Kurve sind die 95% Confidence-Intervalle mit aufgetragen.

4.4 Ergebnisse der Analysen mit multivariater Statistik

Die Wirts- und Substratspezifität wurde mit verschiedenen multivariaten Analysen untersucht. Abgesehen von wenigen Ausnahmen konnte mit diesen Analysen keine Wirtsspezifität festgestellt werden. Eine Abhängigkeit vom Substrat in Form von Licht- und Schattenblättern konnte indirekt durch den Zusammenhang der Endophytenverteilung mit den Umweltfaktoren Sammelhöhe und Lichteinfall festgestellt werden.

4.4.1 NMS und DCA

Das Ergebnis einer NMS für Pilze, die in mehr als einem Blatt gefunden werden konnten, ist in Abbildung (Abb. 4.13) dargestellt. Die Pilzarten gruppierten dabei deutlich im Centroid (Schwerpunkt) der Verteilung der Sammelpunkte. Es war weiterhin keine Beziehung der Pilze zu ihren Wirtsbaumarten zu erkennen. Auch eine Verteilung auf deutlich voneinander getrennte Gruppen gab es sowohl bei den Baumarten als auch bei den Pilzen nicht. Ähnliche Ergebnisse lieferten eine NMS mit der kompletten Matrix sowie eine DCA mit und ohne seltene Arten, die sind daher nicht abgebildet sind.

Die Vektoren für die Umweltparameter Sammelhöhe und Intensität des einfallenden Lichtes (gemessen als Grad der Bedeckung der Lichteinfallsfläche durch andere Blätter), lagen nahezu auf einer Geraden in entgegengesetzte Richtungen (Abb. 4.14 A/B). Der wichtigste Parameter (Sammelhöhe) wurde durch Drehen um 75° parallel zur Achse 1, der Achse mit dem höchsten Erklärungswert (62,7%), angeordnet. Damit hatten Höhe und Lichtexposition von den in die Untersuchung einbezogenen Parametern den besten Erklärungswert, wobei die Höhe den größeren Anteil daran hatte (längerer Vektor). Der Vektor, der die Größe der Blattfläche beschreibt, ordnete sich hauptsächlich entlang Achse 3 an (Abb. 4.14 B/C), die jedoch mit 4% nur einen sehr geringen Erklärungswert besaß.

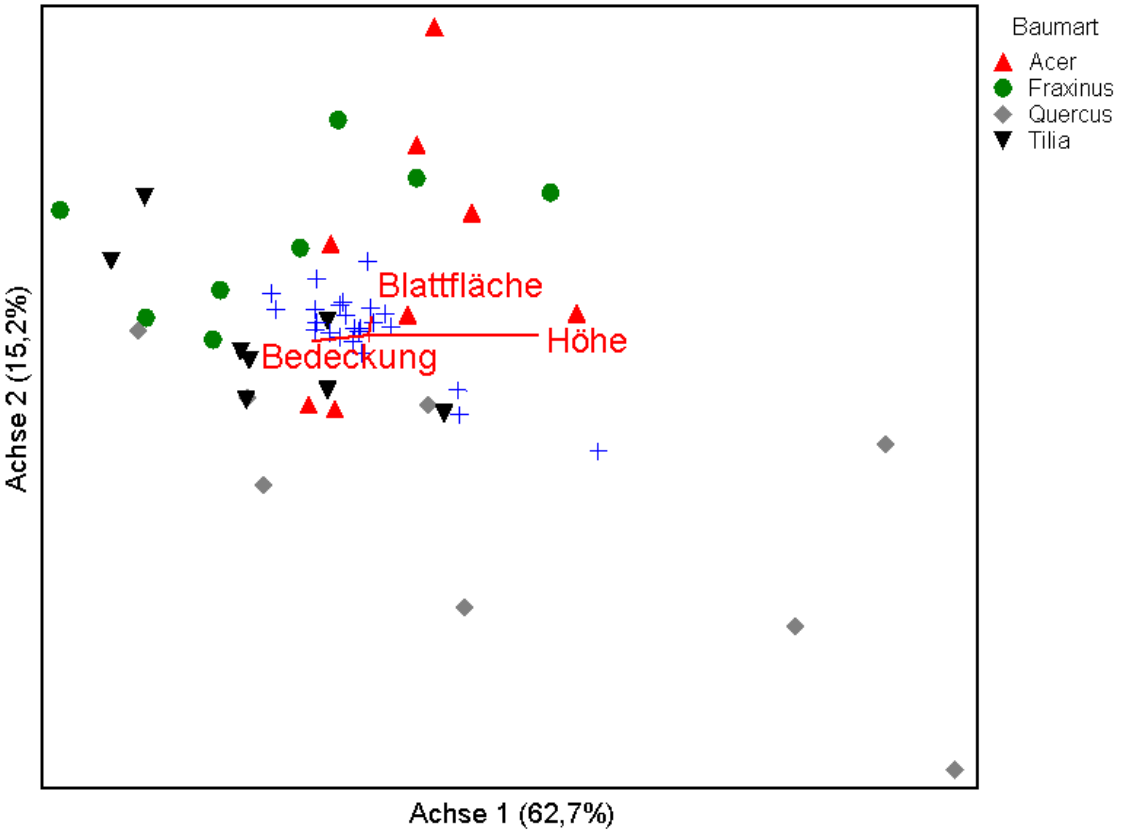

Abbildung 4.13: Ergebnisse einer NMS mit blattbewohnenden endophytischen Pilzarten, ihren Sammelpunkten und Umweltparametern. Die Ordination zeigt die Verteilung der Pilzarten (blaue Kreuze) und ihrer Wirtsbäume. Die Umweltfaktoren Bedeckung, Höhe und Blattfläche sind als rote Vektoren dargestellt. Ihre Länge entspricht ihrer Bedeutung für die Anordnung der Pilze. Die Prozentwerte der Achsen geben Auskunft über ihren Erklärungswert für die Ordination.

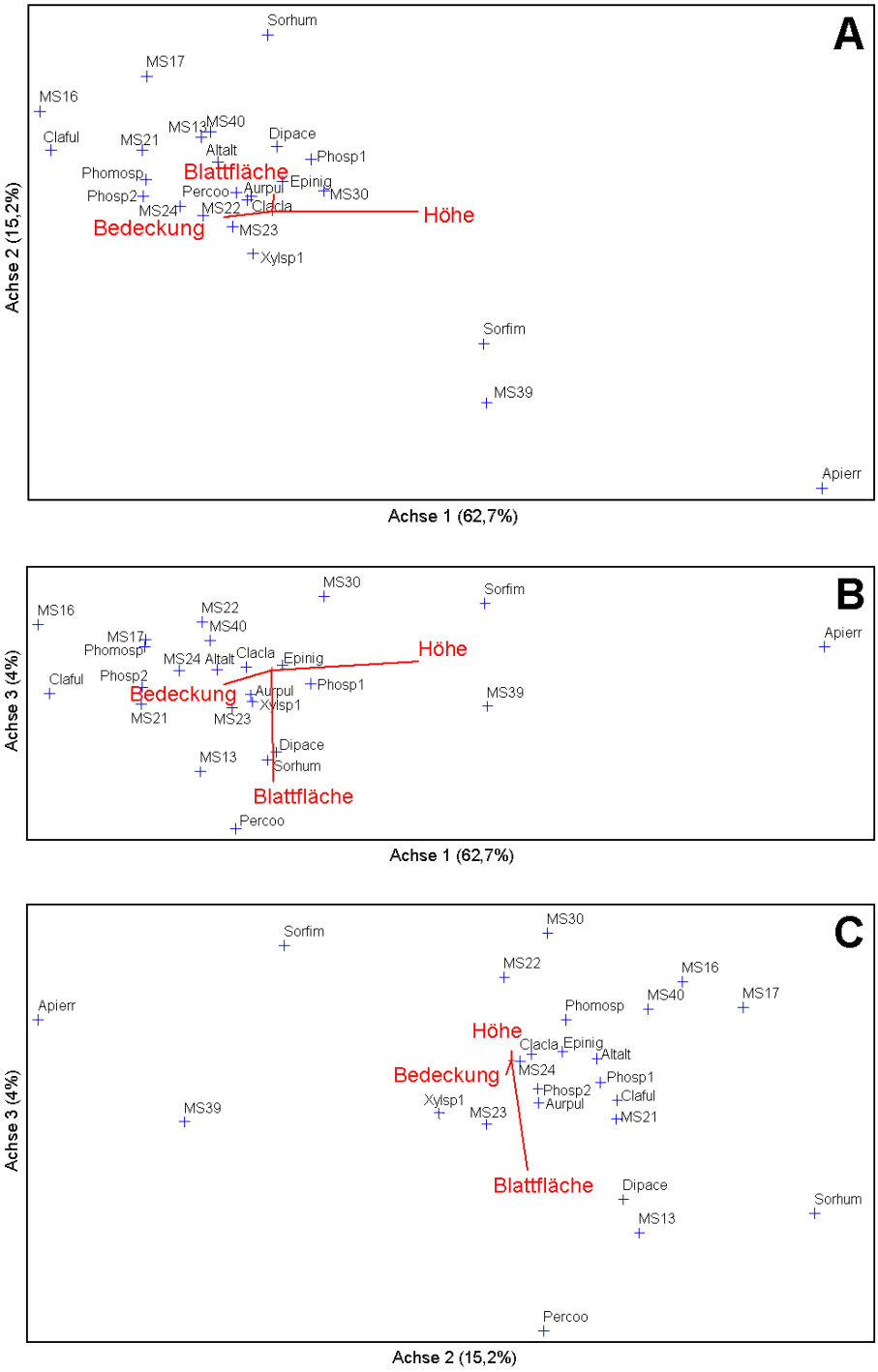

Abbildung 4.14: Ergebnisse einer NMS mit blattbewohnenden endophytischen Pilzarten, ihren Sammelpunkten und Umweltparametern. Die Ordination zeigt die Verteilung der Pilzarten (blaue Kreuze). Die Umweltfaktoren Bedeckung, Höhe und Blattfläche sind als rote Vektoren dargestellt. Ihre Länge entspricht ihrer Bedeutung für die Anordnung der Pilze und Sammelpunkte, die Prozentwerte der Achsen geben Auskunft über ihren Erklärungswert für die Ordination. Es sind alle drei Dimensionen der Ordination dargestellt, um exemplarisch zu zeigen, wie sich die Vektoren und Pilzarten im dreidimensionalen Raum anordnen.

Die Überlagerung der Abundanz einzelner Arten mit den entsprechenden Sammelpunkten zeigte, wie stark die Arten in den Sammelpunkten vertreten waren. So zeigten beispielsweise die Arten *Aureobasidium pullulans* und *Cladosporium cladosporioides* eine ubiquistische Verbreitung, also hohe Abundanzen in fast allen Sammelpunkten (Abb. 4.15)

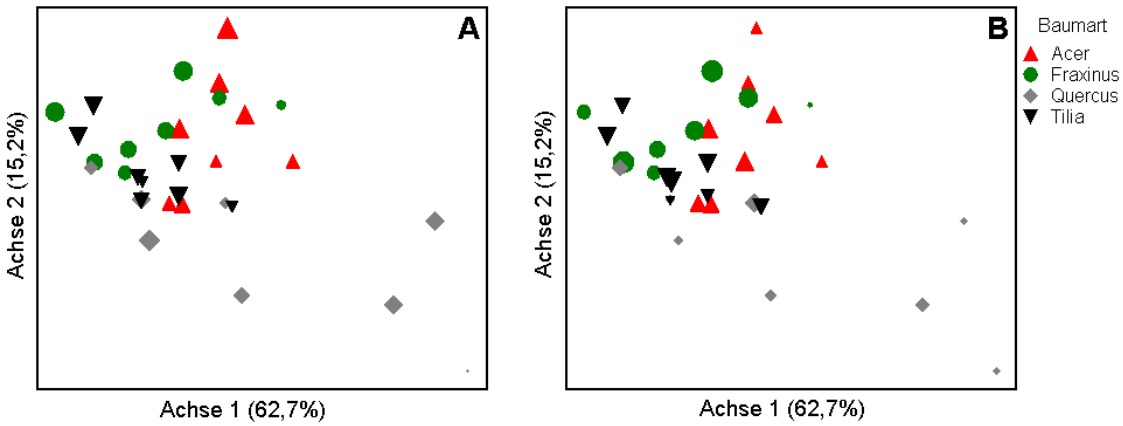

Abbildung 4.15: NMS-Biplot der Sammelpunkte mit Unterscheidung der Baumarten. Die Größe der Zeichen für die Sammelpunkte ist proportional zur Anzahl der infizierten Blätter. Dargestellt ist die Verteilung von *Aureobasidium pullulans*(A) und *Cladosporium cladosporioides* (B).

Dagegen wiesen z. B. die beiden Arten der Gattung *Phoma* keine gleichmäßige Verteilung, sondern eine Wichtung entlang der Achse 1 auf (Abb. 4.16).

