Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

Neue Erkenntnisse aus einem pharmakologischen Pilz-Screening*)

M. M. Dreyfuss

Präklinische Forschung, Sandoz AG, CH-4002 Basel, Schweiz

Summary. – Some noteworthy mycological findings gathered during the microbiological screening programme at Sandoz are presented; the concept of obtaining strains from ecological niches is discussed and some examples are given. New findings concerning the occurrence of secondary metabolites in fungal taxa are discussed together with some physiological and ecological implications of the producing organisms. The hitherto known taxonomic spectrum of fungi producing β-lactam-antibiotics, Echinocandin-type antifungal peptides, Cyclosporins and Cytochalasines is broadened, and two new and useful aids for the isolation of fungi in pure culture are described.

1. Einleitung

Die für ein Screening benötigten Mikroorganismen (Bakterien, Actinomyceten, Pilze) können aus jedem erdenklichen Substrat isoliert werden. Die Isolate werden anschließend auf die Bildung von industriell verwertbaren, meistens niedermolekularen Sekundärmetaboliten geprüft. Kulturbrühen oder grobe Aufreinigungen davon werden in einer Batterie relevanter Teste geprüft. Aktive Isolate sind Kandidaten für weitere Untersuchungen.

Üblicherweise bilden Pilze in Kultur nur sehr kleine Mengen der gesuchten Metaboliten (1 bis 20 mg/l Kulturbrühe). Die Reinisolierung genügender Mengen (100–500 mg) für weitere Untersuchungen ist meistens recht aufwendig, jedoch unumgänglich, um das pharmakologische Profil, die Toxität oder die Neuheit des Metaboliten abzuklären. Angesichts der rund 4000 aus Pilzen beschriebenen Metaboliten (Turner, 1971; Turner & Aldridge, 1983) ist die Neuheitsabklärung auch mit den modernsten spektroskopischen Methoden nicht immer einfach.

Das bei Sandoz seit etwa 20 Jahren durchgeführte mikrobiologische Screening lieferte eine Vielzahl neuer Pilzmetaboliten unterschiedlicher Strukturklassen, deren pharmakologische Eigenschaften sehr vielfältig sind.

Ein Screening darf nie statisch sein, vielmehr sind Zielsetzungen und Techniken ständig neuen Erfordernissen und Möglichkeiten

*) Herrn Prof. Dr. E. Müller, Zürich, Schweiz, zum 65. Geburtstag gewidmet (vgl. SYDOWIA 38, 1985).

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

anzupassen. Für den involvierten Mykologen bieten sich in der Praxis viele Chancen an, neue Wege einzuschlagen, methodologische Entwicklungen zu realisieren, sowie interessante Schlüsse aus der laufenden Arbeit zu ziehen. Im Rahmen des Screenings einer industriellen Forschung kann allerdings nicht jede Frage abschließend und in allen Einzelheiten geklärt werden: Screeningsergebnisse sind demnach häufig präliminärer Natur. Der vorliegende Beitrag enthält bewußt solche präliminäre Befunde, er soll jedoch dazu dienen, einen Einblick in die Aspekte eines industriellen Pilzscreenings zu geben und Anregungen für den in der Praxis und in der Grundlagenforschung tätigen Mykologen bieten.

2. Herkunft der Screening-Stämme

Voraussetzungen für ein mikrobiologisches Screening sind in Reinkultur züchtbare Stämme der zu untersuchenden Mikroorganismen. Für industrielle Screeningprogramme wird der Hauptanteil der Stämme noch heute aus Erde isoliert. Ohne Zweifel stellt Erde eine reiche Quelle dar, woraus Saproben mit großer taxonomischer und physiologischer Diversität isoliert werden können. Aus Bodenpilzen werden laufend neue Metaboliten beschrieben: das Reservoir „Erde" ist demnach noch nicht ausgeschöpft.

Mit steigender Trefferquote werden aber auch längst bekannte Metabolite wiederentdeckt, was die Effizienz des Screenings gewiß mindert. Der Grund dafür liegt darin, daß ein Anteil ubiquitärer Bodenpilze immer wieder isoliert und untersucht wird, und daß innerhalb gleicher Taxa dieselben Metabolite mit erhöhter Koinzidenz vorkommen („Redundanz"), was Loeffler (1984) am Beispiel der Antibiotika aus Pilzen ausführlich diskutierte.

Zur Entschärfung des Redundanzproblemes und zur Erhöhung der Chancen, neuartige Metabolite zu finden, wurden im Sandoz-Screeningprogramm Organismen geprüft, welche aus weiteren ökologischen Nischen isoliert wurden (Tab. 1). Dabei wurde auf folgende Kriterien geachtet:

- Das Substrat muß leicht zu beschaffen sein.
- Mit relativ konventionellen Methoden ist eine hohe Ausbeute vielfältiger Pilzpopulationen zu erreichen.
- Die Pilzpopulationen enthalten wenige typische Bodenpilze. Isolate bestimmter *Acremonium-*, *Aspergillus-*, *Cladosporium-*, *Doratomyces-*, *Fusarium-*, *Myrothecium-*, *Paecilomyces-*, *Penicillium-* und *Verticillium-*Arten sowie Mucorales fehlen oder sind zumindest nicht dominant.
- Die isolierten Pilze müssen mit vertretbarem Aufwand in vitro züchtbar sein.

