
**Analytische Untersuchungen zu den Alkaloiden
Lolitrem B und Paxillin von *Neotyphodium lolii* und
Lolium perenne, *in vivo* und *in vitro***

Dem Fachbereich Chemie und Chemietechnik
der Universität-Gesamthochschule Paderborn

**zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften**

- Dr. rer. nat. -

vorgelegte
Dissertation

von Johannes Reinholz

aus Bad Sassendorf

Paderborn, 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 1995 bis Dezember 1998 im Labor für Biotechnologie und Qualitätssicherung des Fachbereiches Agrarwirtschaft der Universität-Gesamthochschule Paderborn angefertigt.

1. Referent: Prof. Dr. K. Krohn
2. Referent: Prof. Dr. V. H. Paul
3. Referent: Prof. Dr. G. Masuch
Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. H. Marsmann

Externer Referent: Prof. Dr. H.-J. Aust (TU Braunschweig)

Mündliche Abschlußprüfung:

01.September 2000

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit:

REINHOLZ, J., DAPPRICH, P., PAUL, V. H. and KROHN, K., **1997**: *Acremonium* spp. in German pastures - occurrence, significance and the contents of some characteristic alkaloids. International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium, May 28 - May 31, 1997, Athens, Georgia - USA

REINHOLZ, J., PAUL, V. H. and KROHN, K., **1998**: Quantification of the tremorgenic mycotoxins lolitrem B and paxilline in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and in *Neotyphodium lolii* in vitro cultures. Rev. Méd. Vét., Juin 1998: 524.

REINHOLZ, J., PAUL, V. H. and KROHN, K., **1998**: Occurrence of the Tremorgenic Alkaloid Lolitrem B in *Neotyphodium lolii* Infested Perennial Ryegrass (*Lolium perenne*). ICPP 98, 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland 9-16 August, 1998, 2.9.17.

HOLZMANN, A., REINHOLZ, J., OSTBOMKE, H. and PAUL, V. H., **1998**: Distribution of *Neotyphodium lolii* in *Lolium perenne* cultivars and ecotypes in Europe. ICPP 98, 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland 9-16 August, 1998, 2.9.20.

Summary

The coexistence of the endophytic fungi *Neotyphodium* spp. with different grass species can be classified as a mutualistic symbiosis. Both the host grass and the fungus profit from the relationship. On the one hand, the population of *Neotyphodium* fungi is increased by the host grass, through dispersal of infected seed. The host grass benefits from the production of special alkaloids by the *Neotyphodium* fungi in the plants, which have particular characteristics (e.g. drought stress tolerance, resistance to pests of insects and microorganisms). Through these characteristics, endophyte-infected grass becomes more competitive than uninfected in the presence of biotic and abiotic stresses. Apart from these positive effects of the symbiosis, the high accumulation of alkaloids can also cause undesirable animal disorders such as ryegrass staggers and fescue toxicosis in grazing animals. Much of the research on endophytes has been done in the USA and New Zealand, where the diseases on animals were observed for the first time in the fifties. Recently the theme of *Neotyphodium* research has been continued in Europe, through works in France (GRAND-RAVEL, 1997), United Kingdom (LEWIS & CLEMENTS, 1986), Switzerland (SCHMIDT, 1986) and Germany (DAPPRICH, 1996; EGGESTEIN, 1997). The dissertation in hand contains detailed investigations of the symbiosis between the endophytic fungus *N. lolii* and the host grass *L. perenne* under the climatic conditions ruling in Germany. In detail, these were the assessment of the occurrence of *N. lolii* in varieties and ecotypes of *L. perenne*, as well as *in vivo*- and *in vitro*-experiments on the detection of the alkaloid Lolitrem B in grasses and fungi-isolates. The methodology and results of this work can be summarised as follows:

In order to analyse the occurrence of *N. lolii* in *L. perenne* varieties, all 84 fodder grass varieties in the describing list of grass, clover, lucerne (1995) were examined microscopically. The fungus *N. lolii* was found in 10 of these 84 *L. perenne* varieties and infection levels ranged from 2 to 15 %. The investigation of a further 36 Dutch *L. perenne* varieties resulted in the detection of the fungus *N. lolii* in 16 samples (44 %), with infection levels ranging from 1 to 93 %. Samples of seed of 53 Rumanian ecotypes were examined and the fungus *N. lolii* was detected in 24 (45 %), with infection levels ranging from 1 to 100 %. In general, it appeared that the fungus *N. lolii* occurs rarely in European *L. perenne* varieties and only at low infection levels. In contrast, ecotypes are essentially more frequently colonised by the fungus *N. lolii*, and at higher infection levels. Infection levels near 100 % are common. Investigations of the infection level of different seed samples from one variety showed only a slight variation. Despite the different locations in which the varieties were bred, the standard deviation of the *Neotyphodium* infection level of the varieties examined was only three percent.

In field trials, the dry matter yield of *Neotyphodium*-colonised varieties of *L. perenne* tended to be greater than that of the equivalent *Neotyphodium*-free varieties. The dry matter yield of *Neotyphodium*-colonised varieties was significantly higher than the *Neotyphodium*-free equivalents in seven cases, and was never significantly lower. There was no significant interaction between the different rates of fertiliser applied and the level of *Neotyphodium* colonisation. Disregarding endophytic status, dry matter yield increased with increasing applications of fertiliser up to 450 kg N/ha year in 44 of 51 comparisons.

The aim of field trials located at Merklingsen (research station of the University of Paderborn) was to determine whether the animal disorder ryegrass staggers, caused by the alkaloid Lolitrem B, can occur under climatic conditions ruling in Germany. The concentrations of Lolitrem B were found to vary very greatly. A maximum concentration of 400 µg/kg DM was found in the field trial with the *L. perenne* variety Ellett (1995-1996), and for the variety Yatsyn (1997 and 1998)

concentrations ranged from 18 to 1797 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM. The Lolitrem B concentration of some samples was above the toxic dose of 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM, with a maximum of 2470 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM. Therefore, these results show that there is the potential for ryegrass staggers to occur in Germany. In the field trial with the varieties Yatsyn, Embassy and Nui, Lolitrem B concentrations ranged from 16 to 1136 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM. The influence of nitrogen fertilisation on Lolitrem B concentration was studied in two field trials. In one of these trials, where harvesting was infrequent (variety Yatsyn, 1996-1998), Lolitrem B concentration was significantly higher at the higher rate of fertilisation in three of six comparisons. In the other trial, where harvesting was more frequent (varieties Yatsyn, Embassy and Nui), the results were less conclusive. With the variety Embassy, a significant interaction between nitrogen fertilisation and Lolitrem B concentration was recorded at the first cut, but results for subsequent cuts were variable. With the varieties Embassy and Yatsyn, there were three cases in which a significantly higher Lolitrem B concentration was recorded at the lower fertilisation rate. The influence of air temperature on Lolitrem B concentration in plants was also studied in the field trials and a positive relationship was recorded. Generally, the maximum Lolitrem B concentrations were recorded after warmer periods in the summer months of July and August. Lower concentrations were recorded at the beginning and end of the grass growth period, in May and October respectively. The variety of *L. perenne* used was found to influence Lolitrem B concentration. No relationship was found between Lolitrem B concentration and infection level. The varieties Yatsyn, Embassy and Nui had comparable levels of *Neotyphodium* infection, but showed great variation in Lolitrem B concentration. Lolitrem B concentration can be regarded as a characteristic feature of a variety. The genotype of the host grass as well as the genetic variability of the fungus are responsible for Lolitrem B production in the plant.

An increase in Lolitrem B concentration with increasing temperature was also recorded in climatic chamber experiments. An increase in temperature of about 10 °C resulted in a sevenfold increase in Lolitrem B concentration in the plant. The increase in Lolitrem B concentration was recorded in all sections of the plant. However, there were some populations of plants in which no Lolitrem B was detectable at any temperature, despite an infection level of 100 % with the fungus *N. lolii*. In the vegetative stage, the maximum Lolitrem B concentration in a *Neotyphodium*-colonised *L. perenne* plant was found in the leaf sheath section. Over all varieties and temperatures, on average 75 % of the total Lolitrem B concentration was found in the lowest five centimeters of the plant (i.e. leaf sheath section). The averages for the leaf blade section and the roots were 18 % and 7 % respectively.

Lolitrem B concentrations in individual plants within a variety and/or population were found to vary greatly. Further *in vivo*-investigations were carried out to identify plants in which little or no Lolitrem B was produced. Dry matter samples of *Neotyphodium*-colonised plants of different ecotypes and varieties were analysed for Lolitrem B concentration in glasshouse trials. No detectable amount of Lolitrem B was found in 18 *N. lolii*-colonised Rumania ecotypes. Analyses of Lolitrem B, and the precursor paxilline, were also done on 34 *in vitro*-cultures of *N. lolii* and two cultures of other species of fungus. The paxilline concentration in the most *in vitro*-cultures was at the μg level, whereas that of Lolitrem B was at the ng level. For the *N. lolii*-isolates, paxilline concentration in ranged from not detectable to 25 $\mu\text{g}/\text{agar}$ plate and Lolitrem B concentration ranged from 11 to 725 ng/agar plate. Thus Lolitrem B was detectable in all *N. lolii*-isolates examined. There was no correlation between Lolitrem B concentration *in vitro* (from *N. lolii* isolates) and *in vivo* (from corresponding host grasses). Therefore, the Lolitrem B concentration produced by an isolate of *N. lolii* in an agar culture is not an indication of the concentration that will be produced by the same isolate within a plant.

No correlation was found between *Neotyphodium* infection level and Lolitrem B concentration in studies on 75 seed samples. Lolitrem B was not detectable in 47 seed samples, but in 12 of these samples, *Neotyphodium* was present at a level of more than 80%. Therefore, the presence of Lolitrem B in a seed sample is an indication of the presence of *Neotyphodium*, but the absence of Lolitrem B in the seed does not necessarily mean that the seed is *Neotyphodium*-free.

In the course of the investigations on the occurrence of *N. lolii* in *L. perenne* varieties and ecotypes, NIR-Spectroscopy was tested as a possible method for detecting the presence of *Neotyphodium*. As expected, the NIR-spectra of the seed samples in diffuse reflexion could be obtained, but no significant differences were detected between results for *Neotyphodium*-colonised and *Neotyphodium*-free samples.