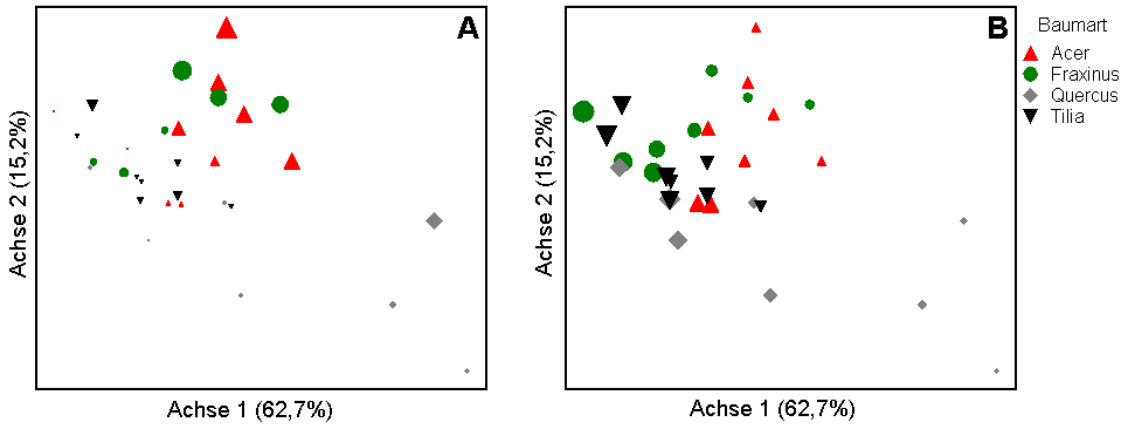

Abbildung 4.16: NMS-Biplot der Sammelpunkte mit Unterscheidung der Baumarten. Die Größe der Zeichen für die Sammelpunkte ist proportional zur Anzahl der infizierten Blätter. Dargestellt ist die Verteilung von *Phoma* sp. 1 (A) und *Phoma* sp. 2 (B).

Parallel zur Achse 1 verliefen die Vektoren Bedeckung und Höhe, so dass sich *Phoma* sp. 1 vor allem in Sammelpunkten mit geringer Bedeckung und in großer Höhe (Abb. 4.16 A) und *Phoma* sp. 2 entgegengesetzt in Sammelpunkten mit hoher Bedeckung des Lichteinfallsbereiches in geringer Höhe (Abb. 4.16 B) fand.

Die Ordination mit NMS basierte auf qualitativen (Presence/Absence) Daten, die mit der „Beals Smoothing"-Funktion in PC-ORD modifiziert wurden. Bei dieser Modifikation wurde die Abundanz der Arten in den einzelnen Sammelpunkten nicht berücksichtigt. Arten, die nicht nur häufiger in bestimmten Sammelpunkten, z. B. im Licht, auftauchten, sondern dort auch eine höhere Abundanz aufwiesen, zeigten daher in der DCA, in der quantitative Werte verwendet wurden, eine besser mit den Felddaten übereinstimmende Verteilung. So kam beispielsweise *Sordaria fimicola* nicht nur häufiger in Lichtsammelpunkten vor, sondern war dort auch im Schnitt in mehr Blättern vorhanden als in Schattensammelpunkten. In der DCA war für *Sordaria fimicola* daher eine deutlichere Orientierung entlang der Achse 1, die parallel zu den Vektoren Bedeckung und Höhe lag, zu erkennen (Abb. 4.17 B) als in der NMS Ordination (Abb. 4.17 A). Achse 1 war auch in der DCA die Achse mit dem höchsten Erklärungswert, der allerdings nur bei 36% lag.

Auch wirtsspezifische Arten konnten mit den Ordinationen ermittelt werden. So kam *Diplodina acerina* nur auf *Acer* vor. Dies ging aus einer DCA (Abb. 4.18)

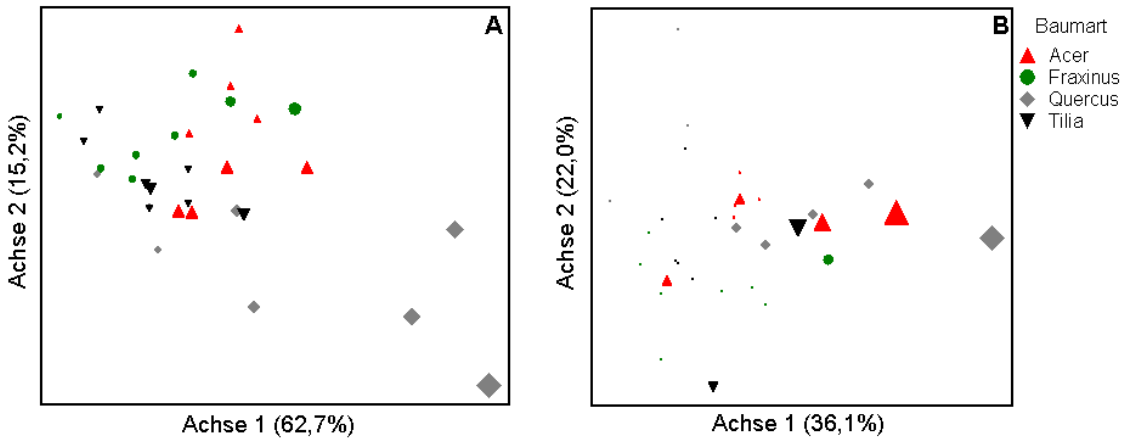

Abbildung 4.17: NMS-Biplot (A) und DCA-Biplot (B) der Sammelpunkte mit Unterscheidung der Baumarten. Die Größe der Zeichen für die Sammelpunkte ist proportional zur Anzahl der infizierten Blätter. Dargestellt ist die Verteilung von *Sordaria fimicola*.

deutlich hervor und wurde durch die Felddaten bestätigt. Auch in diesem Fall lieferte die DCA das eindeutigere Ergebnis als die NMS.

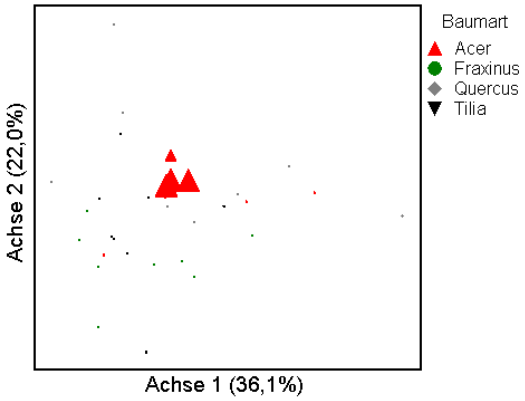

Abbildung 4.18: DCA-Biplot der Sammelpunkte mit Unterscheidung der Baumarten. Die Größe der Zeichen für die Sammelpunkte ist proportional zur Anzahl der infizierten Blätter. Dargestellt ist die Verteilung von *Diplodina acerina*.

4.4.2 Clusteranalyse

Das Resultat einer Clusteranalyse der Pilzarten war wenig aussagekräftig. Lediglich eine Gruppierung der Pilzarten entsprechend ihrer Abundanz wurde erkannt (Abb. 4.19). Wie auch schon in den verschiedenen Ordinationen konnte keine Gruppierung der Endophyten nach Baumarten, Lichtverhältnissen oder Sammelhöhe erkannt werden. Die Clusteranalyse der Sammelpunkte zeigte keine abweichenden Ergegbnisse und ist daher nicht abgebildet.

4.5 Zeitliche und räumliche Muster in der Verteilung der Arten

Die Wirtsarten unterschieden sich hinsichtlich der Artenvielfalt ihrer Endophyten kaum voneinander (*Acer* 22 Arten, *Fraxinus* 21 Arten, *Quercus* 20 Arten, *Tilia* 21 Arten; Abb. 4.20). Es gab jedoch deutliche Unterschiede zwischen Licht- und Schattenblättern innerhalb der Wirtsarten. Bei allen vier Wirten konnten aus den Schattenblättern mehr Endophytenarten isoliert werden als aus den Lichtblättern.

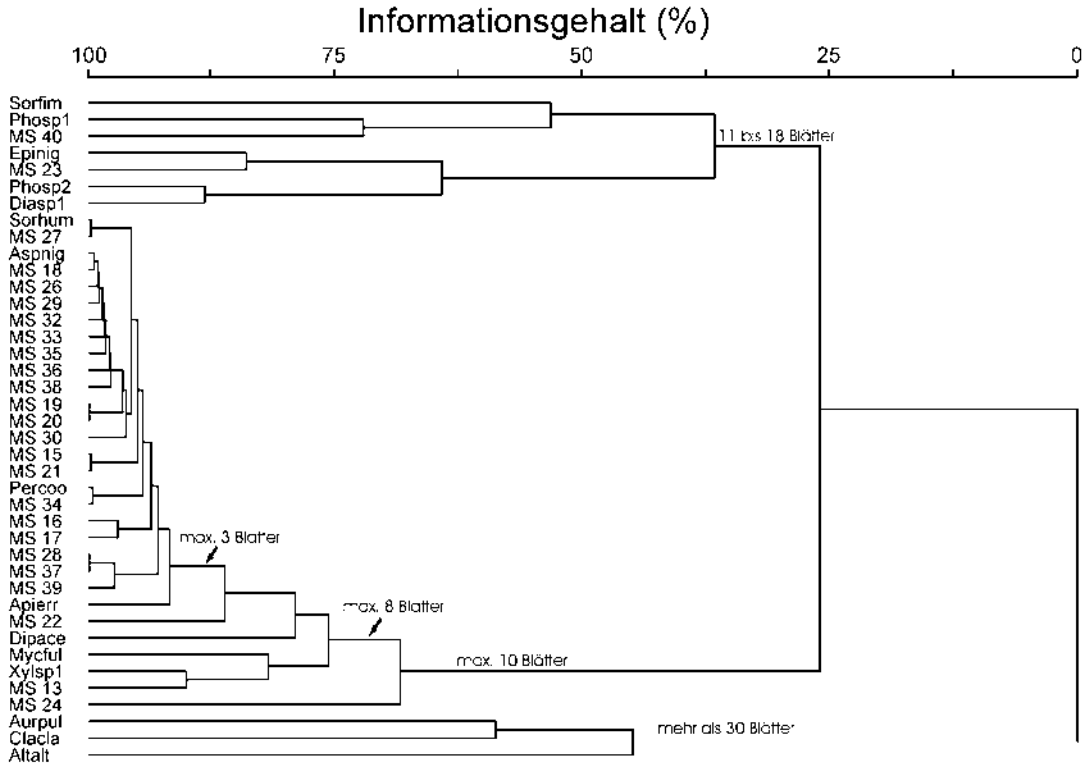

Abbildung 4.19: Clusterdendrogramm der endophytischen Pilze. Einbezogen wurden alle Pilzarten mit ihrer Abundanz in den Sammelpunkten. Die Zahl der Blätter, in denen die Arten gefunden wurde, ist auf dem Ästen angegeben.

Am deutlichsten war der Unterschied bei *Quercus*, wo in den Lichtblättern 11 Arten gefunden wurden, während aus den Schattenblättern 18 Arten isoliert werden konnten.

Auch bei den einzelnen Pilzarten konnte die Bevorzugung bestimmter Nischen festgestellt werden. Einige Arten konnten verstärkt unter einem bestimmten Lichtregime gefunden werden (Abb. 4.21). Deutlich zeigte sich die Präferenz für Lichtblätter bei *Alternaria alternata* in den Felddaten. Für alle Baumarten ist die Zahl der Lichtblätter in denen *A. alternata* gefunden wurde deutlich höher als die Zahl der Schattenblätter. Dieser Zusammenhang konnte mit NMS und DCA allerdings nicht belegt werden. Auch *Sordaria fimicola* und *Epicoccum nigrum* kamen in Lichtblättern häufiger vor. Vor allem für *S. fimicola* (Abb. 4.17), aber auch für *E. nigrum* konnte dieser Sachverhalt in den Ordinationen bestätigt werden. Das für *Phoma* sp. 1 gefundene verstärkte Auftauchen in Lichtblättern war in den Felddaten nur

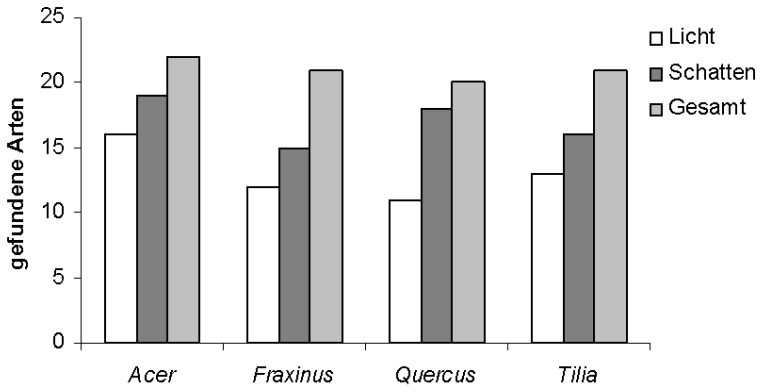

Abbildung 4.20: Zahl der endophytischen Pilzarten, die aus Blättern von *Acer pseudoplatanus*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur* und *Tilia cordata* isoliert werden konnten. Dargestellt ist für jede Baumart die Zahl der Pilzarten, die aus Licht- und Schattenblättern isoliert werden konnten sowie die Gesamtzahl der Pilzarten.

bei *Acer* und *Fraxinus* deutlich zu erkennen, die Summe aller Licht- und Schattenblätter unterschied sich dagegen kaum (Abb. 4.21). Im Gegensatz dazu wurden *Phoma* sp. 2, *Glomerella* sp. 2, *Phomopsis* sp. und Xylariales 1 vor allem aus Schattenblättern isoliert. Diese Verteilung wurde sowohl von den Felddaten (Abb. 4.21) als auch von den Ordinationen (vgl. Abb. 4.16) bestätigt.