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

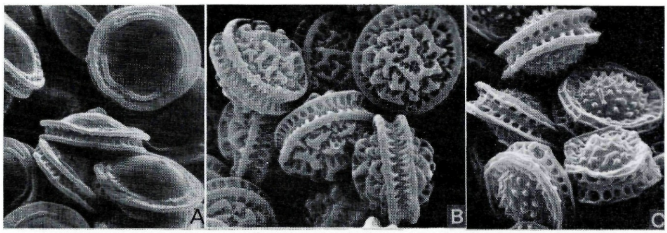
Tabelle 1: Überblick über einige bearbeitete ökologische Nischen und allgemeine Charakteristika der daraus isolierten Pilze.

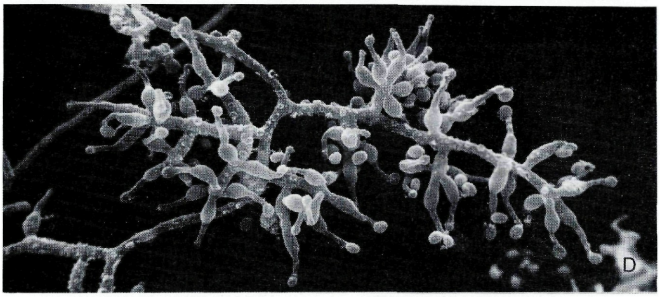
Substrat / ökologische Nische	Bemerkungen zu den Pilzisolaten	Literatur
Lebende Pflanzen aus gemäßigten und tropischen Klimazonen	Endophytische Pilze, taxonomisch weit gefächert, häufig nicht leicht bestimmbar. Relativ problematische Konservierung der Isolate über längere Zeiträume (≥ 1 Jahr)	PETRINI & al. (1979) PETRINI & MÜLLER (1979) PETRINI (1984) LUGINBÜHL & MÜLLER (1981) WIDLER & MÜLLER (1984) PETRINI & DREYFUSS (1981) DREYFUSS & PETRINI (1984)
Abgestorbene, verrottende Basidiomyceten,insbesonders Polyporaceen (z. B. *Fomes* spp.)	Neben einem weiten Spektrum von Ascomyceten und Fungi imperfecti, auffallend viele extrem langsam wachsende, meist dunkelgefärbte, sterile Pilzkolonien, sowie Hefen	BARR (1976) HAWKSWORTH (1980) HAWKSWORTH (1981) GRAY & MORGAN – JONES (1980) BISHT & al. (1984)
Flechten	Neben den extrem langsam wachsende Mycobionten, erhält man aus Flechtenthalli eine Fülle rascher wachsender, aber oft steril bleibender „Endobionten". Relativ problematische Konservierung der Isolate über längere Zeiträume (≥ 1 Jahr). Kaum Literatur über Kulturen solcher Flechten-Endobionten	HAWKSWORTH (1979) HAWKSWORTH + JONES (1981) TURIAN (1977)
Moose	Fülle unterschiedlichster, gut wachsender Pilze. Keine Literatur über die Kultivierung der Moos-Endobionten	DÖBBELER (1981)
Wasser, Schaum und totes Pflanzenmaterial aus fließenden Gewässern	„Ingoldsche" aquatische Hyphomyceten	WEBSTER & DESCALS (1981)
Wasser, Wasseroberfläche und Pflanzenmaterial aus stehenden Gewässern	Aero-aquatische Hyphomyceten	FISHER & WEBSTER (1981)

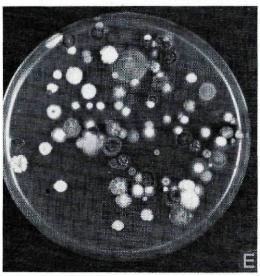
3. Neue Labortechniken zur Verbesserung und Vereinfachung der Pilzisolation

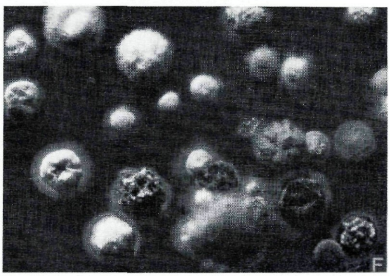
Zur Isolation von Pilzen aus natürlichen Substraten eignet sich das „direkte Plattenverfahren". Kleine Mengen (0,1–0,3 ml) Suspensionsverdünnungen der Ausgangssubstrate werden direkt auf die

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.









A–C: REM-Aufnahmen der Ascosporen von *Emericella nidulans* S 10/F (A), *E. rugulosa* S 7810/F (B) und *E. nidulans var. echinulata* CBS 120.55 (C), alle 7000fach vergrößert (Aufnahmen zusammen mit Universität Zürich).
D: REM-Aufnahme eines Conidiophors von *Tolypocladium inflatum* S 7939/F, 6600fach vergrößert (Aufnahme zusammen mit Universität Basel).
E & F: Gehemmte Pilzkolonien auf einer Isolationsplatte mit Cyclosporin-haltigem (2 mg/L) Isolationsmedium (2% Malextraktagar).

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

Nähragar-Oberfläche in Petri-Schalen aufgetragen, die so beimpften Platten inkubiert und die gewachsenen Pilzkolonien isoliert. Durch Zusatz von Antibiotika zum Agar können Bakterien selektiv unterdrückt werden. Rasch wachsende Pilze stellen dagegen ein Problem dar, weil sie die langsamer wachsenden, zeitlich später sich entwickelnden Kolonien überwuchern. Als wirksame Maßnahme dagegen haben sich die Anwendung einer einfachen Lötkolben-Technik zur Elimination unerwünschter, rasch wachsender Pilze und der Zusatz von Cyclosporin zum Medium besonders bewährt. Die beiden Methoden ergänzen sich.