Inhaltsverzeichnis

Summary	II
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	XIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Anfänge der <i>Neotyphodium</i> spp. Endophytenforschung	1
1.2. Taxonomie und Biologie der <i>Neotyphodium</i>-Pilze	2
1.3. Die Wirtsgräser der <i>Neotyphodium</i>-Pilze	7
1.3.1. <i>Lolium perenne</i> (Deutsches Weidelgras)	7
1.3.2. <i>Festuca pratensis</i> (Wiesenschwingel)	9
1.3.3. <i>Festuca arundinacea</i> (Rohrschwingel)	10
1.4. Effekte der mutualistischen Symbiose zwischen den <i>Neotyphodium</i>-Pilzen und den Wirtsgräsern	11
1.4.1. Positive Effekte der mutualistischen Symbiose.....	13
1.4.2. Negative Effekte der mutualistischen Symbiose	14
1.5. Wichtige Alkaloide der <i>Neotyphodium</i> spp.-Gras-Interaktion.....	16
1.5.1. Ergotalkaloide.....	17
1.5.2. Paxillinindole.....	22
1.5.3. Aminopyrrolizidine.....	24
1.5.4. Azaindolizidine	27
1.6. Nachweismethoden für <i>Neotyphodium</i> spp. <i>in vivo</i>.....	32
2. Problemstellung.....	35
3. Material und Methoden	37
3.1. Verwendeter Nachweis der <i>Neotyphodium</i>-Pilze in Karyopsen und Blattscheiden von <i>L. perenne</i>	37
3.2. Isolierung von <i>Neotyphodium</i> spp. aus Blattscheiden.....	38
3.3. Erfassung des Vorkommens von <i>N. lolii</i> in Sorten und Ökotypen von <i>L. perenne</i>.....	39
3.3.1. Herkunft der untersuchten Sorten.....	39
3.3.2. Herkunft der untersuchten Ökotypen.....	39
3.4. Einfluss der <i>Neotyphodium</i>-Besiedlung auf die Pflanzenentwicklung und Ertragsbildung von <i>L. perenne</i>	40
3.4.1. Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998.....	41
3.4.2. Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998.....	41
3.5. Untersuchungen zum Vorkommen des Alkaloids Lolitrem B <i>in vivo</i>	42
3.5.1. Analyse von Lolitrem B mit der HPLC mit Fluoreszenzdetektion	42
3.5.2. Screening von Pflanzenmaterial der rumänischen Ökotypen auf das Alkaloid Lolitrem B	43
3.5.3. Untersuchungen von Frischmasseproben aus Freilandversuchen auf das Alkaloid Lolitrem B.....	44
3.5.3.1. Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> an den Standorten Soest und Asendorf von 1994 bis 1996.....	44

3.5.3.2.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998.....	44
3.5.3.3.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998.....	44
3.6.	Lolitrem B-Gehalt einzelner Individuen innerhalb einer <i>L. perenne</i>-Sorte bzw. -Population und Bestimmung des Stichprobenumfangs	45
3.7.	Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt in <i>neotyphodium</i>-besiedelten <i>L. perenne</i>-Pflanzen	45
3.7.1.	Orientierender Vorversuch zum Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt.....	45
3.7.2.	Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt sowie der Verteilung von Lolitrem B innerhalb der Pflanze.....	46
3.8.	Untersuchungen zum Vorkommen der Alkaloide Lolitrem B und Paxillin <i>in vitro</i>	46
3.9.	Mögliche neue innovative Verfahren zum Nachweis von <i>Neotyphodium</i> in Karyopsen.....	47
3.9.1.	Zusammenhang zwischen Lolitrem B-Gehalt und <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung in Karyopsen unterschiedlicher Sorten und Ökotypen von <i>L. perenne</i>	47
3.9.2.	Einsatz der NIR-Spektroskopie zur Bestimmung der <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung in <i>L. perenne</i>	48
4.	Ergebnisse	49
4.1.	Vorkommen von <i>N. lolii</i> in Sorten und Ökotypen von <i>L. perenne</i>.....	49
4.1.1.	Vorkommen von <i>N. lolii</i> in Sorten	49
4.1.2.	Vorkommen von <i>N. lolii</i> in Ökotypen.....	53
4.2.	Identifizierung und Sammlung von <i>Neotyphodium</i>-Isolaten verschiedener Herkunft	56
4.3.	Einfluss der <i>Neotyphodium</i>-Besiedlung auf die Ertragsbildung von <i>L. perenne</i>	57
4.3.1.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998.....	57
4.3.2.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998.....	59
4.4.	Screening von Pflanzenmaterial der rumänischen Ökotypen auf das Alkaloid Lolitrem B.....	62
4.5.	Lolitrem B-Gehalte in Frischmasseproben aus Freilandversuchen	64
4.5.1.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> an den Standorten Merklingsen und Asendorf von 1994 bis 1996	64
4.5.2.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998.....	65
4.5.3.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998.....	70
4.6.	Untersuchungen zum Vorkommen der Alkaloide Lolitrem B und Paxillin <i>in vitro</i>	74
4.7.	Lolitrem B-Gehalte einzelner Individuen innerhalb einer Sorte bzw. Ökotypen von <i>L. perenne</i>	75
4.8.	Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt in <i>neotyphodium</i>-besiedelten <i>L. perenne</i>-Pflanzen	76
4.8.1.	Orientierender Vorversuch zum Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt.....	76
4.8.2.	Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt sowie der Verteilung von Lolitrem B innerhalb der Pflanze.....	78
4.9.	Mögliche neue innovative Verfahren zum Nachweis von <i>Neotyphodium</i> in Karyopsen.....	80
4.9.1.	Zusammenhang zwischen Lolitrem B-Gehalt und <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung im Saatgut unterschiedlicher Sorten und Ökotypen von <i>L. perenne</i>	80

4.9.2.	Einsatz der NIR-Spektroskopie zur Bestimmung der <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung in <i>L. perenne</i>	82
5.	Diskussion.....	87
5.1.	Vorkommen von <i>N. lolii</i> in Sorten und Ökotypen von <i>L. perenne</i>.....	87
5.2.	Einfluss der <i>Neotyphodium</i>-Besiedlung auf die Ertragsbildung von <i>L. perenne</i>	89
5.3.	Bildung von Lolitrem B in <i>neotyphodium</i>-besiedelten <i>L. perenne</i>-Pflanzen.....	90
5.3.1.	Lolitrem B-Gehalte in Frischmasseproben aus Freilandversuchen.....	90
5.3.2.	Einfluss der Witterung auf den Lolitrem B-Gehalt	91
5.3.2.1.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1994 bis 1996....	91
5.3.2.2.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998....	92
5.3.2.3.	Freilandversuch mit <i>L. perenne</i> am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998....	95
5.3.3.	Lolitrem B-Gehalt einzelner Individuen innerhalb einer Sorte bzw. Population von <i>L. perenne</i> (Bestimmung des Stichprobenumfangs).....	95
5.3.4.	Temperaturabhängigkeit des Lolitrem B-Gehaltes in der Pflanze.....	97
5.3.5.	Verteilung des Lolitrem B innerhalb der Pflanze	98
5.3.6.	Lolitrem B-Gehalte in Sorten und Ökotypen von <i>L. perenne</i>	99
5.4.	Vorkommen der Alkaloide Lolitrem B und Paxillin <i>in vitro</i>	100
5.5.	Vergleich der <i>in vivo</i>- und <i>in vitro</i>-Untersuchungen.....	101
5.6.	Mögliche neue innovative Verfahren zum Nachweis von <i>Neotyphodium</i> in Karyopsen.....	103
5.6.1.	Zusammenhang Lolitrem B-Gehalt und <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung im Saatgut unterschiedlicher Sorten und Ökotypen von <i>L. perenne</i>	103
5.6.2.	Einsatz der NIR-Spektroskopie zur Bestimmung der <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung in <i>L. perenne</i>	103
6.	Zusammenfassung.....	105
7.	Ausblick.....	108
8.	Literaturverzeichnis.....	110
9.	Anhang.....	123
9.1.	Witterungsdaten Versuchsstandort Merklingsen (Versuchsgut der Uni-GH Paderborn).....	125

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Species der Gattung <i>Neotyphodium</i>	3
Tab. 2: Morphologische Merkmale zur Identifizierung und Unterscheidung von <i>Neotyphodium lolii</i> , <i>N. uncinatum</i> und <i>N. coenophialum in vitro</i>	4
Tab. 3: Einteilung der symbiontischen Beziehungen zwischen zwei Organismen	11
Tab. 4: Mykotoxine, die bei der Symbiose zwischen <i>Neotyphodium</i> spp. und den Wirtsgräsern gebildet werden	17
Tab. 5: Überblick über die wichtigsten Nachweismethoden der <i>Neotyphodium</i> spp. in Karyopsen und Blattscheiden	32
Tab. 6: Zusammensetzung der Lösung zur unspezifischen Vitalfärbung von <i>Neotyphodium</i> spp. mit Fluoresceindiacetat (FDA) in Blattscheiden von Gräsern.....	38
Tab. 7: Zusammensetzung und Verwendungszweck der Nährmedien zur <i>in vitro</i> -Kultur der <i>Neotyphodium</i> spp.....	38
Tab. 8: Kulturbedingungen der <i>L. perenne</i> -Versuchspflanzen.....	45
Tab. 9: Kulturbedingungen der <i>L. perenne</i> -Versuchspflanzen.....	46
Tab. 10: Variabilität der <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung in % von 16 holländischen <i>Lolium perenne</i> -Sorten.....	52
Tab. 11: <i>Neotyphodium lolii</i> -Besiedlung in % in den Karyopsen rumänischer Ökotypen (Erntejahr 1994) und in Keimpflanzen, die aus diesen Karyopsen (nach vorheriger zweijähriger Lagerung) herangezogen wurden.....	55
Tab. 12: Isolationsdaten der als <i>Neotyphodium lolii</i> identifizierten Isolate der rumänischen Ökotypen.....	56
Tab. 13: Feldaufgang in Ø Pflanzenzahl/m ² der <i>Lolium perenne</i> -Sorte Yatsyn am Standort Merklingsen, fünf Wochen nach der Aussaat (15.10.1996)	57
Tab. 14: Trockenmasse-Erträge in dt/ha von drei Aufwüchsen und Gesamt-trockenmasse-Ertrag der <i>Lolium perenne</i> -Sorte Yatsyn am Versuchsstandort Merklingsen in 1997	58
Tab. 15: Trockenmasse-Erträge in dt/ha von drei Aufwüchsen und Gesamt-trockenmasse-Ertrag der Sorte Yatsyn am Versuchsstandort Merklingsen in 1998	59
Tab. 16: Trockenmasse-Erträge in dt/ha von fünf Aufwüchsen und Gesamt-trockenmasse-Erträge der <i>Lolium perenne</i> -Sorten Embassy, Nui und Yatsyn am Versuchsstandort Merklingsen in 1998.....	60
Tab. 17: Trockenmasse-Erträge in dt/ha von fünf Aufwüchsen und Gesamt-trockenmasse-Erträge der Sorten Embassy, Nui und Yatsyn am Versuchsstandort Merklingsen in 1998.....	61
Tab. 18: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in Frischmasseproben von verschiedenen <i>Lolium perenne</i> -Ökotypen (aus Rumänien) und <i>Lolium perenne</i> -Sorten	63
Tab. 19: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM von <i>Lolium perenne</i> (Sorte Ellett), <i>neotyphodium</i> -besiedelte Variante, am Standort Merklingsen der Nutzungsjahre 1995/1996	64