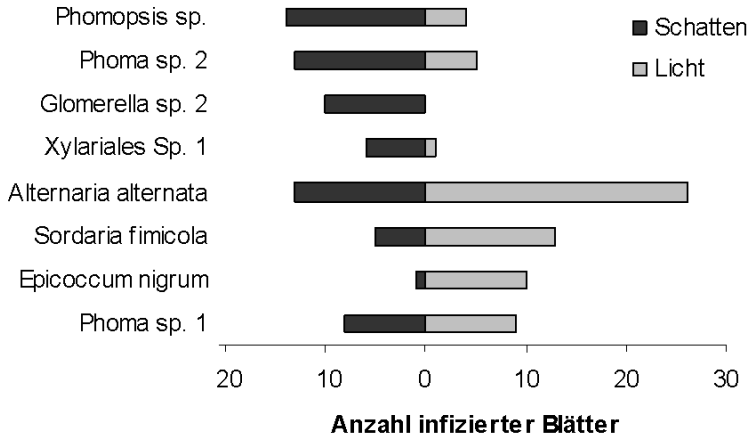

Abbildung 4.21: Anzahl der Licht- und Schattenblätter, in denen ausgewählte endophytische Pilzarten verschiedener Wirtsbäume gefunden werden konnten.

Deutliche Präferenz für eine Wirtsart zeigten *Diplodina acerina* und *Sordaria humana* für *Acer* sowie *Apiognomonia errabunda* für *Quercus*. Dies konnte auch in den Ordinationen bestätigt werden (vgl. Abb. 4.18). Allerdings kamen sowohl

S. humana als auch *A. errabunda* nur in zwei bzw. drei der 24 von jeder Baumart untersuchten Blätter vor.

Als Ubiquisten, die sowohl in verschiedenen Baumarten als auch in unterschiedlichen Lichtverhältnissen häufig waren, erwiesen sich *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans* und eine Art der Chaetomiaceae. Dies bestätigten sowohl die Felddaten als auch die Ordinationen (vgl. Abb. 4.15).

Für einige Arten fand sich ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeit zwischen Frühjahr und Herbst (Abb. 4.22). *Apiognomonia errabunda*, im Frühjahr einer der am häufigsten isolierten Pilze (Finstermeier 2006) trat im Herbst nur noch in drei Blättern auf. Auch im Frühjahr war *A. errabunda*, mit einer Ausnahme, nur auf *Quercus* zu finden. *Aspergillus niger*, im Frühjahr ebenfalls sehr häufig, konnte im Herbst nur noch ein einziges mal gefunden werden. Dagegen war *Alternaria alternata* im Frühjahr selten, im Herbst jedoch der häufigste Pilz. Ebenso waren *Cladosporium cladosporioides* und *Aureobasidium pullulans* im Herbst deutlich häufiger als im Frühjahr.

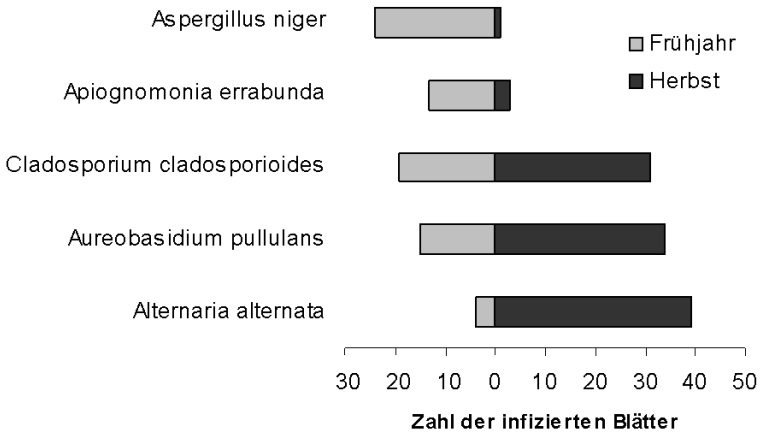

Abbildung 4.22: Anzahl der Blätter, auf denen ausgewählte endophytische Pilzarten verschiedener Wirtsbäume im Frühjahr und im Herbst gefunden werden konnten.

5 Diskussion

5.1 Die angewendeten Methoden und ihre Grenzen

Sowohl in den Vorstudien als auch im Verlauf der Arbeit wurde deutlich, dass die angewendeten Methoden geeignet waren, um Diversität und Verteilung blattbewohnender endophytischer Pilze zu untersuchen. Es zeigte sich jedoch auch, dass einzelne Analysen nur bedingt interpretierbar waren. Daher wurden die Methoden kombiniert, um ihre Stärken auszunutzen und die Schwächen auf ein akzeptables Maß zu reduzieren. Alle Ergebnisse müssen allerdings auch mit Blick auf die Grenzen der angewendeten Methodik betrachtet werden.

5.1.1 Isolation der endophytischen Pilze

Ein entscheidender Punkt für die Untersuchung der Diversität von endophytischen Pilzen ist die Art der Isolation. Je nach Methode kann die Zahl der isolierten Arten und ihre Häufigkeit stark schwanken. Häufig wird die Oberfläche zunächst sterilisiert, um anschließend Endophyten auf einem Nährmedium zu isolieren (u. a. Gamboa et al. 2002, Arnold et al. 2000). Dabei muss einerseits die Oberflächensterilisation so stark sein, dass alle epiphytischen Pilze, sowohl Myzelien als auch Sporen, abgetötet werden. Andererseits darf sie jedoch nicht so stark sein, dass Endophyten durch Chemikalien, die z. B. durch Spaltöffnungen in das Blattinnere eindringen, beeinträchtigt werden. Die für diese Untersuchung verwendete Sterilisationmethode mit einer Abfolge aus Ethanol, Natriumhypochlorid und noch einmal Ethanol ist in vielen Studien zitiert und gilt als anerkannt (Stone et al. 2004, Bayman persönliche Mitteilung). Die Beobachtung, dass die Kolonien aus den Rändern der Blattstücken wuchsen, jedoch nicht von den sterilisierten Blattflächen ausgingen die mit MEA

in Berührung waren, bestätigte die erfolgreiche Oberflächensterilisation der Blätter. Um ein Eindringen der Chemikalien in das Blattinnere möglichst zu vermeiden, wurden die Blätter erst sterilisiert und dann geschnitten und nicht umgekehrt, wie z. T. in der Literatur beschrieben (z. B. Arnold et al. 2003, Santamaria & Bayman 2005).

Sehr wichtig ist die Größe der Blattstücken, die auf das Nährmedium gelegt werden. Gamboa et al. (2002) stellten fest, dass die Größe der Fragmente entscheidend ist für die Zahl der Pilzarten, die aus einer bestimmten Blattfläche isoliert werden können. Je kleiner die Teilstücken waren, um so mehr Pilzarten konnten isoliert werden. Andererseits kann die Blattgröße nicht beliebig klein gewählt werden, da bei Blattstücken unter 2,5 mm die Gefahr groß ist, dass beim Schneiden das Blattgewebe vollkommen zerstört wird. Soll das Vorkommen von Endophyten in den einzelnen Blattstücken erfasst werden, so kann dies ein Problem sein. Um den Zeit- und Arbeitsumfang sinnvoll zu begrenzen, wurde in dieser Untersuchung mit 0,5 cm eine mittlere Größe der Blattfragmente gewählt. Zwar kann mit noch kleineren Blattstücken die Anzahl isolierter Pilzarten erhöht werden, jedoch können auch damit Infektionen, die auf wenige Zellen begrenzt und nur mikroskopisch im Blatt erkennbar sind, oft nicht erfasst werden (Stone et al. 2004).

Der nächste entscheidende Punkt ist das Medium, auf dem die Blattstücke ausgelegt werden. Mit Malzextrakt-Agar mit Tetrazyklin, wie ihn viele Studien verwenden (Petrini et al. 1992), konnten gute Ergebnisse erzielt und zahlreiche Arten isoliert werden. Noch bessere Ergebnisse würde die zusätzliche Verwendung selektiver Medien bringen (Bills & Polishook 1991). So ermöglichen Medien, die bestimmte, schnell wachsende Pilzarten hemmen, die Isolation von langsam wachsenden Arten. Solche Medien hätten möglicherweise für die Proben zu deutlich besseren Ergebnissen geführt, in denen einzelne Pilzarten innerhalb weniger Tage die gesamte Platte überwuchsen, ein Problem, dass in einer Untersuchung im Frühjahr (Finstermeier 2006) nicht aufgetreten war. Allerdings können diese Medien nur ergänzend eingesetzt werden, wodurch sich der Arbeitsaufwand beträchtlich erhöht. Eine einfachere Methode wäre es, die Blattstückchen aus einem Blatt nicht auf eine gemeinsame Agarplatte zu legen, sondern jeweils einzeln auf eine Platte. So könnten, sofern

der schnellwachsende Pilz nicht im gesamten Blatt verbreitet ist, aus allen anderen Blattstücken auch langsam wachsende Arten isoliert werden. Überhaupt nicht auf Medien kultiviert werden können obligat biotrophe Endophyten, d. h. Pilze, die zwingend auf die Verhältnisse im lebenden Wirtsorganismus angewiesen sind. Es können demnach nie alle endophytischen Pilzarten isoliert werden (Stone et al. 2004).

Aufgrund guter Erfahrungen mit der Studie im Frühjahr (Finstermeier 2006) wurde, um die Vergleichbarkeit zugewährleisten, der gleiche Probenumfang gewählt und die gleiche Methodik für die Isolation angewendet. Bei der ersten Kontrolle der Platten, die entsprechend den Erfahrungen des Frühjahrs nach fünf Tagen erfolgte, stellte sich heraus, dass eine viel größere Zahl an Kolonien aus den Blättern gewachsen war als im Frühjahr und sich einige Kolonien bereits stark ausgebreitet hatten. Um die Abundanz der Pilze in einem Blatt zu quantifizieren, ist es notwendig, das Vorkommen in einzelnen Blattstücken zu ermitteln. Aufgrund ihrer großen Anzahl konnten jedoch nicht alle Kolonien isoliert werden. In der Literatur wird dieser Punkt unterschiedlich diskutiert. Teilweise wurde die Häufigkeit eines Pilzes im Blatt über sein Vorkommen in einzelnen Blattstücken definiert (u. a. Todd 1988, Wilson & Faeth 2001). Häufig wurde aber auch die Zahl der Arten pro Blatt ermittelt und für Diversitätsschätzungen verwendet (u. a. Santamaria & Bayman 2005, Arnold et al. 2000). Auch Sieber & Hugentobler (1987) betrachteten Isolate der gleichen Pilzart aus verschiedenen Teilen eines Blattes als zum gleichen Individuum gehörend. Soll jedoch die Zahl der Kolonien als Maß für die Häufigkeit des Pilzes innerhalb eines Blattes verwendet werden, so ist bei Studien, die unterschiedliche Sammelzeitpunkte vergleichen, zu bedenken, dass der gleiche Probenumfang, der kurz nach dem Blattaustrieb vom Zeitaufwand angemessen erscheint, zu späteren Zeiten im Jahr deutlich mehr Arbeitsaufwand erfordern kann, da sich die Infektionsrate horizontal verbreiteter Endophyten im Jahresverlauf stark erhöht. Eine solche Akkumulation endophytischer Pilze im Verlauf einer Vegetationsperiode wurde u. a. vom Faeth & Hammon (1997 a) und Wilson & Carroll (1994) beschrieben.

5.1.2 Morphologische Bestimmung

Die Bestimmung endophytischer Pilze nach morphologischen Merkmalen ist ein Problem, wenn sie in Kultur keine Sporen bilden. Dies ist jedoch häufig der Fall (u. a. Santamaria & Bayman 2005, Guo et al. 2000, Arnold et al. 2000). Aber auch für sporulierende Arten ist die morphologische Bestimmung oft schwierig, weil ultrastrukturelle Merkmale (u. a. Sporenornamente) ermittelt werden müssen, wie z. B. bei einigen Arten der Gattung *Cladosporium* (Crous et al. 2001). Zudem sind viele Gruppen bislang ungenügend bearbeitet und umfassende Monographien für die Bestimmung in Kultur fehlen. Schon das Zusammenfassen zu Morphospezies kann schwierig oder unmöglich sein, wenn sterile Myzelien keine typischen Merkmale, wie Pigmentierung, Anastomosen oder Verfärbungen des Mediums entwickeln, die sie eindeutig von anderen Morphogruppen abgrenzen. So konnten auch in dieser Arbeit nicht alle Isolate in Morphogruppen eingeordnet werden. Eine erneute Überimpfung der fraglichen Isolate auf verschiedene Medien und anschließende Kultivierung bei möglichst identischen Bedingungen könnte näheren Aufschluss über eine Abgrenzung liefern (vgl. Arnold et al. 2000). Häufig unterscheidet sich das Erscheinungsbild der Arten auf unterschiedlichen Medien und Isolate, die sich auf einem Medium ähnlich sehen, können auf einem anderen deutlich verschieden aussehen.