3.1. *Lötkolben-Technik zur Elimination unerwünschter Pilzkolonien*

Diese Technik beruht auf dem frühzeitigen „Ausbrennen" unerwünschte Pilzkolonien aus den Isolationsplatten. Ein Lötkolben WELLER Typ WTCP mit PT-H7 Spitze (EGLI, FISHER & Co. AG, Zürich) hat sich gut bewährt, aber jeder Lötkolben mit genügend feiner Spitze kann eingesetzt werden.

Bereits 24–48 Stunden nach dem Inkubationsbeginn werden inokulierte Platten unter der Binokularlupe auf auswachsenden, 0,5–3 mm großen, noch wenig in den Agar eingedrungenen Pilzkolonien untersucht. Diese sind im Allgemeinen bereits habituell charakteristisch, sodaß nur wenige Stämme davon isoliert und die restlichen Kolonien anschließend mit der heißen Lötkolbenspitze ausgebrannt werden können. Dieser Vorgang muß mehrmals in Abständen von 24 bis 48 Stunden wiederholt werden, bis keine rasch ausbreitenden Kolonien mehr drohen, die Agarfläche zu überwachsen. Diese Maßnahme erlaubt, je nach Art der Probe 10–1000fach höhere Suspensionskonzentrationen zu verwenden als ohne diesen Eingriff; dadurch können auch sehr langsam wachsende Pilze erfaßt werden.

3.2. *Isolationsmedien mit Cyclosporin-Zusatz*

Die Verwendung selektiver Wachstums- oder Sporulationshemmer als Hilfe für die Pilzisolation ist in der Literatur mehrfach beschrieben (z. B. CURL, 1968; TSAO, 1970; HENSON, 1981; BEILHARZ & al. 1982; GAMS & VAN LAAR, 1982; WAINWRIGHT, 1982; THOMAS, 1985).

Ein im SANDOZ-eigenen Screening entdeckter antifungisch wirkender Metabolit, Cyclosporin (vergl. 4.2.) stellte sich als ausgezeichneter Medienzusatz heraus. Die Zugabe von 1 bis 10 ppm Cyclosporin zu einem Isolationsmedium (z. B. 2% Malzextraktagar) bewirkte eine starke, jedoch nicht vollständige Flächenwachstumshemmung der meisten Pilzkolonien (Tafel 1 E, 1 F), sodaß Isola-

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

tionsplatten mit bis zu 150 Kolonien noch gut verwendet werden können. Die mit dem cyclosporinhaltigen Medium in direktem Kontakt stehenden Pilzhyphen sind stark verformt, verkrüppelt und abnormal stark verästelt, während das Luftmycel farblich meist normal ausdifferenziert, und die Sporulation normal erfolgt.

4. Sekundärmetaboliten von Pilzen

4.1. β-Lactam-Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine)

Fünf Coelomyceten-Stämme, die als Endophyten aus verschiedenen, in einem Mangrovenwald in Mexiko epiphytisch wachsenden *Tillandsia* spp. (Bromeliaceae) isoliert und zur Formgattung *Pleurophomopsis* PETRAK (O. PETRINI, pers. Mitt.) zugeordnet wurden, fielen während des Screenings wegen ihres typischen Penicillin-Aktivitätsprofils auf. Nach den bisherigen Kenntnissen (KITANO, 1983; Tab. 2) war das Vorkommen dieser Strukturklasse von Antibiotika bei Coelomyceten noch nie beobachtet worden.

Tabelle 2: Das Vorkommen von β-Lactam-Antibiotika bei Pilzen
[Nach KITANO (1983), leicht verändert]

Familie	Teleomorph Gattung	←Taxonomischer Zusammenhang→ Produkte*	Produkte*	Anamorph Gattung
Eurotiaceae	*Emericella*	P	P	*Aspergillus*
	Eupenicillium	P		
	Talaromyces	P	P	*Penicillium*
			P	*Epidermophyton*
Gymnoascaceae	*Gymnoascus*	P	P	*Trichophyton*
Eurotiaceae	*Thermoascus*	P	P	*Polypaecilum*
			C	*Paecilomyces*
Pseudeurotiaceae	*Emericellopsis*	C	C	*Acremonium*
Onygenaceae	*Arachnomyces*	C	C	*Spiroidium*
	Anixiopsis	C	C	*Scopulariopsis*
			C	*Diheterospora*
			P	*Malbranchea*

P = Penicillin G C = Cephalosporine und/oder Penicillin N

Die chemische Untersuchung aktiver Brühen dieser Stämme lieferte insofern eine weitere Überraschung, als darin nur Penicillin N gefunden wurde (T. FEHR, SANDOZ, pers. Mitt.). Soweit bis heute bekannt ist, stellt Penicillin N ein Zwischenprodukt in der Cephalosporin C-Biosynthese dar (AOKI & OKUHARA, 1980). Isopenicillin N

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

seinerseits ist sowohl ein Vorläufer des Penicillin N als auch der Penicillin G-Typ β-Lactame (DEMAIN et al., pers. Mitt.). Reine Penicillin N-produzierende Wildstämme sind bei Pilzen noch nicht beschrieben worden.

Als weiteren, neuen Befund werten wir auch das Auffinden von praktisch reinem Deacetoxycephalosporin C (T.FEHR, pers. Mitt.) in einem aus Meerschlamm isolierten *Nigrosabulum*-Stamm (Pseudoeurotiaceae; Anamorph: *Acremonium*). Auch dieses β-Lactam ist in der Regel ein Zwischenprodukt in der Penicillin N/Cephalosporin C-Biosynthese.