Tab. 20: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM von <i>Lolium perenne</i> (Sorte Ellett), <i>neotyphodium</i> -besiedelte Variante, am Standort Asendorf der Nutzungsjahre 1995/1996	64
Tab. 21: Vergleich der Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM bei zwei verschiedenen Trocknungsarten in mit <i>Neotyphodium lolii</i> -besiedelten Ganzpflanzen von <i>Lolium perenne</i> (Sorte Ellett)	65
Tab. 22: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM von <i>neotyphodium</i> -besiedelten <i>Lolium perenne</i> (Sorte Yatsyn) in 1997 und 1998 bei Trockenmasse-Ertragsprüfungen	66
Tab. 23: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM von <i>neotyphodium</i> -besiedelten <i>Lolium perenne</i> (Sorte Yatsyn) bei zwei unterschiedlichen Düngungsstufen in 1997...67	67
Tab. 24: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM von <i>neotyphodium</i> -besiedelten <i>Lolium perenne</i> (Sorte Yatsyn) bei zwei unterschiedlichen Düngungsstufen in 1998...69	69
Tab. 25: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in verschiedenen <i>neotyphodium</i> -besiedelten <i>Lolium perenne</i> -Sorten am Standort Merklingsen bei unterschiedlichen Düngungsstufen in 1998	71
Tab. 26: Lolitrem B- und Paxillin-Gehalte von 34 <i>Neotyphodium lolii</i> - und zwei weiteren Pilz-Isolaten nach achtwöchiger <i>in vitro</i> -Kultur auf GPYE-Agar	74
Tab. 27: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM verschiedener <i>Lolium perenne</i> -Sorten und -Ökotypen bei drei verschiedenen Kulturvarianten in 1997	77
Tab. 28: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM von verschiedenen Sektionen von <i>Lolium perenne</i> in Abhängigkeit von der Temperatur und von der Sorte nach vierwöchiger Kultur in der Klimakammer (25 Pflanzen pro Sorte, n = 4) in 1997	79
Tab. 29: <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung in % von 18 verschiedenen <i>Lolium perenne</i> -Sorten, ermittelt mit Hilfe der Anilinblau-Färbung (Untersuchungsumfang: 100 Karyopsen pro Sorte)	82
Tab. 30: Probekalibrierung mit 18 verschiedenen <i>Lolium perenne</i> -Sorten sowie Berechnung für vier „unbekannte“ Proben	84
Tab. 31: Vorkommen von <i>Neotyphodium lolii</i> im Saatgut europäischer <i>Lolium perenne</i> -Sorten	87
Tab. 32: Vorkommen von <i>Neotyphodium lolii</i> in Wildpopulationen von <i>Lolium</i> spp. in Europa	88
Tab. 33: Lolitrem B-Gehalte von <i>Neotyphodium lolii</i> <i>in vitro</i> -Kulturen in ng/Agarplatte und in ihrem Wirtsgras <i>Lolium perenne</i> in µg/kg TM	102
Tab. 34: <i>Neotyphodium lolii</i> -Besiedlung in % und Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in Karyopsen verschiedener <i>Lolium perenne</i> -Sorten und rumänischen <i>Lolium perenne</i> -Ökotypen in 1997	123

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Schematische Darstellung der endophytischen Pilze <i>Neotyphodium lolii</i> , <i>N. uncinatum</i> und <i>N. coenophialum</i> , kultiviert auf festem Nährmedium [verändert nach MORGAN-JONES & GAMS, 1982, LATCH et al., 1984 und GAMS et al., 1990]	5
Abb. 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus der endophytischen Pilze <i>Neotyphodium lolii</i> , <i>N. uncinatum</i> und <i>N. coenophialum</i> im Entwicklungszyklus der entsprechenden Graspflanze [verändert nach BACON (1989); DAPPRICH (1996)].....	6
Abb. 3: Charakteristische Merkmale von <i>Lolium perenne</i> [KLAPP & OPITZ VON BOBERFELD, 1990]	8
Abb. 4: Charakteristische Merkmale von <i>Festuca pratensis</i> [KLAPP & OPITZ VON BOBERFELD, 1990]	9
Abb. 5: Charakteristische Merkmale von <i>Festuca arundinacea</i> [KLAPP & OPITZ VON BOBERFELD, 1990]	10
Abb. 6: Mögliche Nutzen der <i>Neotyphodium</i> -Gras Interaktion [verändert nach GRAND-RAVEL, 1997].....	12
Abb. 7: Krankheitssymptome der Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ beim Schaf und Rind (Quelle: Dr. L. Fletcher, Neuseeland)	14
Abb. 8: Strukturformeln der Ergotalkaloide, die in <i>neotyphodium</i> -besiedelten Gräsern nachgewiesen wurden	18
Abb. 9: Strukturformeln der Clavinalkaloide, die in <i>neotyphodium</i> -besiedelten Gräsern nachgewiesen wurden	19
Abb. 10: Strukturformeln der Ergotalkaloide Ergonovin und Lysergsäure.....	19
Abb. 11: Biosynthese der Ergotalkaloide	20
Abb. 12: Möglicher Biosyntheseweg von Lolitrem B, ausgehend vom Paspalin [nach MANTLE & WEEDON, 1994; MUNDAY-FINCH et al., 1997]	22
Abb. 13: Strukturformeln von Lolitrem A, B, C und D	23
Abb. 14: Strukturformeln der Aminopyrrolizidinalkaloide.....	25
Abb. 15: Totalsynthese von Lolin [nach TUFARIELLO et al., 1986]	25
Abb. 16: Vorgeschlagerener Biosyntheseweg von Norlolin [nach BUSH et al., 1993]	26
Abb. 17: Strukturformel von Peramin.....	28
Abb. 18: Totalsynthese von Peramin [nach DUMAS, 1988].....	29
Abb. 19: Totalsynthese von Peramin [nach BRIMBLE & ROWAN, 1990]	30
Abb. 20: Vorgeschlagene Biosynthese des Peramins [nach ROWAN et al., 1986]	31
Abb. 21: Herkünfte der 53 Populationen der <i>Lolium perenne</i> -Ökotypen aus Rumänien.....	39
Abb. 22: Hyphen (rote Pfeile) von <i>Neotyphodium lolii</i> zwischen den Aleuronzellen (grüne Pfeile) einer Karyopse von <i>Lolium perenne</i> nach Färbung mit Anilinblau (mikroskopische Aufnahme bei 160-facher Vergrößerung).....	49

Abb. 23: <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung im Saatgut der 84 <i>Lolium perenne</i> -Futtergras-Sorten der Beschreibenden Sortenliste Gräser, Klee, Luzerne (1995).....	50
Abb. 24: Herkunft der untersuchten <i>Lolium perenne</i> -Sorten der Beschreibenden Sortenliste Gräser, Klee, Luzerne (1995).....	50
Abb. 25: <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung im Saatgut von 36 holländischen <i>Lolium perenne</i> -Sorten in 1997/1998.....	51
Abb. 26: <i>Neotyphodium</i> -Besiedlung im Saatgut von 53 rumänischen Ökotypen von <i>Lolium perenne</i> des Erntejahres 1994.....	53
Abb. 27: Anzahl <i>neotyphodium</i> -besiedelter Proben in Abhängigkeit der Sammelregion der <i>Lolium perenne</i> -Ökotypen aus Rumänien.....	53
Abb. 28: Bild links: Fluoreszierendes Mycel von <i>Neotyphodium lolii</i> zwischen den adaxialen Epidermiszellen aus den basalen Bereich einer <i>Lolium perenne</i> -Blattscheide nach der FDA-Färbung; Bild rechts: unbesiedelter basaler Bereich einer <i>L. perenne</i> Pflanze nach der FDA-Färbung	54
Abb. 29: Ausgewachsenes Mycel (rote Pfeile) von <i>Neotyphodium lolii</i> aus ca. 0,5 cm großen Sprossstücken von <i>Lolium perenne</i> Pflanzen auf PDA ⁺ -Medium nach vier- bis sechswöchiger Kultur im Dunkeln bei ca. 21 °C.....	56
Abb. 30: Konidiosporen (rote Pfeile) und Phialiden (grüne Pfeile) von <i>Neotyphodium lolii</i> auf CMA-Medium (mikroskopische Aufnahme bei einer 400-fachen Vergrößerung) nach Kultivierung im Dunkeln bei 21 °C.....	57
Abb. 31: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in <i>neotyphodium</i> -besiedelten <i>Lolium perenne</i> (Sorte Yatsyn) im Freiland am Standort Merklingsen der Versuchsjahre 1997 und 1998	70
Abb. 32: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in der <i>neotyphodium</i> -besiedelten <i>Lolium perenne</i> -Sorte Embassy im Freiland am Standort Merklingsen im Versuchsjahr 1998	72
Abb. 33: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in der <i>neotyphodium</i> -besiedelten <i>Lolium perenne</i> -Sorte Nui im Freiland am Standort Merklingsen im Versuchsjahr 1998	73
Abb. 34: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in der <i>neotyphodium</i> -besiedelten <i>Lolium perenne</i> -Sorte Yatsyn im Freiland am Standort Merklingsen im Versuchsjahr 1998	73
Abb. 35: Vergleich der Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM einzelner Individuen sowie des Mittelwertes der <i>Lolium perenne</i> -Sorten Kerdion und Campania (nach 33 Tagen Kultivierung im Gewächshaus).....	75
Abb. 36: Vergleich der Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM einzelner Individuen sowie des Mittelwertes der <i>Lolium perenne</i> -Ökotypen Rö 198 und Rö 382 (nach 33 Tagen Kultivierung im Gewächshaus).....	76
Abb. 37: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM verschiedener <i>Lolium perenne</i> -Sorten und -Ökotypen bei drei verschiedenen Kulturvarianten in 1997.....	78
Abb. 38: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM von verschiedenen Sektionen von <i>Lolium perenne</i> in Abhängigkeit von der Temperatur und von der Sorte nach vierwöchiger Kultur in der Klimakammer (25 Pflanzen pro Sorte, n = 4) in 1997.....	80