Bei den Morphospezies, die Sporen bildeten, war auffällig, dass die meisten dafür viel Zeit benötigten. So konnten auch gegen Ende des Untersuchungszeitraumes (nach acht Monaten) immer noch neue sporulierende Isolate gefunden werden. Dies lag vermutlich daran, dass die Platten mit der Zeit austrockneten. Bei vielen Arten, vor allem Coelomyceten, führt die Austrocknung dazu, dass Sporen gebildet werden (Stone et al. 2004). Aber auch andere Stressfaktoren, wie der zunehmende Nährstoffmangel oder die zwischenzeitliche kalte Lagerung, könnten die Sporenbildung forciert haben. Die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht wäre eine Möglichkeit, bei weiteren Arten die Sporulation anzuregen (Sieber & Hugentobler 1987).

5.1.3 Phylogenetische Untersuchung

Für Morphospezies, die eindeutig abgrenzbar aber morphologisch nicht bestimmbar waren, stellte die Sequenzierung und der anschließende Vergleich mit Referenzse-

quenzen eine gute Methode dar, um Aussagen über die systematische und taxonomische Einordnung zu treffen. Lagen ausreichend Referenzsequenzen für die untersuchte Region vor und war die Sequenz für die einzelnen Gattungen deutlich verschieden, so war eine sichere Zuordnung bis auf Gattungsrang möglich. Bestätigt wurde diese Zuordnung oft auch dadurch, dass verwandte Arten, die bereits morphologisch bestimmt wurden, ebenso sicher eingeordnet werden konnten.

Probleme traten vor allem auf, wenn die Sequenz im untersuchten Genabschnitt bei verschiedenen Arten, Gattungen oder Familien sehr ähnlich war und sich nicht deutlich unterschied. Dies stellten auch Abliz et al. (2004) bei der Untersuchung humanpathogener Pilze fest. Sie fanden heraus, dass sich einige Gattungen, wie z. B. *Cladophialophora* auf Artebene in der D1/D2-Region gut unterscheiden lassen, während einige Arten der Gattung *Cladosporium* keine oder nur geringe Sequenzunterschiede in der D1/D2-Region aufweisen und daher nicht voneinander abgegrenzt werden können.

Ebenfalls als Problem erwies sich das Fehlen von molekularsystematischen Studien zu bestimmten Pilzgruppen und damit das Fehlen von Referenzsequenzen in der Datenbank. Beispielsweise war der beste Treffer der Suche in GenBank für eine Sequenz von *Periconia cookei* mit 99% ein nicht kultivierter Pilz, während der zweitbeste Treffer mit nur noch 94% *Letendraea helminthicola* ist. *Periconia cookei* selbst ist in der Datenbank nicht vertreten und auch andere Arten der Gattung liegen für die untersuchte D1/D2-Region nicht vor.

Ein weiteres Problem ist die Unzuverlässigkeit oder Unsicherheit der Referenzsequenzen. So kann es bei der Bestimmung des Materials zu Fehlern kommen, so dass die Sequenz mit einem falschen Namen in der Datenbank erscheint (vgl. Bridge et al. 2003). Es muss also sorgfältig geprüft werden, welche Referenzsequenzen in Untersuchungen einbezogen werden. Dementsprechend wurde in die Untersuchung der Hypocreales eine Sequenz von *Cordyceps sinensis* nicht eingeschlossen, obwohl sie den zweitbesten Treffer der BLAST-Analyse von MS 17 darstellte, da sie unter den ersten 180 Treffern der einzige dieser Gattung war und sich von allen anderen verfügbaren Sequenzen der Gattung *Cordyceps* deutlich unterschied.

Für alle untersuchten Arten konnte festgestellt werden, dass die Untersuchung

der D1/D2 Region nicht ausreicht, um eine Morphospezies eindeutig auf Artebene einzuordnen. Dafür fehlen häufig umfassende Referenzsequenzen oder die Sequenz ist innerhalb bestimmter Gruppen zu variabel oder zwischen den Gruppen zu ähnlich, um einzelne Arten voneinander abzugrenzen. Eine deutliche Verbesserung könnte die parallele Untersuchung weiterer Genabschnitte, z. B. der ITS-Region, bringen.

5.1.4 Artenakkumulationskurven und Abschätzung der Artenvielfalt

Für hyperdiverse Organismengruppen, zu denen auch endophytische Pilze gezählt werden (Arnold et al. 2000), ist eine vollständige Aufnahme der Arten in einem Untersuchungsgebiet gewöhnlich nicht möglich (Colwell & Coddington 1994). So ist es wünschenswert, nach der stichprobenartigen Erfassung der Organismen die Artenvielfalt abzuschätzen. Die Schätzwerte, die dabei ermittelt werden, geben Auskunft darüber, wieviele Arten unter den gegebenen Sammel- und Isolationsbedingungen hätten gefunden werden können. Pilze, die beispielsweise nur einzelne Zellen besiedeln und daher mit der Isolationsmethode nicht erfasst werden konnten, wurden auch in der Abschätzung der Artenvielfalt nicht berücksichtigt.

Da aufgrund der Isolationsmethode nur Aussagen darüber gemacht werden konnten, welche Arten in einem Blatt vorkommen, nicht jedoch wie häufig sie dort auftraten, war es sinnvoll, Sammelpunkt-basierte Rarefaction-Kurven zu ermitteln (Gotelli & Colwell 2001). Sie geben an, wieviele Arten in jedem zusätzlichen Sammelpunkt neu gefunden werden können, während Art-basierte Rarefaction-Kurven Auskunft geben, wieviele Arten bei welcher Zahl untersuchter Individuen gefunden werden können.

Die Schwierigkeit genauere Aussagen über die Häufigkeit der Arten zu machen, war auch der Grund für die Auswahl der Schätzwerte. Der Schätzwert Chao2 wurde gewählt, da er, im Gegensatz zu Chao1 (Chao 1984), nur die Präsenz bzw. das Fehlen einer Art an einem Sammelpunkt berücksichtigt und nicht auf Abundanzwerten beruht (Colwell & Coddington 1994). Da von vornherein nicht alle aus einem Blatt gewachsenen Endophytenkolonien einer Art isoliert wurden, kann mit Abundanzen nicht gearbeitet werden. Ebenso wurde der ICE gewählt, da er die Ar-

ten betrachtet, die an weniger als 10 Sammelpunkten auftauchen (Präsenz/Fehlen). Im Gegensatz dazu berücksichtigt der ACE (abundance-based coverage estimator) Arten mit weniger als 10 Individuen (Magurran 2004). Sowohl ACE als auch ICE differenzieren in häufige und seltene Arten. Beide Schätzwerte gehen davon aus, dass verbreitete Arten für den Artenreichtum weniger interessant sind als seltene (Chao et al. 2000). Dagegen basieren Chao1 und Chao2 auf der Zahl der Singletons und Doubletons, also Arten die nur mit ein oder zwei Individuen bzw. an ein oder zwei Sammelpunkten auftreten (Magurran 2004).

5.1.5 Multivariate Statistik

Für die Untersuchungen mit multivariater Statistik wurden zwei verschiedene Methoden angewendet, NMS und DCA. Die wichtigsten Vorteile einer Analyse mit NSM sind, dass keine zwingende lineare Beziehung zwischen den Variablen zugrunde gelegt wird, dass das „zero-truncation“ Problem abgeschwächt ist, ein Problem, das bei allen Ordinationen heterogener Datensätze auftritt und dass jede Art von Distanzmessung oder Relativierung genutzt werden kann. Seit die Leistungsfähigkeit von Computern ausreichend ist, ist dies eine der effektivsten Ordinationsmethoden (McCune & Grace 2002). Sie gewährleistet auch in mykologischen Studien verlässliche Aussagen zur Ökologie der Organismen (Unterseher & Tal 2006, Schnittler et al. in press). Nachteilig wirkte sich jedoch aus, dass in der Datenmatrix zahlreiche Nullen waren. Dieses Problem ließ sich durch eine Modifikation der Daten nach Beals (1984) lösen, allerdings berücksichtigt diese Modifikationsmethode nur die qualitative Anwesenheit von Arten an einem Sammelpunkt. Es konnten also keine Abundanzwerte einbezogen werden. Zwar ist die DCA kritisch zu betrachten, da durch künstliches Modifizieren der bei einer CA häufig auftretende Bogeneffekt herausgerechnet wird (McCune & Grace 2002), aber da Abundanzwerte als Grundlage genutzt werden konnten, stimmte an einigen Stellen das Ergebnis besser mit den Felddaten überein. So war zum Beispiel der Zusammenhang der Verbreitung von *Sordaria fimicola* mit der Höhe mit der DCA deutlicher als mit NMS (Abb. 4.17), da *Sordaria fimicola* in den Lichtblättern nicht nur in mehr Sammelpunkten vorkommt sondern auch in mehr Blättern pro Sammelpunkt als im

Schatten. NMS ist also im Allgemeinen die bessere Methode, in Einzelfällen lässt sich jedoch mit einer DCA das gleiche Ergebnis deutlicher interpretieren. Dufrêne & Legrendre (1997) schlagen eine weitere effektive Methode zur Darstellung von Biodiversitätsmustern vor, die Indikatorarten-Analyse. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht verwendet.

Probleme bei der Auswertung der Ordinationen traten auf, weil der Zusammenhang von Blattgröße und Höhe mit den Lichtverhältnissen nicht eindeutig war. So traten durch die stark zerklüftete Kronenoberfläche des Untersuchungsgebietes mit Bäumen unterschiedlicher Größe und Bestandslücken (Abb. 2.4) an kleineren Bäumen Lichtblätter in solchen Höhen auf, in denen sich bei großen Bäumen der gleichen Art die Schattenblätter befanden. Auch der Zusammenhang der Blattgröße mit den Lichtverhältnissen war nur bei *Tilia* wirklich deutlich. Bei den anderen Baumarten waren die Größenunterschiede der beiden Blatttypen gering. Da die Lichtqualität auf den Bau und Stoffwechsel des Blattes von den untersuchten Faktoren Lichtqualität, Höhe und Blattgröße vermutlich den größten Einfluss hat, liegt nahe, dass sie auch den größten Einfluss auf die Endophytenflora besitzt. In der Darstellung der Ordination wurde jedoch dieser Einfluss von den anderen Faktoren überlagert, ein möglicher Grund, weshalb z. B. ein deutlicher Unterschied in der Besiedelung von Licht- und Schattenblättern durch *Alternaria alternata* (Abb. 4.21) in der Ordination nicht zu erkennen war. Sinnvoll wäre die Messung zusätzlicher Parameter, wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf der Blattoberfläche (vgl. Unterseher & Tal 2006) oder Lichtqualität und -quantität, z. B. die Intensität der UV-Strahlung. Sie erfassen besser die physiologischen Unterschiede zwischen Licht- und Schattenblättern oder Unterschiede im Mikroklima. Stoffwechsel und Klima haben vermutlich mehr Einfluss auf die Endophytenflora als z. B. die Höhe, in der das Blatt wächst.

5.2 Platzierung der Arten im phylogenetischen Stammbaum

Mithilfe der phylogenetischen Analysen konnten einige Morphospezies sicher auf Gattungsebene eingeordnet werden. So gehörte MS 15 mit hoher Wahrscheinlichkeit

zur Gattung *Sordaria*. Auch die bereits morphologisch bestimmten *Sordaria*-Arten *S. fimicola* und *S. humana* ordneten sich eindeutig in den Clade ein, der alle untersuchten Arten der Gattung *Sordaria* umfasste (Abb. 4.3). Der Subclade, in dem diese beiden Arten lagen, nicht aber MS 15, trennte sich mit einem Bootstrap-Wert von 95% von den übrigen *Sordaria*-Arten ab, so dass es sich bei MS 15 vermutlich um eine dritte Art der Gattung *Sordaria* handelte. Ebenso konnten MS 16 und 24 mit hoher Wahrscheinlichkeit in die Gattung *Glomerella* bzw. deren Anamorphe *Colletotrichum* und MS 17 in die Gattung *Gibberella* bzw. deren Anamorphe *Fusarium* geordnet werden (Abb. 4.6).

Die untersuchten Sequenzen von *Alternaria* und ihrer Teleomorphe *Lewia* ordneten sich auf Gattungsebene ebenfalls gut zusammen (Abb. 4.8). Auch die MS 35, 38 und 40 sowie die beiden Vertreter der Restgruppe lagen in diesem Cluster. Auf Artebene sind die Sequenzunterschiede jedoch zu gering (zwischen einigen Arten gibt es keine Unterschiede) bzw. es gibt innerhalb einer Art Unterschiede, so dass z. B. drei unterschiedliche Sequenzen von *Alternaria alternata* voneinander durch andere sehr ähnliche *Alternaria*-Arten getrennt wurden. Auch für *Phomopsis* sp. konnte auf diesem Weg keine genauere Einordnung erfolgen, da alle sechs untersuchten Sequenzen von *Phomopsis*/*Diaporthe* in einem Clade zu einer Polytomie zusammengefasst waren (Abb. 4.4). Auffällig war auch, dass der *Phomopsis*/*Diaporthe* Zweig getrennt von den übrigen Valsaceae gruppierte, die offenbar näher mit *Melanconis stilbostoma*, einer Melancondiaceae verwandt sind als mit *Diaporthe* und *Phomopsis*. Das Fehlen von Referenzsequenzen hatte zur Folge, dass auch die *Phoma*-Arten 1 und 2 auf Artebene nicht näher bestimmt werden konnten. Nur für zwei von zahlreichen *Phoma*-Arten, *Phoma glomerata* und *Phoma herbarum*, sowie einige nicht näher bestimmte *Phoma* spp. lagen Vergleichssequenzen für den entsprechenden Genabschnitt vor.