4.2. Peptid-Antifungika vom Echinocandin-Typ

4.2.1. Echinocandine aus der *Aspergillus nidulans*-Gruppe sensu RAPER & FENNELL (1965)

Echinocandin B wurde erstmals von BENZ & al (1974) als antifungischer Metabolit aus einem als *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus* FENNELL & RAPER identifizierten Stamm isoliert. Kurze Zeit später konnte dieser Metabolit aus *Aspergillus rugulosus* THOM & RAPER [Teleomorph: *Emericella rugulosa* (THOM & RAPER) BENJAMIN] in den SANDOZ-Laboratorien isoliert werden. Neben Echinocandin B wurden dabei zwei weitere Nebenmetabolite, Echinocandin C und D isoliert und strukturell aufgeklärt (KELLER-JUSLEN & al., 1976; TRABER & al., 1979).

Ebenfalls in diese Periode fallen Patentanmeldungen der Firma ELI LILLY & Co., in denen mit Echinocandinen identische Metabolite aus *Aspergillus nidulans* und *A. rugulosus* (EIDAM) WINTER beansprucht werden (z. B. Deutsche Offenlegungsschrift P 26 43 485.5 und P 26 43 487.7).

Für Vergleichszwecke wurden die von CIBA-GEIGY und ELI LILLY hinterlegten Produktionsstämme sowie die Typusstämme von *Emericella nidulans* var. *echinulata* (CBS 120.55) und *E. rugulosa* (CBS 133.60) beschafft. Zudem wurden mehrere Dutzend *E. nidulans* und *E. rugulosa*-Stämme verschiedenster Kultursammlungen und aus eigenen Isolationen vergleichend untersucht. Die Ergebnisse dieses Vergleiches sind in Tab. 3 zusammengefaßt. Daraus läßt sich schließen, daß es sich beim ursprünglich beschriebenen Echinocandin B-Produzenten (BENZ & al., 1974) um einen *E. rugulosa*-Stamm handelt. Die Echinocandinbildung und die Resistenz gegen diesen Metaboliten können somit als Artmerkmal von *E. rugulosa* angenommen werden.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 3: Einige Charakteristika von und Unterschiede zwischen *Emericella nidulans, E. nidulans var. echinulata* und *E. regulosa.*

Spezies/Stämme	Bildung von Echinocandin, Nachweisgrenze 5 mg/L	Sensitivität gegen Echinocandin bei 10 mg/ml	Wachstums-Charakteristika	Ascosporen-Morphologie im REM [vgl. auch Locci (1972)]
E. nidulans 29 Wildstämme	keine Bildung	sensitiv		
E. nidulans 3 Wildstämme NRLL 8112	Bildung	sensitiv	Bei 37°C deutlich rascheres Wachstum als *E. rugulosa*	Tafel 1 a
E. nidulans var. echinulata CBS 120.55 (= Typus) ZT 2894	keine Bildung	sensitiv	Koloniewachstum auf 2% Malzagar rascher als auf Czapek-Agar	Tafel 1 c
E. rugulosa 28 Wildstämme CBS 133.60 (= Typus) CBS 130.48, CBS 117.50, CMI 84338, CMI 91020, CMI 16059, IFO 5865, IFO 8626, IFO 8629	Bildung	resistent	Bei 37°C deutlich langsameres Wachstum als *E. nidulans* Koloniewachstum auf 2% Malzagar langsamer als auf Czapek-Agar	Tafel 1 b

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

4.2.2. Echinocandin-ähnliche Metabolite aus anderen Pilzgruppen

Weitere Screeningergebnisse ergaben, daß die Bildung Echinocandin-ähnlicher Metabolite keineswegs allein den im Abschnitt 4.2.1. erwähnten Pilzarten eigen ist.

Aculeacin, ein Echinocandin B-Analog, wurde von MIZUNO & al. (1977) aus *Aspergillus aculeatus* ITIZUKA (*Aspergillus niger*-Gruppe sensu RAPER & FENNEL, 1965) isoliert.

Aus dem eigenen Screening ging Acrophiarin hervor (H. TSCHERTER & R. TRABER, SANDOZ, unveröffentlicht), von einem einzigen *Penicillium arenicola* CHALABUDA-Stamm (S 31 794/F) produziert, welcher aus einer kanadischen Bodenprobe stammte. Bei drei weiteren *P. arenicola*-Isolaten aus europäischen Böden, beim Typusstamm CBS 220.66 und beim Typusstamm von *Penicillium canadense* G. SMITH (CBS 245.56, Synonym für *P. arenicola*?) konnte dagegen keine auf Acrophiarin beruhende Aktivität nachgewiesen werden.

Die Sporiofungine A, B und C konnten aus einem Stamm (S 41 062/F) der Coelomycetengattung *Cryptosporiopsis* BUBAK & KABAT erhalten werden, der als Endophyt aus dem Rhizom von *Cardamine heptaphylla* SCHULZ isoliert worden war (PACHE & al., 1983).

Schließlich wurde eine weitere Variante dieser Metabolitengruppe (S 41 075/F-1) von einem anderen, aus *Abies alba* MILL.-Nadeln isolierten, sterilen und langsam wachsenden endophytischen Pilzstamm gewonnen (H. TSCHERTER & R. TRABER, unveröffentlicht).