Abb. 39: Korrelation zwischen dem Lolitrem B-Gehalt in $\mu\text{g/kg}$ TM und der <i>Neotyphodium</i> -Besiedlungsrate in % der 75 untersuchten Saatgutproben der <i>Lolium perenne</i> -Sorten und -Ökotypen aus Rumänien in 1997	81
Abb. 40: NIR-Spektren der 18 untersuchten <i>Lolium perenne</i> -Sorten	83
Abb. 41: NIR-Spektren der <i>neotyphodium</i> -besiedelten und der <i>neotyphodium</i> -freien <i>Lolium perenne</i> -Sorte Yatsyn	85
Abb. 42: Zweite Ableitungen der NIR-Spektren der <i>neotyphodium</i> -besiedelten und der <i>neotyphodium</i> -freien <i>Lolium perenne</i> -Sorte Yatsyn	86
Abb. 43: Veränderung des Mittelwertes des Lolitrem B-Gehaltes mit Zunahme der Stichprobenumfanges von <i>Lolium perenne</i> -Versuchspflanzen.....	96
Abb. 44: Relative Verteilung in % von Lolitrem B innerhalb von <i>Lolium perenne</i> -Pflanzen, Kultur in zwei verschiedenen Temperaturregimen	98
Abb. 45: Lolitrem B-Gehalte in ng/Agarplatte und Paxillin-Gehalte in μg /Agarplatte von verschiedenen <i>Neotyphodium lolii</i> - und weiteren Pilz-Isolaten nach achtwöchiger <i>in vitro</i> -Kultur auf GPYE-Agar	100
Abb. 46: Verlauf der maximalen/minimalen Durchschnittstemperaturen bei der Gewächshauskultur von <i>Lolium perenne</i> -Versuchspflanzen in 1997 (Temperaturen als Wochenmittel angegeben)	125
Abb. 47: Temperaturverlauf und Niederschlagssumme im Versuchsjahr 1995, gemessen am Versuchsstandort Merklingsen (Versuchsgut der Uni-GH Paderborn) .	125
Abb. 48: Temperaturverlauf und Niederschlagssumme im Versuchsjahr 1996, gemessen am Versuchsstandort Merklingsen (Versuchsgut der Uni-GH Paderborn) .	126
Abb. 49: Temperaturverlauf und Niederschlagssumme im Versuchsjahr 1997, gemessen am Versuchsstandort Merklingsen (Versuchsgut der Uni-GH Paderborn) .	126
Abb. 50: Temperaturverlauf und Niederschlagssumme im Versuchsjahr 1998, gemessen am Versuchsstandort Merklingsen (Versuchsgut der Uni-GH Paderborn) .	127
Abb. 51: Witterungsdaten (Temperaturverlauf und Niederschlagssumme), langjähriges Mittel (Monatsmittel der Jahre 1952-1982) am Standort Bad Sassendorf	127

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cm	Centimeter (10^{-2} m)
CMA	cornmeal agar (Kornmehl Agar)
d	Durchmesser
D	Deutschland
d. h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DM	dry matter (Trockenmasse)
DMF	Dimethylformamid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DSV	Deutsche Saatveredelung
dt	Decitonne (10^2 kg)
EC	Entwicklungsstadium
e.g.	for example
ELISA	Enzym Linked Immunosorbant Assay
eq.	Äquivalent
et al.	et alii, und andere
FDA	Fluoresceindiacetat
g	Gramm
GD	Grenzdifferenz
GPYE Agar	glucose peptone yeast Agar (Glukose Pepton Hefe Agar)
h	Stunde
ha	Hektar
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
i.e.	id est (that is)
IR	Infrarot
kg	Kilogramm (10^3 g)
m	Meter
m ²	Quadratmeter
Me	Methyl
mg	Milligramm (10^{-3} g)
min	Minute
Mio.	Millionen
MIR	Mittleres Infrarot
MKK	Mutiple Korrelationskoeffizient
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mm	Millimeter (10^{-3} m)
MS	Massenspektroskopie
N	Normal
N ⁺	<i>Neotyphodium</i> -positiv
N-	<i>Neotyphodium</i> -negativ
n. b.	nicht bestimmbar
ng	Nannogramm (10^{-9} g)

NIR	Nahes Infrarot
NL	Niederlande
NN	Normal Null
n. n.	nicht nachweisbar
NZ	Neuseeland
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	potato dextrose agar (Kartoffel Dextrose Agar)
PDA ⁺	potato dextrose agar (Kartoffel Dextrose Agar) mit Antibiotikum-Zusatz
PDBA	potato dextrose broth (Kartoffel Dextrose Flüssigmedium) mit Zusatz von 1 % Agar
PLSR	Partial Least Squares Regression
Rö	Rumänischer Ökotyp
RT	Raumtemperatur
SEC	Standard error of calibration, Standardfehler der Kalibration
SEP	Standard error of prediction, Standardfehler der Analyse
sL	sandiger Lehm
spp.	species
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
TM	Trockenmasse
TPIB	Tissue Print Immuno Blot
U	Umdrehungen
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
w/v	weight to volume
v/v	volume to volume
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)
%	Prozent
°C	Grad Celsius
<	kleiner als
⊕	durchschnittlich

1. Einleitung

1.1. Anfänge der *Neotyphodium* spp. Endophytenforschung

Der aus dem Griechischen stammende Begriff „Endophyt“ (endo= innen, im Innern; phyt= Pflanze) bedeutet „in der Pflanze befindlich“. Definitionsgemäß sind Endophyten pflanzenbesiedelnde Organismen, die zumindest zeitweise in ihrem Entwicklungszyklus, internes Pflanzengewebe kolonisieren können, ohne den Wirt dabei sichtbar zu schädigen (CARROLL, 1990).

Probleme, die durch endophyt-besiedelte Gräser verursacht werden, sind wahrscheinlich die ältesten bekannten Beispiele für qualitätsmindernde Faktoren beim Futter in der menschlichen Geschichte. So konnte in 4000 Jahren alten archäologischen Material des alten Ägypten im Samen vom Taumelloch (*Lolium temulentum*) ein Endophyt nachgewiesen werden (TACKHOLM & TACKHOLM, 1941).

In diesem Jahrhundert traten in Neuseeland in 1948 (CUNNINGHAM, 1948) und in den USA in 1950 (PRATT & HAYNES, 1950) verstärkt Weidetierkrankungen auf. In den USA konnte diese als „fescue foot“ bezeichnete Erkrankung auf die widerstandsfähige und ertragreiche *Festuca arundinacea* Sorte „Kentucky-31“ zurückgeführt werden. Nach BACON (1995) wurde die Sorte Kentucky 31 bereits 1942 als Ökotyp G 131 freigegeben, bevor sie dann 1972 (FERGUS & BUCKNER, 1972) als Sorte registriert wurde. Mit Hilfe dieser Sorte war es möglich auch in den südöstlichen Gebieten der Vereinigten Staaten ein mehrjähriges Futtergras anzubauen. Obwohl in den darauf folgenden Jahren (GOODMAN, 1952, MERRIMAN, 1955, MAAG & TOBISKA, 1956) immer wieder vom Auftreten der Weidetierkrankung „fescue foot“ berichtet wurde, konnte die Ursache für diese Erkrankung noch nicht festgestellt werden. In den ersten Jahren der Endophytenforschung beschäftigten sich die durchgeführten Studien mit der Toxizität, der Genetik und der Züchtung dieser Gräser. Es wurden schon kurz nach Entdeckung der Giftigkeit verschiedene Alkaloide aus den Rohrschwengel-Gräsern isoliert (TRETHERWIE et al., 1954; MAAG & TOBISKA, 1956). Die Züchtungs- und Genetik-Studien beschäftigten sich mit der Vererbung von spezifischen Merkmalen (Toxinmuster in den Gräsern, CORNELIUS et al., 1974; HEMKEN et al., 1979) sowie mit der Steigerung der Futterqualität dieser Gräser (BUCKNER et al., 1967; SLEPER et al., 1977). Alle diese durchgeführten Arbeiten sind historisch wichtig, da sie die Grundlagen für die heutige Endophytenforschung darstellen. Jedoch war bei diesen Arbeiten von einem endophytischen Pilz keine Rede, obwohl NEIL (1941) schon im Jahre 1941 in *F. arundinacea* einen Endophyten identifiziert hatte. CUNNINGHAM (1958) zeigte im Jahr 1958, dass dieser Pilz nicht verantwortlich war für die Giftigkeit von *F. arundinacea*.

Erst viele Jahre später, Anfang der siebziger Jahre, begannen die amerikanischen Forscher damit verschiedene Saprophyten und endophytische Pilze aus den giftigen Gräsern zu isolieren. Toxikologische Studien zeigten, dass diese mit *Claviceps* verwandten, jedoch endophytischen Pilze toxisch sind und sowohl *in vivo* (in der Pflanze) und *in vitro* (in Kultur) Ergotalkaloide bildeten (BACON et al., 1975, 1979, 1981; PORTER et al., 1979). Schließlich wurde im Jahre 1977 von BACON et al. (1977) erstmals der Zusammenhang zwischen den Endophyten und den Vergiftungserscheinungen bei den Weidetieren festgestellt. In den nächsten Jahren wurde durch weitere Studien (HEMKEN et al., 1981; HURLEY et al., 1981; SCHMIDT et al., 1982; STILHAM et al., 1982; MONROE et al., 1988; MCCANN et al., 1992) dieser Zusammenhang manifestiert.

Der erste Bericht über den endophytischen Pilz in *F. arundinacea* stammte von SAMPSON (1933). Er identifizierte diesen symptomlosen und nicht sporulierenden Pilz als *Epichloa typhina*. MORGAN-JONES & GAMS (1982) änderten diese Bezeichnung. Sie platzierten diesen Pilz in eine spezielle Untergruppe der Gattung *Acremonium*, *Albo lanosa* und nannten ihn *Acremonium coenophialum*. Durch die Untersuchung der ribosomalen DNA verschiedener Species der Gattung

Acremonium stellten GLENN et al. (1996) bei den endophytischen Pilzen der Sektion *Albo lanosa* eine enge Verwandtschaft fest. Gegenüber den anderen anamorphen Spezies der Gattung *Acremonium* fanden sich jedoch nur wenig Gemeinsamkeiten. Deshalb wurde von ihnen der Pilz in *Neotyphodium coenophialum* umbenannt.