Oft war jedoch eine sichere Einordnung auch auf Gattungsebene nicht möglich. So lag z. B. MS 28 in einem Clade mit verschiedenen Gattungen der Valsaceae, die als Polytomie gleichwertig nebeneinander standen (Abb. 4.4). Allerdings clusterten die anderen drei gefundenen Valsaceen Arten in andere Clades mit guten Bootstrap-Werten, so dass es sich wahrscheinlich um eine vierte Art aus der Familie Valsaceae

handelte. Auch die Familie der Mycosphaerellaceae gliederte sich so stark auf (Abb. 4.7), dass MS 36 nur bis auf Familienebene bestimmt werden konnte. In anderen Fällen fehlten in der Analyse weitere Vergleichssequenzen. So konnte MS 18 obwohl sie einen Clade mit 100% Bootstrap-Wert mit zwei *Sporormiella*-Arten bildete (Abb. 4.8) nur bis auf Familienebene bestimmt werden, da keine weiteren Gattungen der Familie in die Untersuchung einbezogen waren. Bei MS 27, 30 und 33, die zur Familie Pleosporaceae gehörten, konnte auf Gattungsebene nur die Aussage getroffen werden, dass es sich nicht um die Gattung *Lewia/Alternaria* handelte, da diese sich in einem gut abgesicherten Clade abtrennte (Abb. 4.8).

Teilweise musste auch mit einer gewissen Unsicherheit der Zuordnung gearbeitet werden. So war die Zugehörigkeit von MS 19 zur Familie Mycosphaerellaceae zwar wahrscheinlich, aber nicht sicher, da sie auf einem Unterast mit *Mycosphaerella molleriana* liegt (Bootstrap-Wert 98%), der jedoch auch *Hortea werneckii* umfasst (Abb. 4.7) über deren systematische Einordnung innerhalb der Ascomycetes bisher nichts bekannt ist. Auch die Absicherung durch die Bootstrap-Werte war nicht immer so gut, wie es zu wünschen wäre. So war z. B. der Bootstrap-Wert für den Clade, in den sich MS 23 einordnete mit 58% nicht besonders hoch (Abb. 4.3). Trotzdem sprach die große Ähnlichkeit der Sequenzen (98 bis 99%) für die Zugehörigkeit der MS 23 zu den Chaetomiaceae. Auch MS 22 lag mit *Venturia hanliana* in einem Subclade mit nur 76% Bootstrap-Wert (Abb. 4.7). So kann auf die Zugehörigkeit zur Familie Venturiaceae für diese MS nur mit Vorsicht geschlossen werden.

Interessant war, dass sich die Familie der Venturiaceae als einzige der untersuchten Familien aus der Ordnung Pleosporales zwischen den Mycosphaerellales einordnete (Abb. 4.2). Die Gattung *Venturia* wurde früher gemeinsam mit *Mycosphaerella* als Teleomorphe von *Cladosporium* betrachtet und die Familien Mycospherellaceae und Venturiaceae wurden in die Ordnung Dothidiales eingeordnet (Hawksworth et al. 1995). In der neueren Systematik ist dies nicht mehr der Fall (Kirk et al. 2001). Nach der vorliegenden Untersuchung wäre eine engere Verwandschaft der Venturiaceae mit den Mycosphaerellales naheliegend, allerdings müssten weitere Genabschnitte und morphologische Merkmale herangezogen werden, um genauere Aussagen darüber machen zu können.

Die Tatsache, dass sich die Glomerellaceae in einen Clade mit den Hypocreales einordneten und darin einen eigenen Subclade mit 100% Bootstrap-Wert bildeten (Abb. 4.6), bestätigt die Vermutung, dass die Glomerellaceae eng mit den Hypocreales verwandt sind (Kirk et al. 2001).

Die größten Probleme bereitete die phylogenetische Analyse der Xylariaceae. Fast alle Arten, egal ob aus verschiedenen Familien und Gattungen oder nicht, bildeten eine Polytomie. Offenbar ist die D1/D2 Region für die Verwandschaftsverhältnisse dieser Gruppe nicht aussagekräftig. Der niedrige Retentions-Index der Parsimonie-Analyse (s. Abschnitt 4.2.2) wies auf einen hohen Grad an Homoplasien hin, also die Tatsache, dass Veränderungen in der Sequenz mehrfach parallel entstanden sind. Treten solche Homoplasien häufig auf, so gibt es viele gleich gute oder schlechte Varianten einen phylogenetischen Baum zu bilden, was zur polytomen Anordnung der Sequenzen führt. Selbst andere Ordnungen trennten sich nur mit einem Bootstrap-Wert von 67% von den Xylariales ab. Es konnte daher für diese Gruppe allerhöchsten die vorsichtige Aussage gemacht werden, dass die untersuchten MS 13 und 20 zur Ordnung Xylariales gehörten (Abb. 4.5). Eine Sequenzierung weiterer Genabschnitte könnte für eine phylogenetische Analyse dieser Gruppe bessere Ergebnisse bringen.

5.3 Häufigkeit der Arten

Die Verteilung der Pilzarten in wenige häufige und viele seltene Arten und der damit verbundene Kurvenverlauf der Rang-Häufigkeits-Kurve mit einem langen Ausschwanzen (Abb. 4.9) ist typisch für hyperdiverse Gruppen (Hughes et al. 2001), zu denen auch die endophytischen Pilze gezählt werden (Arnold et al. 2000).

Die häufigsten Arten waren mit *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans* und *Cladosporium cladosporioides* kosmopolitische Saprobionten (Ellis 1971). Wilson (1993) vermutete, dass Endophyten an Seneszenz und Abbau von Blättern beteiligt sind. Das häufige Vorkommen ubiquistischer Saprobionten im Herbst bestätigte diese Vermutung.

Auch andere häufig gefundenen Arten, wie *Phoma* spp., *Lewia* spp. und *Epicoccum nigrum*, sind aus der Literatur (u. a. Halmschlager et al. 1993, Kowalski

& Kehr 1992, Pehl & Butin 1994, Sieber & Hugentobler 1987) als blattbewohnende Endophyten in Gehölzen in Mitteleuropa bekannt. Mit *Sordaria* spp. und einer Art der Sporormiaceae wurden als koprophil bekannte Arten (Lundqvist 1972) gefunden. Ihr endophytisches Vorkommen ist jedoch nicht neu, ebenso wie das endophytische Vorkommen von als Holzzersetzer bekannten *Chaetomium*-Arten (Halmschlager et al. 1993).

Die Zahl der gefundenen Arten war mit 40 Morphospezies insgesamt und 20 bis 22 pro Wirtsart verglichen mit anderen Studien relativ gering. So fanden z. B. Sieber & Hugentobler (1987) 64 Arten in 1500 untersuchten Blättern von *Fagus sylvatica* und Halmschlager et al. (1993) 78 Arten in 1800 Blättern von *Quercus petraea*. Die Ursache für die geringe Artenzahl war vermutlich vor allem der, im Vergleich mit den genannten Studien, sehr kleine Stichprobenumfang pro Wirtsart. Dieser war zum einen dem begrenzten Zeitrahmen geschuldet, zum anderen der Tatsache, dass nicht nur eine Wirtsart untersucht wurde. Veränderungen in der Isolationsmethodik könnten bei gleichem Stichprobenumfang zu höheren Artenzahlen führen (vgl. Abschnitt 5.1.1).

Noch gravierender ist der Unterschied zur Diversität endophytischer Pilze in den Tropen. In insgesamt 83 Blätter von *Heisteria concinna* und *Ouratea lucens*, zwei typischen Gehölzen im Unterwuchs neotropischer Wälder, fanden Arnold et al. (2000) 418 Morphospezies. Santamaria & Bayman (2005) isolierten aus 90 Blättern von Kaffee (*Coffea arabica*) 131 Morphospezies.

Für diese beiden Untersuchungen, ebenso wie für die vorliegende Diplomarbeit, wurden Schätzwerte ermittelt, die weit über den tatsächlich gefundenen Artenzahlen lagen und deren Kurven den Sättigungsbereich noch nicht erreicht hatten. Erst wenn die Kurven einen Sättigungsbereich aufweisen, können die Schätzwerte als relativ zuverlässig betrachtet werden. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass die Schätzwerte nur etwas über die zu erwartende Artenzahl unter den gegebenen Sammel- und Isolationsbedingungen aussagen. Da aber strikt biotrophe Endophyten und solche, die nur einzelne Zellen in den Blättern besiedeln, mit der verwendeten Methode nicht isoliert werden konnten (vgl. Abschnitt 5.1.1), müssen die ermittelten Schätzwerte in jedem Fall als zu gering für die Gesamtdiversität angesehen werden.

5.4 Einfluss der Lichtintensität auf die räumliche Verteilung der Endophyten

Während im Frühjahr nur bei *Quercus robur* deutlich mehr Arten in Schatten- als in Lichtblättern gefunden werden konnten (Finstermeier 2006), waren im Herbst bei allen Wirtsarten die Schattenblätter mit mehr Endophytenarten besiedelt als die Lichtblätter. Obwohl Unterschiede in der Häufigkeit in Licht- und Schattenblättern für einzelne Endophytenarten bekannt sind (u. a. Wilson & Faeth 2001, Halmschlager et al. 1993), konnten keine Studien gefunden werden, die gezielt die Artenvielfalt und Diversität endophytischer Pilze in Licht- und Schattenblättern vergleichen. Für die Tatsache, dass in den Schattenblättern mehr Arten gefunden werden konnten als in Lichtblättern, sind zahlreiche Erklärungen denkbar. So könnte es sein, dass die Schattenblätter durch weniger extreme Umweltbedingungen mehr Pilzarten einen geeigneten Lebensraum bieten, während in den größerer Hitze und höherer UV-Strahlung ausgesetzten Sonnenblättern nur wenige Spezialisten gut wachsen können. Die hohe Lichtintensität, der die Sonnenblätter ausgesetzt sind, führt aber auch zu einer verstärkten Behaarung, z. B. bei *Tilia cordata*, welche zwar einerseits als Sporenfalle die verstärkte Ansammlung von Sporen bewirken kann, andererseits aber auch dazu führen kann, dass weniger Sporen die Blattoberfläche erreichen (Allen et al. 1991). Zusätzlich wird die Infektion durch eine dicke Kutikula erschwert. Ebenfalls von Bedeutung ist vermutlich die ungünstigere Energiebilanz der Sonnenblätter. Hohe Temperaturen führen zur Schließung der Stomata. Dadurch kommt es zu einem Mangel an CO_2, welcher zusammen mit der bei hohen Temperaturen rasch sinkenden Affinität des Enzyms RubisCO für CO_2 für einen hohen Energieverbrauch durch Photorespiration sorgt (Sitte et al. 2002, S. 295f). Dies könnte dazu führen, dass die Energiebilanz der Blätter und damit die Nährstoffversorgung von Blättern und endophytischen Pilzen weniger gut ist. Ein Zeichen für die schlechte Versorgung der Blätter wäre z. B. eine braune Verfärbung der Sonnenblätter im Sommer, wie sie besonders bei *Tilia* beobachtet werden konnte.

Für die einzelnen Arten konnten ebenfalls Unterschiede in der Verteilung in Licht-

und Schattenblättern gefunden werden. So traten *Sordaria fimicola* und *Epicoccum nigrum* häufiger in Lichtblättern auf. Auch *Alternaria alternata* wurde in allen Wirtsarten häufiger in Sonnenblättern gefunden. Dagegen fanden HALMSCHLAGER et al. (1993) *A. alternata* in *Quercus petraea* häufiger in Schattenblättern. Eine mögliche Erklärung dafür, warum ubiquistisch verbreitete Pilze, wie *E. nigrum* und *A. alternata* in den Sonnenblättern stärker auftraten wäre, dass die Sonnenblätter im Herbst zeitiger abfallen und daher die Abbauprozesse weiter fortgeschritten waren als in Schattenblättern. Saprobiontische Ubiquisten könnten diese Nährstoffquelle nutzen. HALMSCHLAGER et al. sammelten an drei Terminen während der gesamten Vegetationsperiode. Unter Umständen ist *A. alternata*, wenn man das gesamte Jahr betrachtet, in den Schattenblättern häufiger, kann sich jedoch bei Beginn des Blattabbaus im Herbst in den Sonnenblättern sprunghaft vermehren. Es ist jedoch auch möglich, dass es sich um eine zufällige Verteilung handelt und die Situation in anderen Jahren oder einem größeren Stichprobenumfang anders aussieht.

In Schattenblättern waren eine *Phoma*-Art, eine *Glomerella*-Art, eine Art von *Phomopsis* und eine Art der Xylariales häufiger. Auch *Apiognomonia errabunda* war im Schatten häufiger als im Licht, allerdings war die Abundanz so gering, dass keine sichere Aussage darüber gemacht werden konnte. Im Frühjahr war jedoch die Abundanz von *A. errabunda* hoch und die Bevorzugung der Schattenblätter sehr deutlich (FINSTERMEIER 2006). Es handelt sich bei diesen Arten vermutlich um Pilze, die durch Stressfaktoren wie schlechte Nährstoffversorgung oder hohe UV-Strahlung besonders geschädigt werden und daher in den Sonnenblättern schlecht existieren können.