Nach diesen Ergebnissen ist im einen Fall das artspezifische *(E. rugulosa)* aber nicht strikt artengruppenspezifische (*E. nidulans*-Gruppe), im anderen Fall *(Penicillium arenicola)* das Stamm-spezifische Vorkommen sowie das Auftreten derselben Metabolitengruppe in ganz unterschiedlichen pilzlichen Unterklassen (Hyphomyceten–Coelomyceten) hervorzuheben.

Obwohl bisher keiner der Echinocandin-ähnlichen Metabolite zur Bekämpfung humanpathogener Pilze eingesetzt worden ist, ist der Wirkungsmechanismus wissenschaftlich von besonderem Interesse, weil die antifungale Wirkung auf die Hemmung der Glucanbiosynthese der pilzlichen Zellwand beruhen dürfte (MIZOGUCHI & al., 1977; CASSONE & al., 1981; IWATA & al., 1982; YAMAGUCHI & al., 1982; BOZZOLA & al., 1983; MIYATA & al., 1985).

4.3. Cyclosporine

Cyclosporine (Cy) sind zyklische, aus 11 Aminosäuren bestehende Peptide mit einer neuartigen C_9-Aminosäure. In der Regel wird Cyclosporin A als Hauptmetabolit gebildet; bis heute sind jedoch bereits 27 Nebenkomponenten bekannt (vgl. TRABER & al., 1987).

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

Ursprünglich waren Cy als antifungisch wirkende Metabolite im Screening angefallen (DREYFUSS & al., 1976). Cy A wurde als erster Vertreter isoliert und strukturell aufgeklärt (RÜEGGER & al., 1976), erhielt aber seine therapeutische Bedeutung nicht als Antifungikum sondern als Immunsupressivum (WEIL, 1984; PTACHCINSKI & al., 1985).

Cy wurde im Screening kurz hintereinander in zwei taxonomisch nicht nahe verwandten Pilzen gefunden: Zuerst in einem *Fusarium (solani?)*-Stamm, der Cy nur in Standkultur produzierte, und später in einem *Tolypocladium inflatum*-Stamm [ursprünglich als *Trichoderma polysporum* identifiziert und patentiert, später als *Tolypocladium inflatum* GAMS (GAMS, 1971 a) erkannt und von BISSETT (1983) zu *Tolypocladium niveum* gestellt], welcher die Metabolite auch in Submersfermentation bildete.

Aus technischen Gründen wird heute nur *T. inflatum* für die Cy-Produktion verwendet.

Im Hinblick darauf, Wildstämme mit höheren Titern oder unterschiedlichen Komponentenverhältnissen der Cyclosporine zu finden, wurden *Fusarium*- und *Tolypocladium*-Stämme aus eigenen Isolationen und aus Kultursammlungen untersucht. Stämme anderer Pilzgattungen wurden ebenfalls in dieses spezifische Screening miteinbezogen, wobei die Cy-Bildung chromatographisch nachgewiesen wurde (Nachweisgrenze 5 mg/l). Tabelle 4 faßt die gewonnenen chemotaxonomischen Erkenntnisse zusammen.

Unsere Befunde, wonach neben *Tolypocladium* spp. auch einzelne, habituell *Tolypocladium*-artig erscheinende Stämme der Gattungen *Acremonium, Isaria, Paecilomyces* und *Verticillium* Cyclosporine bilden können, sind ein Hinweis für mögliche phylogenetische Zusammenhänge unter diesen und weiteren Formgattungen wie *Beauveria, Diheterospora, Harposporium, Sesquicillium* und andere. Diese bilden vorherrschend weiße, eher langsam wachsende Kolonien bei niederen Temperaturoptima (20–24°C). Ihre konidiogenen Zellen stehen in Wirteln oder dichten Gruppen, selten solitär, sind an der Basis häufig auffallend geschwollen, dann aber lang und dünn ausgezogen. Die hyalinen Konidien sind in der Regel klein und entstehen phialidisch oder sympodial-holoblastisch. Innerhalb aller erwähnten Gattungen sind Arten vertreten, welche auf Pflanzen oder niederen Tieren symbiontisch-antagonistisch leben. *T. inflatum, T. geodes* und *T. nubicola,* die einzigen bisher bekannten Cybildenden *Tolypocladium*-Arten, sind allerdings bisher ausschließlich als Saproben bekannt (BARRON, 1980 a & b; BARRON 1983; BISSETT, 1983; KISH & al., 1984; SAMSON & al., 1984; WEISER & PILLAI, 1981).

Trichoderma spp. könnten möglicherweise ebenso in diesen Verwandtschaftskomplex gehören, obwohl ihr Wachstumsverhalten

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

ganz anders ist; GAUZE & al. (1983) fanden in *Trichoderma viride* ebenfalls Antibiotika der Cyclosporingruppe.

Fusarium spp. und *Neocosmospora* spp. (für beide Gattungen ist eine *Acremonium*-Mikrokonidienform bekannt) stellen als CY-Bildner wohl eine getrennte Entwicklungslinie dar. Das Vorkommen von Cy in *Fusarium (solani?)* könnte vielleicht so generell sein wie bei *Tolypocladium inflatum* und *T. geodes;* SAWAI & al. (1981) und HONG & al. (1984) berichten ebenfalls über die Isolierung von Cy aus *F. solani*-Stämmen.