Die Erforschung der Symbiose zwischen *N. lolii* und dem Wirtsgras *L. perenne* hat einen ähnlichen Verlauf. Im Jahre 1959 beschrieben CUNNINGHAM & HARTLEY (1959) ausführlich die Weidetierkrankung „ryegrass staggers“. Obwohl bereits im Jahre 1941 NEIL (1941) von einem endophytischen Pilz in *L. perenne* und dessen Giftigkeit berichtete, wurde auch hier der Verursacher der Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ erst wesentlich später erkannt. Nach Fütterungsversuchen mit dem Pilz *N. lolii* an Mäusen und Spatzen war für CUNNINGHAM (1958) die Möglichkeit, dass der Pilz der Verursacher der Weidetierkrankung ist, eher gering. In den darauf folgenden Jahren wurden von anderen Forschergruppen die Ergotalkaloide (THORNTON, 1964) bzw. die pflanzlichen Alkaloide Perloin und Halostachin (AASEN et al., 1969) als mögliche Verursacher genannt. Erst im Jahre 1981 wurde von FLETCHER & HARVEY (1981) ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der *Neotyphodium*-Besiedlung in *L. perenne*-Sorten und dem Auftreten der Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ festgestellt. Bereits im gleichen Jahr wurde dann mit Lolitrem B die Hauptwirksubstanz der Weidetierkrankung isoliert (GALLAGHER et al., 1981). MORTIMER & DI MENNA (1983) bestätigten mit eigenen Arbeiten die These, dass „ryegrass staggers“ durch den Pilz *N. lolii* verursacht wird.

Der erste Bericht über einen endophytischen Pilz in *L. perenne* stammte von FREEMAN (1902). Im Jahre 1984 wurde dieser Pilz von LATCH et al. (1984) als *Acremonium lolii* klassifiziert, bevor er im Jahr 1996 von GLENN et al. (1996) in *N. lolii* umbenannt wurde.

Ausgangspunkt der Forschungsarbeiten der beiden zuvor beschriebenen Symbiosen, *N. coenophialum* und *F. arundinacea* sowie *N. lolii* und *L. perenne* war jeweils die Beobachtung einer Weidetierkrankung bei Beweidung des entsprechenden Wirtsgrases. Im Gegensatz hierzu begann die Erforschung der Symbiose zwischen *N. uncinatum* und dem Wirtsgras *F. pratensis* mit der Entdeckung des Pilzes im Wirtsgras durch GAMS et al. (1990). Auch dieser Pilz wurde im Jahre 1996 von GLENN et al. (1996) in *N. uncinatum* umbenannt.

1.2. Taxonomie und Biologie der *Neotyphodium*-Pilze

Da endophytische Pilze keine Fruchtkörper bilden, war die systematische Klassifizierung lange Zeit unklar. Laut WHITE (1993) haben SAMPSON (1933) und NEIL (1941) bereits in den dreißiger und vierziger Jahren dieses Jahrhunderts eine Verbindung zwischen dem Erreger des Erstickungsschimmels, *Epichloa typhina* (Fr.) Tul., und den symptomlosen Grasendophyten hergestellt. Da der Pilz *E. typhina* zeitweise endophytisch lebt und es auch Übereinstimmungen in der Konidienbildung des asexuellen Stadiums von *E. typhina* und den symptomlosen Grasendophyten *in vitro* gibt, wurde der Endophyt von *F. arundinacea* (Rohrschwengel) von BACON et al. (1977) zunächst als *E. typhina* bezeichnet. Durch die morphologischen Untersuchungen von MORGAN-JONES & GAMS (1982) erfolgte die Einordnung der Anamorphe, d. h. des asexuellen Stadiums von *E. typhina* in die Gattung *Acremonium*. Somit wurden die drei endophytischen Pilze *Neotyphodium coenophialum*, *N. lolii* und *N. uncinatum* bis zum Jahr 1996 allgemein als *Acremonium*-Pilze bezeichnet. Taxonomisch waren diese Pilze im Stamm *Balansieae* in die Familie *Clavicipitaceae* eingeordnet, welche der Klasse der *Ascomyceten* angehört (SIEGEL et al., 1987). Neben den asexuellen Pilzen der Gattung *Acremonium* gehörten zum Stamm *Balansieae* die Gattungen *Atkinsonella*, *Balansia*, *Balansiopsis*, *Epichloa* und *Myriogenospora*, deren Species sich sexuell vermehren. Neben den oben genannten Pilzen *A. coenophialum*, *A. lolii* und *A. uncinatum* gehörten in die Sektion *Albo lanosa* noch *A. typhinum*, *A. chisosum*, *A. starrii*, *A. huerfanum* und *A. chilense*.

Gemeinsames Kennzeichen aller Arten der Gattung *Acremonium* ist eine phialidische Konidiogenese. Am Ende der Phialide, eine flaschenförmige konidiogene Zelle, werden wiederholt einzellige Konidien hervorgebracht (WEBER, 1993).

Im Gegensatz zu den restlichen Vertretern der Gattung *Acremonium*, über 100 meist saprophytische Arten, bringen die Grasendophyten nur ein oder zwei farblose Konidien *in vitro* hervor. Die Konidien sind hyalin und glattwandig, wobei sie ellipsoid bis zylindrisch, gerade oder gekrümmt geformt sind. Zusammen mit dem Konidienträger wird eine typische „T“-Konfiguration ausgebildet. Die Grasendophyten bilden aus Lufthyphen zusammengesetzte, langsam wachsende, weiße bis gelbe, watteartige Kolonien. Weiteres Charakteristikum, welches *in vitro* beobachtet wurde, ist die unseptierte Basis der konidiogenen Zellen (MORGAN-JONES & GAMS, 1982; LEUCHTMANN, 1992).

Nach Vorschlag von GLENN et al. (1996) wurden die Pilze der Gattung *Acremonium* Sektion *Albo lanosa* im Jahr 1996 in *Neotyphodium* umbenannt. Grund für diese Umbenennung waren die umfangreichen Untersuchungen der ribosomalen DNA verschiedener Species der Gattung *Acremonium*. Hierbei stellten GLENN et al. (1996) bei den endophytischen Pilzen der Sektion *Albo lanosa* eine enge Verwandtschaft fest. Gegenüber den anderen anamorphen Species der Gattung *Acremonium* fanden sich nur wenig Gemeinsamkeiten. Somit wurde durch diese molekularbiologischen Arbeiten eine deutlichere Abgrenzung zu den anderen Species der Gattung *Acremonium* erreicht. In Tab. 1 sind die Species der Sektion *Neotyphodium* (neos = neu; typhodium = Gattung anamorpher Species der Gattung *Epichloa*) zusammengefasst.

Tab. 1: Species der Gattung *Neotyphodium*

Species	(Erstbeschreiber) umbenannt durch
<i>Neotyphodium coenophialum</i>	(MORGAN-JONES & GAMS, 1982), GLENN, BACON & HANLIN comb. nov. 1996
<i>N. uncinatum</i>	(GAMS, PETRINI & SCHMIDT, 1990), GLENN, BACON & HANLIN comb. nov. 1996
<i>N. lolii</i>	(LATCH, CHRISTENSEN & SAMUELS, 1984), GLENN, BACON & HANLIN comb. nov. 1996
<i>N. typhinum</i>	(MORGAN-JONES & GAMS, 1982), GLENN, BACON & HANLIN comb. nov. 1996
<i>N. chisosum</i>	(WHITE & MORGAN-JONES, 1987a), GLENN, BACON & HANLIN comb. nov. 1996
<i>N. starrii</i>	(WHITE & MORGAN-JONES, 1987b), GLENN, BACON & HANLIN comb. nov. 1996
<i>N. huerfanum</i>	(WHITE, COLE & MORGAN-JONES, 1987), GLENN, BACON & HANLIN comb. nov. 1996
<i>N. chilense</i>	(MORGAN-JONES, GAMS & PIONTELLI, 1990), GLENN, BACON & HANLIN comb. nov. 1996

Die bedeutendsten Pilze der Gattung *Neotyphodium* sind *N. lolii*, *N. uncinatum* und *N. coenophialum*. Aufgrund der geringen Sporulation dieser *Neotyphodium*-Arten ist es schwierig, die einzelnen Arten zu unterscheiden. Wichtigste Merkmale zur Artunterscheidung sind dabei die Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit, der Kolonieforn und -farbe sowie die Beurteilung der Sporenform, -größe und -position auf der Phialide. In Tab. 2 sind die wichtigsten morphologischen Merkmale zur Artunterscheidung von *N. lolii*, *N. uncinatum* und *N. coenophialum* zusammengestellt.

Tab. 2: Morphologische Merkmale zur Identifizierung und Unterscheidung von *Neotyphodium lolii*, *N. uncinatum* und *N. coenophialum* *in vitro*

<i>Neotyphodium</i>- Pilz	Konidien	Phialiden	Mycel	Quelle
<i>N. lolii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • einzeln und schräg an den Phialiden befestigt • ellipsen- / nierenförmig • besitzen eine Größe von 4,3-10 x 1,7-2,7 µm 	<ul style="list-style-type: none"> • Bildung nur auf speziellen Nährmedien • einzeln • flaschenförmig, nach oben hin schmaler • Länge ist 8 - 10 µm 	<ul style="list-style-type: none"> • linsenförmiges, langsames Wachstum • hell bis weißlich gefärbt 	LATCH et al., 1984
<i>N. uncinatum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • eine bis wenige an jeder Phialide • durch Mikrozyklus häufig weitere Konidien an einer älteren Konidie • hakenförmig gekrümmt • besitzen eine Größe von 5-13 x 1-2 µm 	<ul style="list-style-type: none"> • mengenmäßig starke Bildung • ein- oder zweifach angeordnet • an der Basis spärlich septiert, aufrecht oder etwas gekrümmt • Länge ist 9-20 µm 	<ul style="list-style-type: none"> • langsames Wachstum • weiß bis bräunlich gefärbt 	GAMS et al., 1990
<i>N. coenophialum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ausbildung einer typischen „T“-Konfiguration an der Phialidenspitze • durchsichtig • mehr oder weniger gekrümmt mit gestutzter Basis • besitzen eine Größe von 8 x 2 µm 	<ul style="list-style-type: none"> • Bildung einzeln • flaschenförmig, nach oben hin schmaler • Länge ist 12-34 µm 	<ul style="list-style-type: none"> • langsames Wachstum • hell bis weißlich gefärbt • wattig 	MORGAN-JONES & GAMS, 1982

Die Abb. 1 zeigt schematische Darstellungen der endophytischen Pilze *N. lolii*, *N. uncinatum* und *N. coenophialum*.