5.5 Wirtsspezifität der Endophyten

Die Zahl der Endophytenarten in den verschiedenen Wirten unterschieden sich mit 20 bis 22 Arten pro Wirt kaum. Allerdings sind Aussagen darüber nur unter Vorbehalt möglich, da noch nicht annähernd alle Arten gefunden werden konnten (s. o.). Wie auch u. a. bei PEHL & BUTIN (1994) und KOWALSKI & KEHR (1992) konnten in dieser Untersuchung sowohl deutlich wirtsspezifische als auch ubiquistische Ar-

ten gefunden werden. Eindeutig wirtsspezifisch für *Acer* ist *Diplodina acerina*, die, ebenso wie ihre Teleomorphe *Cryptodiaporthe hystrix*, bislang nur auf *Acer* gefunden werden konnte (vgl. auch Müller & von Arx 1962). *Apiognomonia errabunda* konnte nur aus *Quercus* isoliert werden. Zwar war die Abundanz mit nur drei infizierten Blättern gering, jedoch wurde die Wirtsspezifität von den Ergebnissen im Frühjahr bestätigt. Damals wurde in 13 Blättern *A. errabunda* gefunden, wovon 12 zu *Quercus* gehörten. Dies war vor allem deshalb auffällig, weil nach aktueller Systematik zahlreiche früher nach ihrer Wirtsart getrennte Arten von *Discula*, *Apiognomonia* und *Gloeosporium* zu *Apiognomonia errabunda* zusammengefasst werden, auch solche die auf *Acer* und *Tilia* vorkommen. Danach müsste also *A. errabunda* eine einzige ubiquistisch verbreitete Art sein, sie kommt aber in der vorliegenden Untersuchung und der Untersuchung im Frühjahr fast ausschließlich auf *Quercus* vor. Scheinbar ist die Wirtsspezifität doch von großer Bedeutung für die Taxonomie und Systematik dieser Art bzw. Artengruppe.

Alle anderen Arten waren mehr oder weniger in allen Baumarten verbreitet oder konnten nur sehr selten isoliert werden.

5.6 Vergleich der Endophytenflora im Frühjahr und im Herbst

Auffällig war das deutlich schnellere und stärkere Wachstum der aus den Blättern isolierten Endophyten und eine höhere Anzahl von Kolonien im Vergleich zum Frühjahr. So wurden im Frühjahr insgesamt 214 Kolonien isoliert (Finstermeier 2006), während die 412 isolierten Kolonien im Herbst nur einen Bruchteil der tatsächlich aufgetretenen Kolonien darstellten. In der Literatur wurde bereits vielfach beschrieben, dass sich mit zunehmendem Alter der Blätter die Infektionsdichte erhöht (u. a. Faeth & Hammon 1997 a, Wilson et al. 1997). Dementsprechend fanden sich auch im Herbst keine endophytenfreien Blätter mehr, im Gegensatz zum Frühjahr.

Im Frühjahr kommen für die Infektion der Blätter vor allem Endophyten aus den Leitgefäßen der Äste infrage, die dann in die Blätter einwandern. Sieber & Hugentobler (1987) und Halmschlager et al. (1993) fanden zahlreiche Endo-

phytenarten sowohl in Blättern als auch in Ästen von *Fagus sylvatica* bzw. *Quercus petraea*. Auch im März, also kurz vor dem Blattaustrieb fanden HALMSCHLAGER et al. in ca. 90% der untersuchten Eichenäste Endophyten. Dass sich häufig endophytische Pilze in den Leitgefäßen befinden, wurde von der Beobachtung bestätigt, dass Pilzkolonien an den Rändern der Blattstücken vor allem im Bereich größerer Leitbündel aus dem Blatt herauswuchsen. Diese Beobachtung konnte sowohl im Frühjahr (FINSTERMEIER 2006) als auch im Herbst gemacht werden. Außerdem kann die Infektion der Blätter im Frühjahr durch schnell keimende Pilzsporen erfolgen. Über den Sommer können sich Sporen von zahlreichen Sporenquellen aus der Umgebung auf dem Blatt ansammeln und es infizieren. Außerdem kommen als zusätzliche Vektoren Herbivoren in Frage, da im Herbst deutlich mehr Blätter angefressen waren als im Frühjahr. Herbivoren öffnen zum einen zusätzliche Infektionspforten für Sporen, die bei unbeschädigten Blättern nur über die Spaltöffnungen eindringen können oder die Kutikula durchdringen müssen. Zum anderen können sie selbst Pilzsporen oder Myzel über ihre stechend saugenden Mundwerkzeuge übertragen (ALLEN et al. 1991).

Nicht nur die Infektionsdichte, auch die Zahl der Arten war im Herbst größer als im Frühjahr. Insgesamt wurden im Herbst 40, im Frühjahr nur 33 Arten gefunden. 10 bis 16 Endophyten pro Wirtsart traten im Frühjahr auf, 20 bis 22 im Herbst. Eine solche Zunahme der Endophytenzahlen mit zunehmendem Blattalter wurde u. a. auch von PEHL & BUTIN (1994) beschrieben. Neben Infektionsdichte und Artenzahl veränderte sich auch die Zusammensetzung der Arten vom Frühjahr zum Herbst. Während einige Arten, die im Frühjahr häufig gefunden wurden, seltener oder gar nicht mehr auftraten, z. B. *Aspergillus niger* und *Apiognomonia errabunda*, traten andere Arten, z. B. *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* und *Aureobasidium pullulans*, deutlich häufiger auf. Auch in der Literatur wurden häufig jahreszeitliche Schwankungen in der Abundanz einzelner Pilzarten beschrieben. So fanden HALMSCHLAGER et al. (1993) für *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* und *Aureobasidium pullulans* ebenfalls einen starken Anstieg im Jahresverlauf, *Discula quercina* (heute zu *Apiognomonia errabunda* gehörend) zeigte bei ihnen keine starke Schwankung und *Verticicladium trifidum* war im Mai sehr häufig,

im September sehr selten.

Auffällig war, dass sich die Zusammensetzung der Arten dahingehend änderte, dass vor allem ubiquistische Saprobionten im Herbst verstärkt auftraten. Drei typische Vertreter dieser Gruppe (*Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* und *Aureobasidium pullulans*) setzten sich in ihrer Häufigkeit im Herbst deutlich von den anderen Arten ab (vgl. Abb. 4.9). Aussagen über diesen Sachverhalt konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Verschiedene Ursachen für die veränderte Artzusammensetzung sind denkbar. So könnten z. B. Saprobionten vom beginnenden Abbau der Blätter im Herbst profitieren und daher stärker wachsen oder durch ihre ubiquistische Lebensweise und starkes Wachstum andere weniger konkurrenzstarke Arten verdrängen. Eventuell konnten auch durch das starke Wachstum der Ubiquisten langsam wachsende Arten einfach nicht in der Häufigkeit isoliert werden, in der sie im Blatt auftraten.

5.7 Ausblick

Die Untersuchung der Diversität und Verteilung blattbewohnender endophytischer Pilze im LAK-Untersuchungsgebiet hat sich als interessante Studie erwiesen. Es wurden neue wissenschaftliche Erkenntnisse über das verborgene Leben der Endophyten im Blatt gewonnen. Dabei hat sich gezeigt, dass die Abläufe im Lebensraum Baumkrone und die Interaktionen der Endophyten mit diesem Lebensraum sehr komplex und vielfältig sind. Weiterführende Studien in größerem Umfang sind daher notwendig, um die Artenvielfalt und die zeitlichen und räumlichen Verteilungsmuster endophytischer Pilze genauer zu erfassen und die Möglichkeiten der statistischen Absicherung zu verbessern.

So ist beispielsweise ein größerer Stichprobenumfang mit monatlichen Sammelterminen denkbar. Die Ermittlung zusätzlicher Daten an den Sammelpunkten, wie Mikroklimamessungen und Erfassung von Lichtqualität und -quantität, wäre sinnvoll, da diese Faktoren vermutlich einen großen Einfluss auf die Verteilung der Endophyten haben. Die zusätzliche Verwendung selektiver Medien bei der Isolation der Endophyten würde vermutlich zu höheren Artenzahlen führen und die phylogeneti-

sche Analyse weiterer Sequenzen, z. B. der 5.8S Region, könnte bessere Ergebnisse in der taxonomischen und systematischen Einordnung morphologisch nicht bestimmbarer Arten bringen. Die Untersuchung weiterer Baumarten würde die Erfassung der Artenvielfalt im Untersuchungsgebiet vervollständigen.

6 Zusammenfassung

Im Kronenraum eines temperaten mitteleuropäischen Hartholz-Auwaldes wurden Diversität, vertikale Verteilung und saisonale Aspekte von blattbewohnenden endophytischen Pilzen untersucht.

Im Herbst 2005 wurden im Untersuchungsgebiet des Leipziger-Auwaldkranes von *Acer pseudoplatanus*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur* und *Tilia cordata* Blätter jeweils in der Licht- und Schattenkrone der Bäume gesammelt. Zusätzlich wurden Lichtexposition, mittlere Blattgröße und Sammelhöhe der Sammelpunkte erfasst. Die Oberfläche der Blätter wurde sterilisiert und die Endophyten auf einem Nährmedium (Malzextrakt-Agar, MEA) isoliert. Die gewonnenen Isolate wurden in Morphospezies eingeteilt und soweit wie möglich anhand morphologischer Merkmale bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine taxonomische und systematische Einordnung der Morphospezies durch die Sequenzierung der D1/D2 variablen Region der großen ribsomalen Untereinheit (LSU) und anschließende phylogenetische Analysen. Die mit morphologischer und phylogenetischer Bestimmung ermittelte Artenliste bildete die Grundlage für die Berechnung von Arten-Akkumulationskurven und weitere Diversitätsstudien sowie die Analyse mit multivariater Statistik.

Es konnten Endophyten aus allen vier Wirtsbaumarten isoliert werden. Insgesamt wurden 40 Morphospezies isoliert, zwischen 20 und 22 pro Wirtsart. Die Arten-Akkumulationskurven und die Schätzwerte zur Ermittlung der Artenvielfalt zeigten, dass längst nicht alle Organismen gefunden werden konnten und keine Aussage über die zu erwartende Gesamtartenzahl möglich war. Nur für wenige Arten konnte eine Wirtsspezifität festgestellt werden. Aus den Schattenblättern wurden bei allen Wirten mehr Arten isoliert, als aus den Lichtblättern. Es gab sowohl Endophytenarten, die verstärkt in Schattenblättern zu finden waren als auch solche, die vor allem aus

Sonnenblättern isoliert werden konnten. Im Herbst wurden insgesamt mehr Arten isoliert als bei einer vergleichbaren Studie im Frühjahr. Auch hier gab es Arten, die im Frühjahr deutlich häufiger waren, und solche die im Herbst öfter isoliert werden konnten. Insgesamt konnte im Herbst ein verstärktes Vorkommen ubiquistischer Saprobionten festgestellt werden.

Die angewendeten Methoden erwiesen sich im Allgemeinen als gut geeignet für die Untersuchung blattbewohnender Endophyten. Es konnten zahlreiche Arten auf MEA isoliert werden. Als problematisch für die morphologische Bestimmung der Pilzkulturen erwies sich oft das Fehlen bestimmungsrelevanter Merkmale. Phylogenetische Untersuchungen der D1/D2 variablen Region ermöglichten teilweise eine sichere taxonomische und systematische Einordung der Morphospezies, für einzelne Gruppen erwies sich die Region jedoch als ungeeignet. Die multivariate Statistik mit NMS (Nonmetric Multidimensional Scaling) gab Hinweise auf die Verteilung der Arten in Abhängigkeit von der Lichtqualität und der Höhe. Untersuchungen mit DCA (Detrended Correspondence Analysis) berücksichtigten z. T. die Abundanz der Arten in den Sammelpunkten besser.

Es konnten wertvolle Erkenntnisse über die Diversität sowie zeitliche und räumliche Verteilung der Endophyten gewonnen werden. Die Arbeit soll als Vorstudie für eine umfassende Untersuchung endophytischer Pilze in Gehölzpflanzen in einem mitteleuropäischen Hartholz-Auwald dienen.

7 Literaturverzeichnis

Abliz, P., Fukushima, K., Takizawa, K. & Nishimura, K. (2004): Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **40**: 41-49.

Allen E.A., Hoch, H.C., Steadman, J.R. & Stavely, R.J. (1991): Influence of leaf surface features on spore deposition and the epiphytic growth of phytopathogenic fungi. In: *Microbial ecology of leaves*. Andrews, J.H. & Hirano, S.S. (eds). Springer Verlag. New York. S. 87-110.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.

Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D. & Kursar, T.A. (2000): Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* **3**: 267-274.

Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kyllo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. & Herre, E.A. (2003): Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15649-15654.

Basset, Y., Horlyck, V. & Wright, S.J. (2003): Forest canopies and their importance. In: *Studying Forest Canopies from Above: The International Canopy Crane Network*. Basset, Y., Horlyck, V. & Wright, S.J. (eds). Smithsonian Tropical Research Institute (Panama), United Nations Environmental Programme (UNEP). S. 27-34.

Beals, E.W. (1984): Bray-Curtis ordination - an effective strategy for analysis of multivariate ecological data. *Advances in ecological research* **14**: 1-55.

Bills, G.F. & Polishook, J.D. (1990): Microfungi from *Carpinus caroliniana*. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1477-1482.