Tabelle 4: Zusammenstellung von Beobachtungen und chemotaxonomische Zusammenhänge von Cyclosporin-bildenden Pilzen

Spezies/Stämme		Cyclosporin-Bildung
Tolypocladium inflatum GAMS 104 Wilstämme Typuskultur CBS 824.70		alle Stämme bilden Cyclosporin
Tolypocladium geodes GAMS 24 Wildstämme Typuskultur CBS 723.70		alle Stämme bilden Cyclosporin, jedoch meist in niedereren Titern als bei *T. inflatum*
Tolypocladium nubicola BISSETT, CBS 568.84		Cyclosporin-Bildung wahrscheinlich
Tolypocladium extinguens SAMSON & SOARES, CBS 345.77 *Tolypocladium parasiticum* BARRON, CBS 300.83 *Tolypocladium trigonosporum* BARRON, P 102 ex G. L. BARRON *Tolypocladium cylindrosporum* GAMS, 18 Wildstämme *Tolypocladium tundrense* BISSETT, CBS 569.84 *Tolypocladium* sp; morphologisch intermediär zw. *T. inflatum* und *T. cylindrosporum,* zwei Wildstämme S 49870/F und S 49919/F		keine Cyclosporin-Bildung nachgewiesen
Acremonium sp., S 42160/F *Paecilomyces* sp., S 84-21622/F *Verticillium* sp., 85-22022/F *Isaria felina* (DC. per FR.) Fr., S 249/F	Kultur-habitus *Tolypocladium*-artig	Niedertitrige Cyclosporin-Produzenten
Neocosmospora vasinfecta E. F. SMITH S 8939/F *Fusarium* sp. *(F. solani?),* 22 Wildstämme		Cyclosporinbildung in Oberflächenkulturen

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

4.4. Cytochalasine aus endophytischen *Xylaria* spp.

Bei der Isolierung endophytischer Pilze aus südamerikanischen und mexikanischen, tropischen Pflanzen fielen zahlreiche Isolate auf, die als Anamorphe von *Xylaria* spp. bestimmt werden konnten (DREYFUSS & PETRINI, 1984). Diese Isolate waren in den klassischen antibakteriellen und antifungalen Tests des Screenings praktisch inaktiv, bildeten hingegen Metabolite, welche die Vermehrung bestimmter Säugetierzellen in vitro hemmten. Bei ihren Metaboliten handelt es sich nachgewiesenermaßen um verschiedene, sehr wahrscheinlich sogar um einige strukturell neue Cytochalasine (H. TSCHERTER, unveröffentlicht).

Aspergillus clavatus, A. microcysticus, Chaetomium globosum, C. cochliodes, Diplodia macrospora, Helminthosporium dematioideum, Hormiscium spp., *Metarrhizium anisopliae, Nigrosabulum* spp., *Penicillium aurantio-virens, Phoma* spp., *Phomopsis* spp., *Rosellinia necatrix* (Xylariaceae!) und *Zygosporium masonii* sind bisher als Produzenten dieser Metabolitengruppe bekannt (LOEFFLER, 1984; COLE & COX, 1981). Es ist noch nicht abgeklärt, ob *Xylaria* spp. generell Metabolite dieser Klasse zu bilden vermögen; immerhin ist die Auflistung von *Rosellinia necatrix* unter den Cytochalasin-Produzenten ein Hinweis dafür.

Danksagungen

Mein Dank richtet sich an alle in der MIKROBIOLOGISCHEN FORSCHUNG SANDOZ tätigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter. Ganz besonders möchte ich Frl. B. GROSS, Frau G. DAVIDSSON, Herrn K. MÜLLER und Herrn. U. STRAHM für ihren Einsatz bei der Bewältigung alltäglicher und weniger alltäglicher Probleme danken. Ich danke auch Dr. H. KOBEL, Dr. W. PACHE, Dr. J. RUTSCHMANN und Dr. A. VON WARTBURG für ihr Vertrauen, mir die Freiheit zu gewähren, auch etwas eigenwillige Wege einzuschlagen. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. E. MÜLLER und Dr. O. PETRINI für die geführten anregenden Gespräche, Ratschläge und direkten Hilfeleistungen bei der Bestimmung von Pilzen. Frau Dr. U. EBNER danke ich für wertvolle Literaturrecherchen und Frau E. KOHLER und Frl. L. RUDDERFORTH für die Reinschrift des Manuskriptes.

Literaturverzeichnis

AOKI, H. & OKUHARA, M. (1980). – Natural β-lactam antibiotics. – Ann. Rev. Microbiol. 34: 159–181.

BARR, M. E. (1976). Some setose saprobic pyrenomycetes on old Basidiomycetes. – Rhodora. 78: 53–59.

BARRON, G. L. (1980 a). – Fungal parasites of rotifers: a new *Tolypocladium* with underwater conidiation. – Can. J. Bot. 58: 439–442.

— (1980 b). – Two new fungal parasites of bdelloid rotifers. Can. J. Bot. 59: 1449–1455.

— (1983). – Structure and biology of a new *Tolypocladium* attacking bdelloid rotifers. – Can. J. Bot. 61: 2566–2569.

BEILHARZ, V. C., PARBERY, D. G. & SWART, H. J. (1982). – Dodine: A selective agent for soil fungi. – Trans Br. mycol. Soc. 79: 507–511.

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

BENZ, F., KNÜSEL, F., NÜESCH, J., TREICHLER, H., VOSER, W., NYFELER, R. & KELLER-SCHIERLEIN, W. (1974). – Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Echinocandin B, ein neuartiges Polypeptid-Antibiotikum aus *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus:* Isolierung und Bausteine. – Helv. Chim. Acta. 57: 2459–2477.

BISHT, N.S., HARSH, N. S. K. & JOSHI, M. C. (1984). – Biodeterioration of higher fungi by other fungi. – Indian Phytopathology. 37: 176–178.