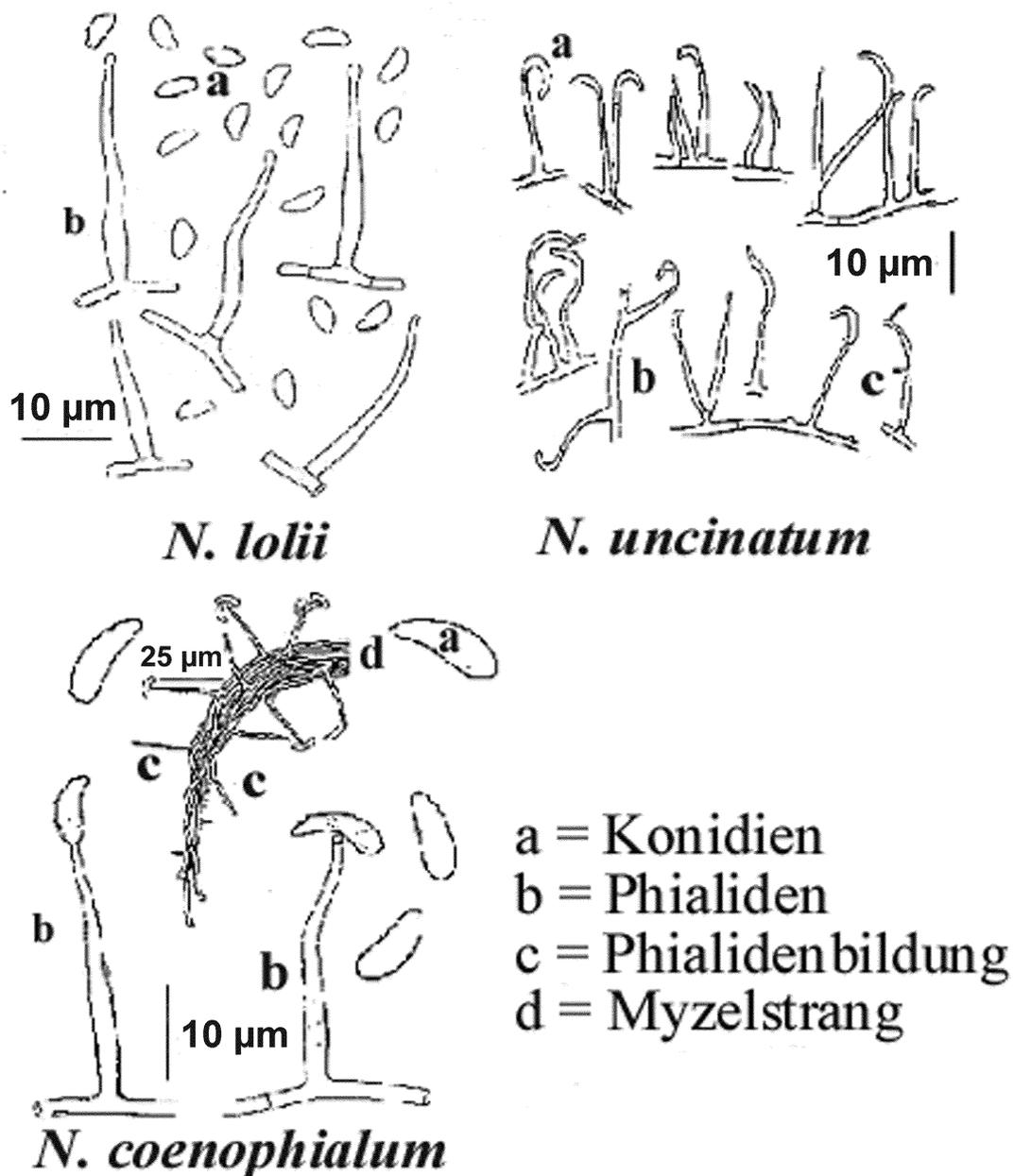


Abb. 1: Schematische Darstellung der endophytischen Pilze *Neotyphodium lolii*, *N. uncinatum* und *N. coenophialum*, kultiviert auf festem Nährmedium [verändert nach MORGAN-JONES & GAMS, 1982; LATCH et al., 1984 und GAMS et al., 1990]

Die Endophyten *N. lolii*, *N. uncinatum* und *N. coenophialum* sind rein endosymbiontische Arten. Die Wirtsgräser werden durch das Vorhandensein des Pilzes nicht geschädigt. Für die Vertreter der rein endosymbiontischen Arten haben BACON & SIEGEL (1988) den Begriff der „mutualistischen Symbiose“ geprägt. Der Endophyt und der Wirt profitieren beide von der Symbiose. Der Endophyt erhält einen Lebensraum und Nährstoffe vom Wirt. Auf der anderen Seite verleiht der Pilz der Pflanze, z. B. durch Abgabe von bestimmten Sekundärmetaboliten Eigenschaften, wodurch die Pflanze gegenüber äußeren biotischen und abiotischen Stressfaktoren konkurrenzfähiger wird (SIEGEL, 1993).

Der Endophyt durchläuft mit dem Wirt in gegenseitigem Nutzen den gesamten Entwicklungszyklus. Eine schematische Darstellung des Lebenszyklus der *Neotyphodium*-Pilze zeigt Abb. 2. Die *Neotyphodium*-Pilze leben interzellulär in den entsprechenden Wirtspflanzen. Sie befinden sich vor allem in den Blattscheiden und Bestockungstrieben. Selten sind sie in den Blattspreiten nachzuweisen. In den Wurzeln der Gräser konnten sie bisher nicht nachgewiesen werden (SIEGEL et al., 1985; WHITE & COLE, 1986). FARRAR & LEWIS (1987) behaupteten, dass diese Verteilung des Endophyten innerhalb der Pflanze auf die Menge an extrazellulärer Saccharose und anderen Zuckern zurückzuführen sei. Sie zeigten, dass dort, wo die Konzentration an extrazellulären Zuckern am größten ist, auch die Menge an *Neotyphodium*-Mycel am höchsten ist.

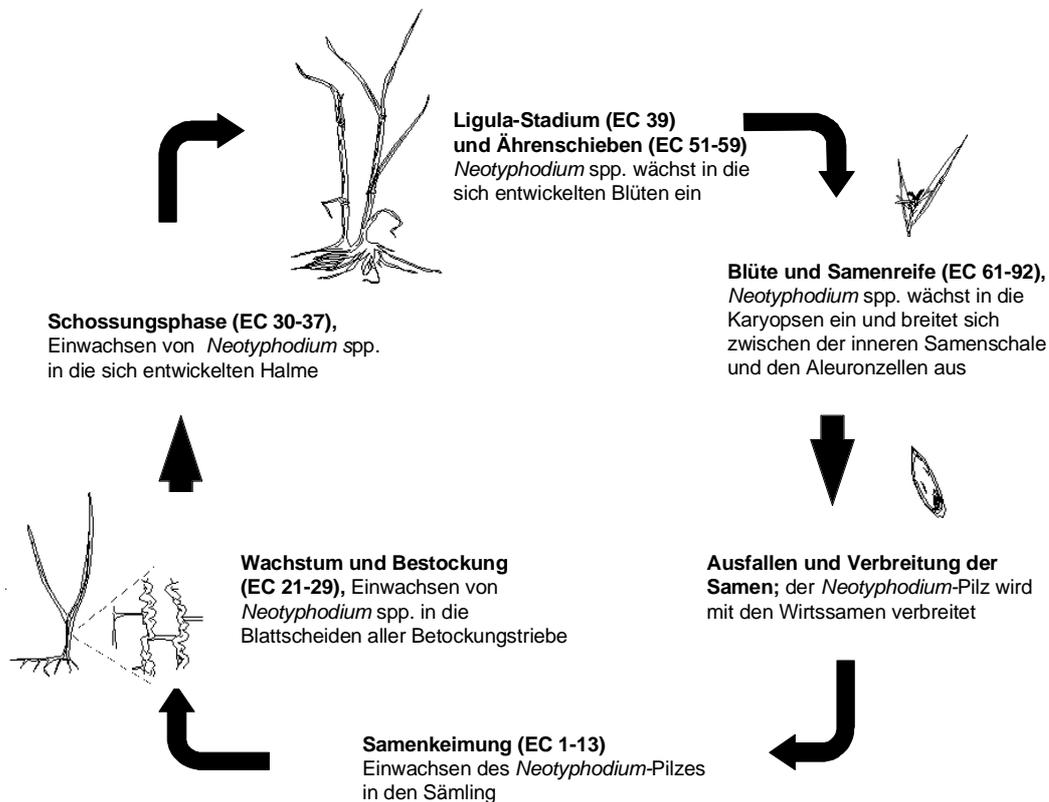


Abb. 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus der endophytischen Pilze *Neotyphodium lolii*, *N. uncinatum* und *N. coenophialum* im Entwicklungszyklus der entsprechenden Gras- und Samenpflanze [verändert nach BACON (1989); DAPPRICH (1996)]

Die Pilze der Gattung *Neotyphodium*, außer *N. typhinum*, sind nicht in der Lage Stromata zu bilden. Im Laufe der Evolution haben diese Pilze wahrscheinlich die Fähigkeit zur Stromata-Ausbildung auf Gräsern verloren oder besitzen eine bisher unbekannte Telemorphie (LEUCHTMANN & CLAY, 1990; WHITE, 1994). Sie vermehren sich innerhalb der Wirtspflanze durch Mycelwachstum. Die Verbreitung der symptomlosen *Neotyphodium*-Pilze erfolgt über die Karyopsen der Wirtgräser. In der Karyopse befindet sich das *Neotyphodium*-Mycel zwischen der Samenschale und den Zellen der Aleuronschicht (NEIL, 1941; BACON et al. 1977). Erst wenn sich in der Karyopse die Blatt- und Wurzelanlagen (Koleptile und Koleorhiza) ausbilden, wächst der Pilz in die Blattanlagen ein. Vorher bleibt der Embryo unberührt. Bei der Keimung wächst der

Neotyphodium-Pilz interzellulär in die sich entwickelnde Wirtspflanze (WHITE et al., 1993). Somit ist der *Neotyphodium*-Pilz auf seine Wirtspflanze angewiesen. In der Natur kann der Pilz ohne Wirtspflanze bzw. außerhalb des Wirtes nicht überleben. Während des Wachstums und der weiteren Bestockung des Wirtes wächst der Pilz in die Blattscheiden der Bestockungstriebe ein. In der Schossungsphase beginnt das Einwachsen des *Neotyphodium*-Pilzes in die sich bildenden Halme. In dieser Phase kann es nach WHITE et al. (1993) durch das gesteigerte Längenwachstum der Bestockungstriebe zu einer Nichtbesiedlung einiger Bestockungstriebe des Gräserhorstes kommen. Im Ligula-Stadium und dem Ährenschieben beginnt der *Neotyphodium*-Pilz mit der Besiedlung der sich entwickelnden Blüten. Bei der Blüte und Samenreife wächst der Pilz schließlich in die Karyopsen ein. Nach der Besiedlung der Samenanlage schließt sich der Lebenszyklus der asexuellen Endophyten.