Bridge, P.D., Roberts, P.J., Spooner, B.M. & Panchal, G. (2003): On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist* **160**: 43-48.

Carroll, G.C. (1988): Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **69**: 2-9.

Chao, A. (1984): Nonparametric estimation of the number of classes in a popula-

tion. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**: 265-270.

Chao, A. (1987): Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* **43**: 783-791.

Chao, A., Hwang, W.H., Chen, Y.C. & Kuo, C.Y. (2000): Estimating the number of shared species in two communities. *Statistica Sinica* **10**: 227-246.

Clay, K. (1988): Fungal endophytes of grasses - a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**: 10-16.

Colditz, G. (1994): Auen, Moore, Feuchtwiesen - Gefährdung und Schutz von Feuchtgebieten. Birkhäuser Verlag. Berlin.

Colwell, R.K. (2005): EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. User's Guide and application published at: http://purl.oclc.org/estimates.

Colwell, R.K. & Coddington, J.A. (1994): Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society* (Series B) **345**: 101-118.

Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**: 10881-10890.

Crous, P.W., Kang, J.C. & Braun, U. (2001): A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence an morphology. *Mycologia* **93**: 1081-1101.

Dufrêne, M. & Legrendre, P. (1997): Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs* **67**: 345-366

Ellenberg, H. (1996): Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen. 5. Aufl. Ulmer Verlag. Stuttgart.

Ellis, M.B. (1971): Dematiaceous hyphomycetes. Cambrian News. Aberystwyth, Dyfed, U.K.

Ellis, M.B. (1976): More dematiaceous hyphomycetes. Cambrian News. Aberystwyth, Dyfed, U.K.

Erwin, T.L. (1982): Tropical Forests: Their Richness in Coleoptera and Other Arthropod Species. *Colleopterists Bulletin* 36: S. 74-75.

Faeth, S.H. & Hammon, K.E. (1996): Fungal endophytes and phytochemistry of oak foliage: determinants of oviposition preference of leafminers? *Oecologia* **108**: 728-736.

Faeth, S.H. & Hammon, K.E. (1997 a): Fungal endophytes in oak trees: Long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology* **78**: 810-819.

Faeth, S.H. & Hammon, K.E. (1997 b): Fungal edophytes in oak trees: Experimantal analyses of interactions with leafminers. *Ecology* **78**: 820-827.

Finstermeier, K. (2006): Artenvielfalt, vertikale Verteilung und Wirtsspezifität

von blattbewohnenden endophytischen Pilzen im Kronenraum eines mitteleuropäischen Hartholzauwaldes. Diplomarbeit. Universität Leipzig.

Frey, W. & Lösch, R. (2004): Lehrbuch der Geobotanik. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag. München.

Gamboa, M.A., Laureano, S. & Bayman, P.(2002): Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia* **156**: 41-45.

Gange, A.C. (1996): Positive effects of endophyte infection on sycamore aphids. *Oikos* **75**: 500-510.

Gotelli, N. & Colwell, R.K. (2001): Quantifying biodiversity: Procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* **4**: 379-391.

Guo, L.D., Hyde, K.D. & Liew, E.C.Y. (2000): Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* **147**: 617-630.

Hall, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.

Hallé, F., Cleyet-Marrel, D. & Ebersolt, G. (2000): Le radeau des cimes. Éditions J C Lattès.

Halmschlager, E., Butin, H. & Donaubauer, E. (1993): Endophytische Pilze in Blättern und Zweigen von Quercus petraea. *European Journal of Forest Pathologie* **23**: 51-63

Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. & Pegler, D.N. (1995): Dictionary of the fungi. CAB International. Wallingford, Oxon, UK.

Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H. & Bohannan, B.J.M. (2001): Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4399-4406.

Jansen E. & Kirmse K. (2002): Das Naturschutzgebiet „Burgaue“. In: *Materialien zu Naturschutz und Landschaftspflege 2002*. Staatliches Umweltfachamt Leipzig (Hrsg). 43 S.

Kassen, R. & Rainey, P.B. (2004): The ecology and genetics of microbial diversity. *Annual Review of Microbiology* **58**: 207-231.

Kirk,P.M., Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A. (2001): Dictionary of the fungi. CAB International. Wallingford, Oxon, UK.

Kreisel, H. & Schauer, F. (1987): Methoden des mykologischen Laboratoriums. Gustav Fischer Verlag. Jena.

Knoop, V. & Müller, K. (2006): Gene und Stammbäume - Ein Handbuch zur molkularen Phylogenetik. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.

Körner, C., Asshoff, R., Bignucolo, O., Hättenschwiler, S., Keel, S.G., Peláez-Riedl, S., Pepin, S., Siegwolf, R.T.W. & Zotz, G. (2005): Carbon Flux and Growth in Mature Deciduous Forest Trees Exposed to Elevated CO_2. *Science* **309**: 1360-1362.

Kowalski, T. & Kehr, R.D. (1992): Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. *Sydowia* **44**: 137-168.

Lee, S.M. & Chao, A. (1994): Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models. *Biometrics* **50**: 88-97.

Lundqvist, N. (1972): Nordic Sordariaceae s. lat.. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB. Uppsala, Sweden.

Magurran, A.E. (2004): Measuring Biological Diversity. Blackwell publishing. Malden, Oxford, Carlton.

Mäkert, R. & Oertner, J. (2000): Neues Leben für die Aue - Ein erfolgversprechendes Wiedervernässungsprojekt bei Leipzig. In: *Naturschutz heute - Das NABU Magazin*, Ausgabe 3/00.

McCune, B. & Grace, J.B. (2002): Analysis of Ecological Communities. MjM Software Design. Oregon, USA.

McCune, B. & Mefford, M.J. (1999): PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data, Version 4.25. MjM Software Design. Oregon, USA.

Müller, G.K. & Zäumer, U. (Hrsg.) (1992): Der Leipziger Auwald: Ein verkanntes Juwel der Natur. Urania Verlag. Leipzig, Jena, Berlin.

Müller, K.F. (2005): The efficiency of different search strategies in estimating parsimony, jackknife, bootstrap, and Bremer support. *BMC Evolutionary Biology* **5**: 58

Müller, E. & von Arx, J.A. (1962): Die Gattungen der didymosporen Pyrenomyceten. Kommissionsverlag Buchdruckerei Büchler & CoAG. Wabern-Bern.

Morawetz, W. & Horchler, P.J. (2002): Leipzig Canopy Crane, Germany. In: *Global Canopy Handbook - Techniques of Access and Study in the Forest Roof* Mitchell, A.W., Secoy, K. & Jackson, T. (eds). Global Canopy Programme, Oxford. S.

Morawetz, W. & Horchler, P.J. (2003): Leipzig Canopy Crane Project (LAK), Germany. In: *Studying Forest Canopies from Above: The International Canopy Crane Network*. Basset, Y., Horlyck, V. & Wright, S.J. (eds). Smithsonian Tropical Research Institute (Panama), United Nations Environmental Programme (UNEP). S. 79-85.

Nadkarni, N.M., Parker, G.G., Rinker, H.B. & Jarzen, D.M. (2004): The nature of forest canopies. In: *Forest canopies*. Lowman, M.D. & Rinker, H.B. (eds). Elsevier Academic Press. London, San Diego. S. 3-23.

O'Donnell, K. (1993): *Fusarium* and its near relatives. In: *The fungal holomorph:*

mitotic, meiotic, and pleomorphic speciemen in fungal systematics. Reynolds, D.R. & Taylor, J.W. (eds). CAB International. Wallingford.

Ozanne, C.M.P., Anhuf, D., Boulter, S.L., Keller, M., Kitching, R.L., Körner, C., Meinzer, F.C., Mitchell, A.W., Nakashizuka, T., Silva Dias, P.L., Stork, N.E., Wright, S.J. & Yoshimura, M. (2003): Biodiversity meets the atmosphere: A global view of forest canopies. *Science* **301**: 183-186.

Pehl, L. & Butin, H. (1994): Endophytische Pilze in Blättern von Laubbäumen und ihre Beziehungen zu Blattgallen (Zooceciden). *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **297**: 1-56. Berlin-Dahlem, Germany.

Pennisi, E. (2005): Sky-High Experiments. *Sciences* **309**: 1314-1315.

Petrini, O. (1991): Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial ecology of leaves.* Andews, J.H. & Hirano, S.S. (eds). Springer Verlag. New York. S. 179-197.

Petrini, O., Sieber, T.N., Toti, L. & Viret, O. (1992): Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural toxins* **1**: 185-196.

Popper, K. (1994): Alles Leben ist Problemlösen - Über Erkenntnis, Geschichte und Politik. Piper-Verlag. München, Zürich.

Pott, R. (1995): Die Pflanzengesellschaften Deutschlands. 2. Aufl. Ulmer-Verlag. Stuttgart.

Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M. & Sullivan, T.J. (1998): Fungal Endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 319-343.

Santamaria, J. & Bayman, P. (2005): Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* **50**: 1-8.

Schardl, C.L., Leuchtmann, A., Chung, K.R., Penny, D. & Siegel, M.R. (1997): Coevolution by common descent of fungal symbionts (*Epichloë* spp.) and grass hosts. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 133-143.

Schnittler, M., Unterseher, M. & Tesmer, J. (in press): Species richness and ecological characterization of myxomycetes and myxomycete-like organisms in the canopy of a temperate deciduous forest. *Mycologia*, in press.

Sieber, T. & Hugentobler, C. (1987): Endophytische Pilze in Blättern und Ästen gesunder und geschädigter Buchen Fagus sylvatica L.). *European Journal of Forest Pathologie* **17**: 411-425.

Stone, J.K., Polishook, J.D. & White, J.F.jr. (2004): Endophytic Fungi. In: *Biodiversity of Fungi - Inventory and Monitoring Methods.* Mueller, G.M., Bills, G.F. & Foster, M.S. (eds.) Elsevier Academic Press. London, San Diego. S. 241-270.

Sitte, P., Weiler, E.W., Bresinsky, A. & Körner, C. (2002): Strasburger - Lehrbuch der Botanik. 35. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin.

Sutton, B.C. (1980): The Coelomycetes - Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acer-

vuli and Stromata.Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal, Slough, England.

Swofford, D.L. (2003): Paup*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other Methods), Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.

Todd, D. (1988): The effects of host genotype, growth rate, and needle age on the distribution of a mutualistic, endophytic fungus in Douglas-fir plantations. *Canadian Journal of Forest Research* **18**: 601-605.

Unterseher, M. & Tal, O. (2006): Influence of small scale conditions on the diversity of wood decay fungi in a temperate, mixes deciduous forest canopy. *Mycological Research* **110**: 169-178.

Wilson, D. (1993): Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind. *Oikos* **68**: 379-384.

Wilson, D. (1995): Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**: 274-276.

Wilson, D., Barr, M.E. & Faeth, S.H. (1997): Ecology and description of a new species of *Ophiognomonia* endophytic in the leaves of *Quercus emoryi*. *Mycologia* **89**: 537-546.

Wilson, D. & Carroll, G.C. (1994): Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia* **86**: 635-647.

Wilson, D. & Faeth, S.H. (2001): Do fungal endophytes result in selection for leafminer ovipositional preference? *Ecology* **82**: 1097-1111.

8 Anhang

8.1 Rezept für Malzextraktagar (MEA)

nach Kreisel & Schauer (1987)
25 g Malzextrakt und 20 g Agar-Agar mit 1000 ml Aqua dest auffüllen. 15 min bei 121°C autoklavieren. Auf 60°C abkühlen lassen, mit 0,1g Tetrazyklin versetzen und rühren bis sich das Tetrazyklin gelöst hat. Noch heiß unter sterilen Bedingungen etwa 0,4 mm dick in Petrieschalen (90 mm) gießen, offen abkühlen lassen und anschließend abdecken.