BISSETT, J. (1983). – Notes on *Tolypocladium* and related genera. – Can. J. Bot. 61: 1311–1329.

BOZZOLA, J. J., MEHTA, R. J., NISBET, L. J. & VALENTA, J. R. (1983). – The effect of aculeacin A and papulacandin B on morphology and cell wall ultrastructure in *Candida albicans*. – Can. J. Microbiol. 30: 857–863.

CASSONE, A., MASON, R. E. & KERRIDGE, D. (1981). – Lysis of growing yeast-form cells of *Candida albicans* by Echinocandin: A cytological study. – Sabouraudia. 19: 97–110.

COLE, R. J. & COX, R. H. (1981). – Handbook of toxic fungal metabolites. – Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco. 937 S.

CURL, E. A. (1968). – Value of plant growth retardant for isolating soil fungi. – Can. J. Microbiol. 14: 182–183.

DÖBBELER, P. (1981). – Moosbewohnende Ascomyceten V. Die auf *Dawsonia* vorkommenden Arten der Botanischen Staatssammlung München. – Mitt. Bot. München. 17: 393–473.

DREYFUSS, M., HÄRRI, E., HOFMANN, H., KOBEL, H., PACHE, W. & TSCHERTER, H. (1976). Cyclosporin A and C. New Metabolites from *Trichoderma polysporum* (LINK ex PERS.) RIFAI. – European J. Appl. Microbiol. 3: 125–133.

DREYFUSS, M. & PETRINI, O. (1984). – Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. – Botanica Helvetica 94: 33–40.

FEDERICI, B. A., FETTER-LANKO, J., SOARES, G. & TSAO, P. W. (1980). – Fungi show promise in biological control. – California Agriculture 34: 25–27.

FISHER, P. J. & WEBSTER, J. (1981). – Ecological studies on aero-aquatic hyphomycetes. In: The fungal community, its organisation and role in the ecosystem; Eds: D. T. WICKLOW & CARROLL, G. C. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1981.

GAMS, W. (1971 a). – *Tolypocladium*, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen Phialiden. – Persoonia 6: 185–191.

— (1971 b). – *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). – Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1–262.

— & VAN LAAR, W. (1982). – The use of Solacol (validamycin) as a growth retardant in the isolation of soil fungi. – Neth. J. Pl. Path. 88: 39–45.

GAUZE, G. F., TEREKHOVA, L. P., MAXIMOVA, T. S., BRAZHNIKOVA, M. G., FEDOROVA, G. B. & BORISOVA, B. N. (1983). – Screening of new antibiotics of Cyclosporin group. Antibiotiki 28: 243–245.

GRAY, D. J. & MORGAN-JONES, G. (1980). – Notes on Hyphomycetes: 34. Some mycoparasitic species. – Mycotaxon 10: 375–404.

HAWKSWORTH, D. L. (1979). – The lichenicolous Hyphomycetes. – Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot). 6: 183–300.

— (1980). – Two little-known members of the Mycocaliciaceae on Polypores. – Trans. Br. Mycol. Soc. 74: 650–651.

— (1981). – A survey of the fungicolous conidial fungi. – In: Biology of conidial fungi, Vol. 1. Academic Press, New York. S. 171–244.

— & JONES, D. (1981). – *Sclerococcum sphaerale* obtained in pure culture. Trans. Br. Mycol. Soc. 77: 485–489.

HENSON, O. E. (1981). – Dichloran as an inhibitor of mould spreading in fungal plating media: Effects on colony diameter and enumeration. – Appl. Environ. Microbiol. 42: 656–660.

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

HONG, L., TANG, X., MIAO, C. H. & WANG, Y. (1984). – Cyclosporin produced by *Fusarium solani* sp. no. 4–11. II. Isolation, separation, purification and identification. – Kangshengsu 9: 5–15.

IWATA, K., YAMAMOTO, Y., YAMAGUCHI, H. & HIRATANI, T. (1982). – In vitro studies of Aculeacin A, a new antifungal antibiotic. – J. Antib. 35: 203–209.

KELLER-JUSLÉN, C., KUHN, M., LOOSLI, H. R., PETCHER, T. J., WEBER, H. P. & VON WARTBURG, A. (1976). – Struktur des Cyclopeptid-Antibiotikums SL 7810. (= Echinocandin B). – Tetrahedron Letters. 46: 4147–4150.

KISH, P., ALLEN, G. E., KIMBROUGH, J. W. & KUITERT, C. (1984). – A survey of fungi associated with the love-bug, *Plecia Nearctica,* in Florida. – The Florida Entomologist, 57 (B): 281–284.

KITANO, K. (1983). – Recent Progress in the Discovery of Beta-Lactam Antibiotics. – Progress in industrial microbiology. 17: 37–69.

LOCCI, R. (1972). – Scanning electron microscopy of ascosporic Aspergilli. – Rivista Di Patologia Vegetale, Supplemento al Vol. 8, Serie 4: 1–172.

LOEFFLER, W. (1984). – Antibiotikabildung durch Pilze – Eine taxonomische Betrachtung. – Forum Mikrobiologie 7: 219–229.

LUGINBÜHL, M. & MÜLLER, E. (1981). – Endophytische Pilze in oberirdischen Organen von vier gemeinsam am gleichen Standort wachsenden Pflanzen *(Buxus, Hedera, Ilex, Ruscus).* – Sydowia 33: 185–209.