1.3. Die Wirtgräser der *Neotyphodium*-Pilze

Ein wichtiges Merkmal der *Neotyphodium*-Pilze ist ihr relativ enges Wirtsspektrum. Jede Art endophytischer Pilze ist auf eine Grasart oder -gattung spezialisiert. Nach GOULD & SHAW (1983) kommen ca. 80 Gattungen als Wirtgräser für Endophyten der Familie *Clavicipitaceae* in Betracht. Jedoch ist wahrscheinlich aufgrund der fehlenden Symptomausprägung im Feld die Anzahl der *Neotyphodium* Wirtgräser wesentlich höher.

Von den hier behandelten *Neotyphodium*-Pilzen besiedelt *N. lolii* in der Natur ausschließlich *L. perenne*, *N. uncinatum* ausschließlich *F. pratensis*. *N. coenophialum* ist mit dem Wirtgras *F. arundinacea* assoziiert.

Inokulationen von *Neotyphodium*-Pilzen in nicht natürliche Wirtgräser, d. h. über die Grenzen der natürlichen Wirtsspezifität hinweg, waren wenig erfolgreich. LATCH & CHRISTENSEN (1985) konnten zwar *N. lolii* (aus *L. perenne*) in *F. arundinacea* transferieren, ein reziproker Transfer (*N. coenophialum* in *L. perenne*) war nicht erfolgreich. Diese und andere Untersuchungen (LEUCHTMANN & CLAY, 1993; HUMES, 1993; DO VALLE RIBEIRO, 1993) zeigten, dass es bei einer Inokulation wesentlich auf die richtige Kombination zwischen Wirtspflanze und *Neotyphodium*-Pilz ankommt. Darüber hinaus zeigte sich, dass im Falle eines Infektionserfolges der Endophyt nur eine begrenzte Zeit in der neuen Wirtspflanze lebensfähig war (HUMES, 1993, RAVEL et al., 1994). Gerade die Etablierung des *Neotyphodium*-Pilzes in der neuen Wirtspflanze über einen Generationenwechsel hinweg bereitet große Schwierigkeiten.

1.3.1. *Lolium perenne* (Deutsches Weidelgras)

L. perenne gehört in Deutschland bzw. in Europa , besonders in Nord- und Mitteleuropa, zu der wichtigsten Grasart (KLEY, 1994, 1997; BUNDESSORTENAMT, 1997). *L. perenne* ist durch ein breites Nutzungsfeld gekennzeichnet. Es findet hauptsächlich Verwendung als Futtergras auf intensiv oder extensiv bewirtschafteten Grünlandflächen. Wegen seiner hohen Konkurrenzkraft ist ein weiteres Nutzungsfeld die Begrünung von Stilllegungsflächen. Durch gezielte Züchtungen findet *L. perenne* weiter Verwendung als Gebrauchs-, Strapazier-, Golf-, Parkplatz- und Landschaftsrasen. Nach KLEY (1997) beträgt der Anteil am jährlichen Gräseraatgutverbrauch in Europa von *L. perenne* 33 %. Dieses zeigt die große Bedeutung dieses Grases. Auch in Übersee, in den USA, Australien und besonders in Neuseeland findet *L. perenne* Verwendung. In Abb. 3 sind die morphologischen Merkmale von *L. perenne* dargestellt.

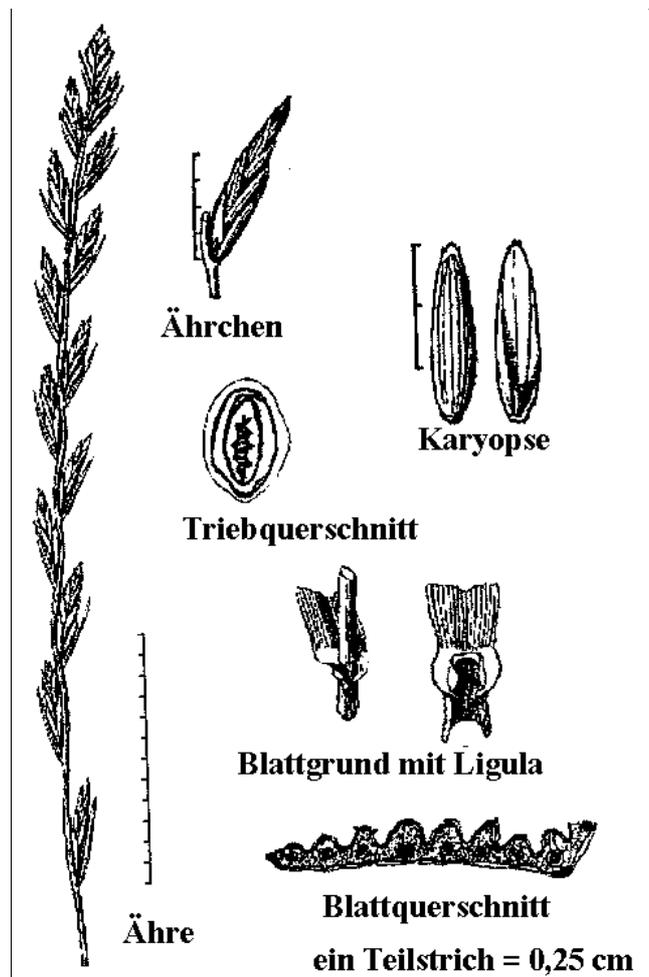


Abb. 3: Charakteristische Merkmale von *Lolium perenne* [KLAPP & OPITZ VON BOBERFELD, 1990]

L. perenne ist nach seiner Wuchsform ein niedrig bis aufrecht wachsendes Untergras. Es bildet dichte Horste. Weiter besitzt das Gras ein weit verzweigtes Wurzelsystem, welches an den basalen Knoten der Bestockungstriebe Nebenwurzeln ausbilden kann. Hierdurch kommt es zu einer Horstvergrößerung und ein Schließen entstandener Grasnarbenlücken. Die Bestockungstriebe erreichen eine Länge von 30 bis 90 cm. Jeder Bestockungstrieb enthält drei bis sieben lebende Blätter. Dabei sind die Blattspreiten 3 bis 20 cm lang und 2 bis 6 mm breit, also 20 bis 30 mal so lang wie breit. Weiter sind die Blattspreiten an der Oberseite gefurcht und an der Unterseite glänzend. Das Blatthäutchen ist häutig, 0,5 bis 2 mm lang und kann an der Spitze gezähnt sein. Nur bei jungen Blättern sind kurze Blattöhrchen erkennbar. Die Blattscheiden sind häufig zusammengedrückt, können aber auch eine zylindrische Form aufweisen. Am Grund sind die Blattscheiden rot bis purpur gefärbt.

L. perenne ist eine mehrjährige bis ausdauernde Gräserart und bedarf eines Vernalisationsreizes zur Halm- und Fruchtstandsformation. Der Vernalisationsreiz kann je nach Sorte sehr unterschiedlich sein (0 bis 90 Tage bei 0 bis 5 °C (GEIBLER, 1980)). Als Blütenstand bildet *L. perenne* eine 5 bis 30 cm lange locker besetzte zweizeilige Ähre, die aus zwei bis 35 Ährchen (zwei bis 10 blütig) besteht. Die Ährchen befinden sich sitzend und wechselständig an den Einhöhungen der Spindel. Alle Ährchen besitzen äußere Hüllspelzen, innere Hüllspelzen kommen nur an den oberen Ährchen vor. Dabei sind die Hüllspelzen etwa halb bis knapp so lang wie die Ährchen. An den Ährchen befinden sich grannenlose, drei bis fünf nervige Deckspelzen, die etwa 4 bis 9 mm lang sind. Die Karyopsen von *L. perenne* haben eine rundliche bis längliche Form mit

einer ventral verlaufenden Rille. Sie sind 5 bis 8 mm lang und in der Mitte 1 bis 1,5 mm breit. *L. perenne* wird aufgrund des erforderlichen Vernalisationsreizes im Sommer/Herbst ausgesät. Die Blüte beginnt im Mai oder Juni und kann den gesamten Sommer über andauern.

1.3.2. *Festuca pratensis* (Wiesenschwingel)

F. pratensis ist ein wertvolles Weide- und Heugras für reiche, feuchte Böden. In Europa ist es sehr häufig auf den britischen Inseln, besonders in England anzutreffen. Auch in Deutschland wird es bis ins hohe Bergland angebaut. In den USA wird es aufgrund seiner Empfindlichkeit gegenüber Dürre nur in Nordamerika angebaut.

In Abb. 4 sind die morphologischen Merkmale von *F. pratensis* dargestellt.