8.2 Übersicht über die Merkmale der Morphospezies

Tabelle 8.1: Morphologische Merkmale

Spezies / Morphospezies	Merkmale
Alternaria alternata / MS 9	• Konidien sehr verschieden gestaltet 14 - 40 μm lang und 10 - 25 μm breit, z. T. symmetrisch, teils mit „Anhängsel“ dieses bis ca. 25 μm lang • Konidien in (oft verzweigten) Ketten, selten einzeln, in der gesamten Kolonie gebildet • Myzel filzig, oberseits hellgrau-grün bis dunkelbraun, unterseits dunkelbraun bis schwarz
Apiognomonia errabunda / MS 31	• Konidien oval bis länglich z. T. leicht sichelförmig, 5 - 16 x 3 - 5 μm, hyalin • Konidiogene Zellen mit Colarett, determiniert • Kolonie oberseits flach, samtig, hell graubraun mit dunkelbraunen, weißen und rosafarbenen Flecken, unterseits dunkelbraun, an den Rändern ausgefranst • z. T. gelbe Verfärbung des Mediums
Aspergillus niger / MS 8	• Konidien in Köpfchen, schwarz, rund, 3 - 6 μm im Durchmesser, rauh • Konidiophoren hyalin, makronematos • Myzel weiß bis gelb, Kolonie oberseits dicht mit schwarzen Konidiosporen bedeckt, unterseits gelb

Tabelle 8.1: (Fortsetzung)

Spezies / Morphospezies	Merkmale
Aureobasidium pullulans / MS 3	• Kolonie anfangs hautfarben und hefeartig, später dunkel grünbraun, unregelmäßig gelappt bis kreisrund, Färbung ober- und unterseits gleich • Myzel flach auf der Platte aufliegend und im Agar (nicht filzig, wollig o.ä.), oberseits glänzend, Hyphen stark wellig bis knotig (Chlamydosporenbildung)
Chaetomiaceae Sp. / MS 23	• keine Sporenbildung • Myzel schwach filzig, oberseits weiß, unterseits weiß bis gelb
Cladosporium cladosporioides / MS 5	• Konidien ca. 2 bis 17 μm, globos bis limoniform, ein- oder zweizellig, mit ca. 0,5 μm dicker Wand, glatt • Ramikonidien vorhanden, ca. 12 bis 16 μm • Konidienträger makronematos, ca. 6 μm dick, dünnwandig, mit apikalen Verzweigungen, leicht gewunden, +/- farblos, feinwarzig • Kolonie oberseits dunkelbraun mit z. T. großflächigen hellgraubraunen Flecken, unterseits dunkelbraun bis schwarz • durch schnelle Sporulation z. T. zahlreiche Kolonien auf einer Platte
Diplodina acerina / MS 4	• Konidiosporen zweizellig • Konidiosporen als schleimige hautfarbene Sporenmasse von schwarzen Acervuli abegeben • Platte oberseits weiß bis gelbgrau, im Medium (MEA) hautfarben • Kolonie oberseits samtig, weiß bis rosa bis bräunlich, unterseits rosa bis hellbraun, Acervuli als schwarze Flecken auf der Unterseite zu sehen
Epicoccum nigrum / MS 7	• Konidiosporen ca. 15 bis 25 μm im Durchmesser, rund, mehrzellig muriform, rauh • in Sporodochien mit bis zu 1 mm Durchmesser gebildet • Kolonie oberseits filzig, grau mit gelben oder rosaroten Verfärbungen, unterseits gelbbraun, Medium kräftig gelb bis gelbbraun verfärbt
***Gibberella* sp.** / MS 17	• keine Sporenbildung • Sklerotien z. T. hautfarben bis gelblich, z. T. schwarz werden gebildet • Kolonie oberseits leicht filzig, weiß; unterseits gelblich bis bräunlich mit „flockiger“ bis „schuppiger“ Strukturierung

Tabelle 8.1: (Fortsetzung)

Spezies / Morphospezies	Merkmale
***Glomerella* sp. 1** / MS 16	• keine Konidien • Apressorien zahlreich in als schwarze Flecken erkennbaren Bereichen gebildet, 4-6 x 8-16 μm wenig verschiedengestaltig, länglich, gerade • Kolonie oberseits samtig bis filzig, grau; unterseits hell gelblichgrau, z. T. leicht rosa, in der Mitte schwarz; Medium hellgelb; Kolonie langsam wachsend, die Platte nicht vollständig bedeckend
***Glomerella* sp. 2** / MS 24	• Konidien gerade, ca. 16 x 4 μm, hyalin, einzellig • Konidien in halb aus dem Medium hervorstehenden Acervuli in der Mitte der Kolonie gebildet • Apressorien 4-6 x 8-10 μm, sehr verschieden gestaltig • Kolonie oberseits samtig bis filzig, grau, Acervuli als schwarze Punkte in der Mitte zu sehen; unterseits im Zentrum schwarz, außen grau, in der Mitte mit einem hellen Bereich, in dem die Acervuli als schwarze Punkte zu sehen sind, Außenrand der Kolonie oft ebenfalls dunkel; Kolonie schnell wachsend, die Platte vollständig bedeckend
Leptosphaeriaceae Sp. / MS 34	• keine Sporenbildung, unreife Pyknidien vorhanden • Kolonie oberseits graubraun und samtig mit hervorstehenden „Leisten“; unterseits dunkelbraun; Medium bräunlich verfärbt
***Lewia* sp. 1** / MS 38	• keine Sporenbildung • Kolonie oberseits grau, wollig bis filzig; unterseits braunschwarz
***Lewia* sp. 2** / MS 35	• keine Sporenbildung • Kolonie oberseits in der Mitte graubraun und samtig, am Rand dunkelbraun und glatt; unterseits schwarzbraun
***Lewia* sp. 3** / MS 40	• Konidien ca 20 x 10 μm, meist mit 5 Querwänden und einer Längswand, braun, symmetrisch bis schwach asymmetrisch, in Pyknidien gebildet • Pyknidien rund, mit Ostiolum, anfangs hell, später schwarzbraun • Kolonie oberseits glatt, grau bis braun; unterseits mehr oder weniger dunkelbraun
Morphospezies 26	• Konidien kurz oval bis rund, 3-4 x 4-5 μm, in Pyknidien gebildet • Pyknidien rund, bis ca. 260 μm im Durchmesser • Kolonie oberseits dunkelbraun mit beigen Flecken, filzig; unterseits dunkelbraun; Kolonieränder gelappt; Medium leicht bräunlich verfärbt

Tabelle 8.1: (Fortsetzung)

Spezies / Morphospezies	Merkmale
Morphospezies 37	• keine Sporenbildung • Kolonie oberseits grauschwarz, wollig bis filzig, einige Myzelstränge nach oben abstehend; unterseits schwarz
Morphospezies 39	• Sporen auf der gesamten Oberfläche einzeln gebildet, dunkelbraun, rund bis leicht oval, ca. 10-16 μm im Durchmesser • Kolonie oberseits hellgrau, filzig, Myzel sehr wenig dicht, Kolonie daher stellenweise durchscheinend; unterseits bräunlich mit dunkelbraunen Flecken
Mycosphaerellaceae Sp. 1 / MS 36	• keine Sporenbildung • Kolonie oberseits in der Mitte weiß bis zartrosa samtig, am Rand grünlich-braun durchscheinend und glatt; unterseits in der Mitte dunkelbraun, am Rand grünlich-braun durchscheinend
cf. Mycosphaerellaceae Sp. 2 / MS 19	• keine Sporenbildung • Kolonie oberseits hell grüngrau, mehlig, in der Mitte faltig; unterseits dunkelbraun
Mycovellosiella fulva / MS 6	• Konidien (12-) 20-22 (-26) μm lang, flaschenförmig, septiert, glatt, • Konidiophoren verzweigt • Kolonien oberseits samtig, dunkelgrün bis dunkelbraun, unterseits grünschwarz
Periconia cookei / MS 25	• Konidiophoren makronematos, 10μm dick, Konidien in Köpfchen • Konidien in basipedalen Ketten auf Phialiden, 8 - 18 μm im Durchmesser, rund, rauh • Kolonie oberseits leicht filzig, weiß bis braun, Gruppen von Konidienträgern als dunkle Flecken zu erkennen, unterseits dunkelbraun
***Phoma* sp. 1** / MS 10	• Konidien 5 - 6 x 2,5 - 3 μm, ohne Strukturierung • Chlamydosporen vorhanden, in Ketten perlschnurartig aufgereiht, wenige oder keine Septen • Kolonien oberseits samtig, hellgrau-rosa bis braun; Konidienmasse als schwarze, glänzende Flecken zu sehen; unterseits hautfarben bis braun, ebenfalls mit schwarzen Flecken
***Phoma* sp. 2** / MS 11	• Konidien ca. 4 - 8 x 2,5 - 3,5 μm, nicht septiert • Pyknidien ca. 250 μm im Durchmesser • keine Chlamydosporen • Kolonien oberseits samtig bis glatt, hell- bis dunkelbraun z. T. mit hautfarbenen Flecken; unterseits hautfarben bis braun

Tabelle 8.1: (Fortsetzung)

Spezies / Morphospezies	Merkmale
***Phomopsis* sp.** / MS 14	• α Konidien ca. 4 - 8 x 4 μm, z. T. bipoar, sonst subzylindrisch, hyalin, mit feinen Guttulen • β Konidien ca. 18 - 24 μm lang, z. T. leicht gebogen, filiform, hyalin, ohne Guttulen • α und β Konidien in Konidiomata gebildet und als schleimige hautfarbene Sporenmasse abgegeben • Kolonie oberseits glatt mit fädigem Filz, weiß, Konidiomata schwarz, in Gruppen auf der gesamten Platte verteilt; unterseits weiß bis braun, Konidiomata als dunkelbraun bis schwarze Flecken sichtbar
Pleosporaceae Sp. 1 / MS 27	• Konidien ca. 44 - 48 x 10 - 12 μm, 2 bis 4 Pseudosepten, z. T. auch zusätzlich geteilte Vakuolen, basale Zelle oft mit basalem dunklem Septum abgeschlossen • Konidiophoren unverzweigt, Konidienbildung terminal • Hyphen teilweise warzig, stellenweise perlenkettenartige Strukturen • Kolonie oberseits wollig, dunkelgrau; unterseits schwarz
Pleosporaceae Sp. 2 / MS 30	• Konidien in Pyknidien gebildet, Pyknidien bis ca. 600 μm im Durchmesser • Chlamydosporen vorhanden, einzeln gebildet, mehrzellig, meist mit drei Querwänden und einer Längswand, ca. 12 x 20 μm • Kolonie oberseits fleckig hell- bis dunkelgrau; unterseits fleckig braun
Pleosporaceae Sp. 3 / MS 33	• Pyknidien angelegt, aber noch keine Konidien gebildet, Pyknidien in Gruppen • Kolonie oberseits in der Mitte beige, außen dunkelbraun; unterseits dunkelbraun; Ränder gelappt; Medium leicht bräunlich verfärbt
Pleosporales Sp. 1 / MS 21	• Konidien ca. 6 x 20 μm, zweizellig, braun, in Pyknidien gebildet • Pycnidinen ca. 300 μm im Durchmesser, in Gruppen • Kolonie oberseits hell- bis dunkelgrau, samtig; unterseits mittel- bis dunkelbraun, Pyknidiengruppen als schwarze Flecken sichtbar
Pleosporales Sp. 2 / MS 29	• keine Sporenbildung • Kolonie oberseits graubraun mit dunkelbraunen, rosaroten und weißen Flecken, samtig bis filzig; unterseits dunkelbraun
Pleosporales Sp. 3 / MS 32	• keine Sporenbildung • Kolonie oberseits graubraun, samtig bis filzig; unterseits dunkelbraun; Ränder „ausgefranst“ bis gelappt

Tabelle 8.1: (Fortsetzung)

Spezies / Morphospezies	Merkmale
Sordaria fimicola / MS 1	• Perithecium ca. 500 x 340 μm • Asci 8-sporig ca. 150 μm lang • Sporen ca. 18 x 11 bis 23 x 13 μm, breit ellipsoid, braun, jung farblos und grob granulär, von schleimiger Hülle umgeben • Myzel rasch die ganze Platte bedeckend, durchsichtig bis weiß bis grau (ober- und unterseits gleich) und sehr dünn filzig, Platte von Perithecien dicht schwarz gepunktet, Perithecien ober- und unterseits sichtbar
Sordaria humana / MS 2	• Perithecium: Wand aus Textura globulosa/prismatica, Zellen 5 bis 7 μm • Asci 8-sporig ca. 250 μm lang • Sporen ca. 18 x 24 bis 20 x 26 μm, breit ellipsoid, schwarz, jung farblos und grob granulär • Myzel rasch die ganze Platte bedeckend, dunkel grau bis braun (ober- und unterseits gleich) und sehr dünn filzig, Platte von Perithecien schwarz gepunktet, Perithecien ober- und unterseits sichtbar
***Sordaria* sp.** / MS 15	• Perithecien- aber keine Sporenbildung • Kolonie oberseits leicht samtig, wenig LuftMyzel, weiß bis hautfarben; unterseits hautfarben • Perithecien über die gesamte Platte verteilt, ober- und unterseits als schwarze Punkte sichtbar
Sporormiaceae Sp. / MS 18	• keine Sporenbildung • Kolonie glatt, Myzel in konzentrischen Ringen, ober- und unterseits in der Mitte braun, außen hellbraun
Valsaceae Sp. / MS 28	• keine Sporenbildung • Kolonie oberseits grau, samtig, mit dunkelbraunen Sklerotien; unterseits mittelbraun Sklerotien als dunkelbraunen Flecken zu sehen
cf. Venturiaceae Sp. / MS 22	• keine Sporenbildung • Kolonie sehr langsam wachsend; oberseits hell (weiß bis zartbraun, z. T. zartrosa) und samtig, am Rand durchscheinend, stets faltig; unterseits dunkel orangebraun; Medium kräftig orange bis bräunlich verfärbt
***Xylaria* sp.** / MS 12	• Konidien an Stroma als grauer mehliger Belag gebildet • Kolonie oberseits samtig, weiß mit vom Zentrum ausgehenden weißen Streifen, später dunkelbraun mit weißen Streifen; unterseits weiß, später mit dunkelbraunen Verfärbungen

Tabelle 8.1: (Fortsetzung)

Spezies / Morphospezies	Merkmale
***Xylariales* Sp. 1** / MS 13	• keine Sporenbildung • Kolonie oberseits weiß, z. T. mit schwarzen flecken, filzig; unterseits weiß z. T. mit schwarzen Flecken; Ränder gelappt, Myzel oft vom Zentrum ausgehende Streifen und konzentrische Ringe bildend
Xylariales Sp. 2 / MS 20	• keine Sporenbildung • Kolonie in der Mitte graubraun, am Rand weiß, filzig bis samtig; unterseits in der Mitte dunkelbraun, außen rötlich-braun