MIYATA, M., KANBE, T. & TANAKA, K. (1985). – Morphological alterations of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* in the presence of Aculeacin A: Spherical wall formation. – J. Gen. Microbiol. 131: 611–621.

MIZOGUCHI, J., SAITO, T., MIZUNO, K. & HAYANO, K. (1977). – On the mode of action of a new antifungal antibiotic, Aculeacin A: Inhibition of cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae.* – J. Antib. 30: 308–313.

MIZUNO, K., YAGI, A., SATOI, S., TAKADA, M., HAYASHI, M., ASKANO, K. & MATSUDA, T. (1977). – Studies on Aculeacin. I. Isolation and characterization of Aculeacin A. – J. Antib. 30: 297–307.

PACHE, W., DREYFUSS, M., TRABER, R. & TSCHERTER, H. (1983). – Sporiofungins, new antifungal antibiotics of the cyclopeptide group. – Poster, 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna. 28 8.–2. 9. 83.

PETRINI, O. (1984). – Endophytic fungi in British Ericaceae: a preliminary study. – Trans. Br. Mycol. Soc. 83: 510–512.

— & DREYFUSS, M. (1981). – Endophytische Pilze in epiphytischen *Araceae, Bromeliaceae* und *Orchidaceae.* – Sydowia. 34: 135–148.

— & MÜLLER, E. (1979). – Pilzliche Endophyten, am Beispiel vom *Juniperus communis* L. – Sydowia 32: 224–251.

— MÜLLER, E. & LUGINBÜHL, M. (1979). – Pilze als Endophyten von grünen Pflanzen. – Naturwissenschaften 66: 262.

PTACHCINSKI, R. J., BURCKART, G. J. & VENKATARAMANAN, R. (1985). – Cyclosporine. – Drug Intelligence Clin. Pharm. 19: 90–100.

RAPER, K. B. & FENNELL, D. I. (1965). – The Genus *Aspergillus.* The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 686 S.

RÜGGER, A., KUHN, M., LICHTI, H., LOOSLI, H. R., HUGUENIN, R., QUIQUEREZ, C., & VON WARTBURG, A. (1976). – Cyclosporin A, ein immunsuppressiv wirksamer Peptidmetabolit aus *Trichoderma polysporum* (LINK ex PERS.) RIFAI. – Helv. Chim. Acta. 59: 1075–1092.

SAMSON, R. A. & SOARES, G. J. Jr. (1984). – Entomopathogenic Species of the Hyphomycete Genus *Tolypocladium.* – J. Invertebrate Pathology 43: 133–139.

SAWAI, K., OKUUO, T., TERADA, Y., HARADA, Y., SAWAMURA, K., SASAKI, H. & TAXAO, S. (1981). – Isolation and properties of two antifungal substances from *Fusarium solani.* – Agric. Biol. Chem. 45: 1223–1228.

THOMAS, R. (1985). – Selective medium for isolation of *Termitomyces* from termite nests. – Trans. Br. Mycol. Soc. 84: 519–526.

Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.

TRABER, R., HOFMANN, H., LOOSLI, H. R., PONELLE, M. & VON WARTBURG, A. (1987). – 2. Neue Cyclosporine aus Tolypocladium inflatum. Die Cyclosporine K–Z. – Helv. Chim. Acta. 70: 13–36.

— KELLER-JUSLÉN, C., LOOSLI, H.-R., KUHN, M. & VON WARTBURG, A. (1979). – Cyclopeptid – Antibiotika aus *Aspergillus*-Arten. Struktur der Echinocandine C und D. – Helv. Chim. Acta. 62: 1252–1267.

TSAO, P. H. (1970). – Selective Media for isolation of pathogenic fungi. – Annu. Rev. Phytopathol. 8: 157–186.

TURIAN, G. (1977). – *Coniosporium aeroalgicolum* sp. nov., moissisure Dématiée semilichénisante. – Ber. Schweiz. Bot. Ges. 87: 19–24.

TURNER, W. B. (1971). – Fungal Metabolitetes. Academic Press, London–New York. 446 S.

— & ALDRIDGE, D. C. (1983). – Fungal Metabolites II. Academic Press, London–New York. 1983.

WAINWRIGHT, M. (1982). – Origin of fungal colonies on dilution and soil plates determined using nonanoic acid. – Trans. Br. Mycol. Soc. 79: 178–179.

WEBSTER, J. & DESCALS, E. (1981). – Morphology, distribution and ecology of conidial fungi in freshwater habitats. – In: Biology of conidial fungi, Vol. 1. Academic Press, New York. S. 295–355.

WEIL, C. (1984). – Cyclosporin A: A review of results in organ and bone-marrow transplantation in man. Med. Res. Rev. 4 (2): 221–265.

WEISER, J. & PILLAI, J. S. (1981). – *Tolypocladium cylindrosporum* (Deuteromycetes Moniliaceae). A new pathogen of mosquito larvae. – Entomophaga 26 (4): 357–361.

WIDLER, B. & MÜLLER, E. (1984). – Untersuchungen über endophytische Pilze von *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) SPRENGEL (Ericaceae). – Bot. Helv. 94: 307–337.

YAMAGUCHI, H., HIRATANI, T., IWATA, K. & YAMAMOTO, Y. (1982). – Studies on the mechanism of antifungal action of Aculeacin A. – J. Antib. 35: 210–219.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Sydowia

Jahr/Year: 1986/1987

Band/Volume: 39

Autor(en)/Author(s): Dreyfuss Michael

Artikel/Article: Neue Erkenntnisse aus einem pharmakologischen Pilz-Screening. 22-36