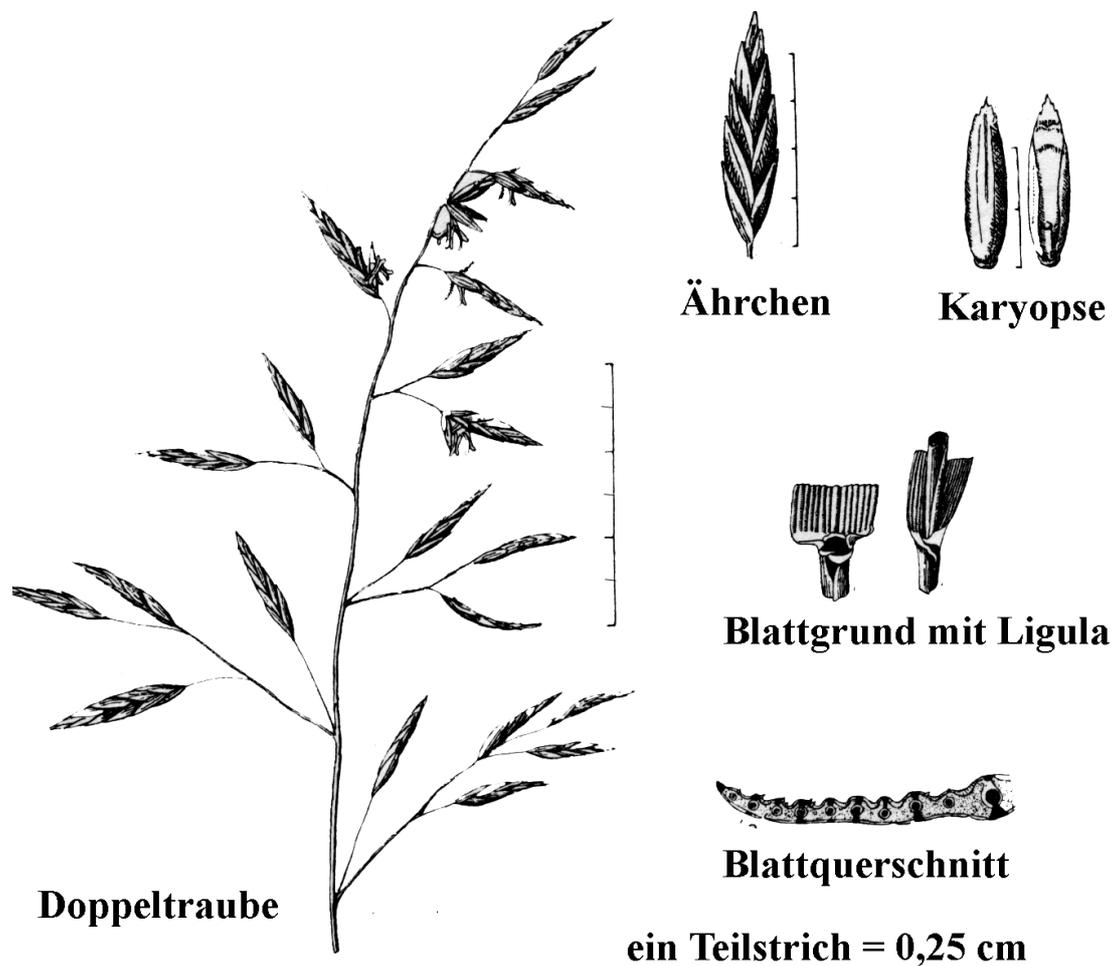


Abb. 4: Charakteristische Merkmale von *Festuca pratensis* [KLAPP & OPITZ VON BOBERFELD, 1990]

F. pratensis ist von seiner Wuchsform ein bodenblattreiches, halbaufrecht wachsendes Obergras. Es bildet lockere Horste, wobei es kaum geschlossene Rasendecken bilden kann. Die Bestockungstriebe erreichen eine Länge von 30 bis 120 cm. Die Blätter sind hellgrün und unbehaart. Die glatten Blattscheiden sind auf dem Rücken gerundet und besitzen an der Spitze schmale, abgespreizte, unbehaarte Öhrchen. Das Blatthäutchen ist etwa 1 mm lang. Die

Blattspreiten, die in eine feine Spitze auslaufen, werden bis zu 45 cm lang, sie sind flach und 3 bis 8 mm breit.

Als vernalisationsbedürftiges Gras bildet *F. pratensis* als Fruchtstand eine einfache bis doppelte Traube, die 10 bis 35 cm lang ist. Im unteren Teil der Traube befinden sich jeweils zwei Abästungen, wovon die kürzere ein bis zwei Ährchen aufweist. Die auf den ca. 5 mm langen Stielchen sitzenden Ährchen sind 10 bis 20 mm lang und fünf bis 14 blütig. Die Ährchen besitzen eine zylindrische, später lanzettliche oder schmal längliche Form. An den Ährchen befinden sich meist grannenlose, fünf nervige Deckspelzen, die etwa 6 bis 7 mm lang sind. Die Karyopsen von *F. pratensis* haben eine rundliche bis längliche Form; sie sind meist 6 bis 7 mm lang und ca. 1,4 mm breit.

Aufgrund der langsamen Entwicklung im Ansaatjahr erreicht *F. pratensis* die volle Leistungsfähigkeit erst im zweiten und dritten Anbaujahr. Die Aussaat ist sehr variabel und kann zwischen dem Frühjahr und dem Spätsommer erfolgen. Die Blütezeit von *F. pratensis* ist von Juni bis August.

1.3.3. *Festuca arundinacea* (Rohrschwengel)

In den Vereinigten Staaten stellt *F. arundinacea* eines der wichtigsten Futtergräser dar. So werden in den USA 12 bis 14 Millionen Hektar *F. arundinacea* angebaut. In Mitteleuropa hat *F. arundinacea* aufgrund seiner geringen Eignung für unsere Klimate kaum Bedeutung.

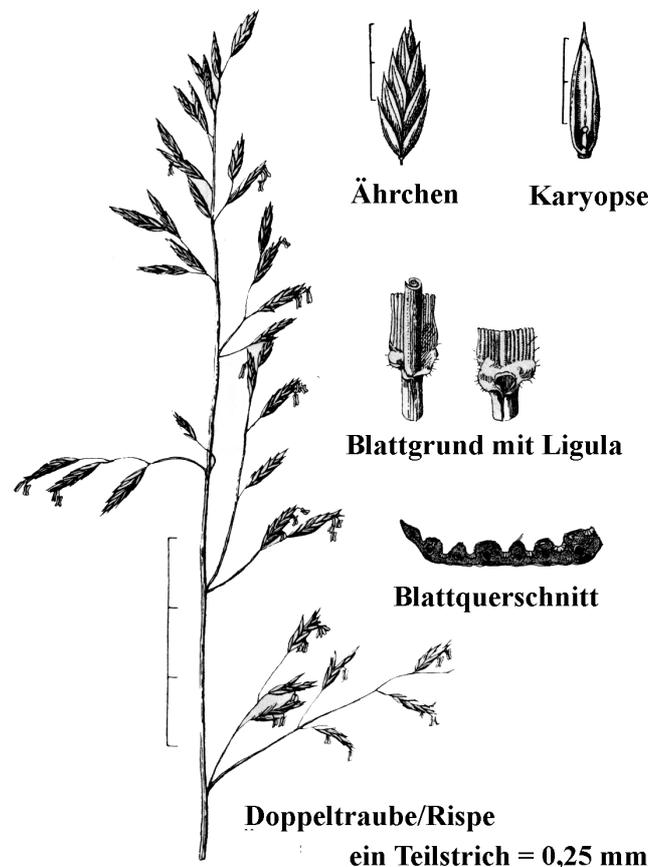


Abb. 5: Charakteristische Merkmale von *Festuca arundinacea* [KLAPP & OPITZ VON BOBERFELD, 1990]

F. arundinacea ist nach seiner Wuchsform ein ausdauerndes, formenreiches Obergras. Es bildet grobe Horste, welche auch unterirdisch Ausläufer bilden können. In Abb. 5 sind die morphologischen Merkmale von *F. arundinacea* dargestellt.

Die Bestockungstriebe erreichen eine Länge von 45 bis 200 cm. *F. arundinacea* ähnelt sehr stark *F. pratensis*. Im Gegensatz zu *F. pratensis* hat *F. arundinacea* sehr feine Härchen an den Öhrchen, die an der Verbindungsstelle zwischen Blattscheide und -spreite sitzen. Ferner hat *F. arundinacea* drei oder mehr Ährchen an dem kürzeren der beiden paarweise sitzenden Rispenästen. Die flachen Blattspreiten, die in eine feine Spitze auslaufen, werden 10 bis 60 cm lang und sind 3 bis 12 mm breit.

F. arundinacea bildet als Blütenstand eine etwas überhängende Doppltraube bis Rispe, die 10 bis 50 cm lang werden kann. Die auf dem ca. 8 mm langen Stielchen sitzenden Ährchen haben eine elliptische bis längliche Form und werden 10 bis 18 mm lang. Sie sind drei bis 10 blütig. An den Ährchen befinden sich drei nervige Deckspelzen, die 4,5 bis 7 mm lang sind. Die Karyopsen haben eine ähnliche Form und Größe wie die Karyopsen von *F. pratensis*. Die Blütezeit von *F. arundinacea* ist von Juni bis August.

1.4. Effekte der mutualistischen Symbiose zwischen den *Neotyphodium*-Pilzen und den Wirtsgräsern

Die Terminologie, die zur Beschreibung von gegenseitigen (mutualistischen) nützlichen Verbindungen zweier Organismen benutzt wird, ist in der Wissenschaft sehr unterschiedlich. Oftmals wird der Begriff „Symbiose“ als Gegensatz zur parasitären Lebensform verwendet. Alle Beziehungen, die nicht parasitisch sind, werden dann als Symbiose eingestuft.

Dagegen beschreibt eine zeitgemäße Interpretation der Symbiose verschiedene Beziehungen zwischen den Organismen. Die Symbiose besitzt hierbei eine Bandbreite zwischen parasitär und mutualistisch, nützlichen Symbiosen, bei denen die Übergänge fließend sind. Nach LEWIS (1985) lassen sich symbiontische Beziehungen zwischen zwei Organismen nach dem sogenannten Kontinuum-Modell in sechs Kategorien einteilen. Die Einteilung in die Kategorien basiert auf den Effekten, die durch die symbiontischen Beziehungen beider Partner ausgelöst werden. In der Tab. 3 ist die Einteilung der symbiontischen Beziehungen zwischen zwei Organismen zusammengefasst.

Tab. 3: Einteilung der symbiontischen Beziehungen zwischen zwei Organismen

wechselseitiger Effekt ^a	Einteilung
- / -	konkurrierende Symbiose
- / 0	abhängige Symbiose
- / +	quälende Symbiose
0 / 0	neutrale Symbiose
0 / +	begleitende Symbiose
+ / +	mutualistische (gegenseitige) Symbiose

^a -, +, 0 zeigt eine negative, positive und neutrale Beziehung an

Die möglichen Kombinationen von Effekten der Organismen zueinander variieren von gegenseitig nachteilig (konkurrierende Symbiose) bis hin zu gegenseitig nützlich (mutualistischen Symbiose). Zur Beurteilung der Symbiose werden Kosten-Nutzen-Analysen anhand verschiedener Merkmale wie Überlebensfähigkeit, Fortpflanzung, Nährstoffe etc. durchgeführt. Die polymorphe Struktur der einzelnen Partner in der Symbiose erschwert diese Analyse. Eine Symbiose ist dann als mutualistisch zu bezeichnen, wenn der Nutzen aus der Beziehung beider Partner größer ist, als die

Kosten, die hierfür aufgebracht werden müssen. Dabei sind nicht die einzelnen Individuen zu sehen, sondern es erfolgt eine Summierung über alle Individuen.

Die Interaktion zwischen den *Neotyphodium*-Pilzen und den entsprechenden Wirtsgräsern ist nach der oben beschriebenen Definition als eine mutualistische Symbiose einzustufen. Dies bedeutet, dass beide Partner, sowohl der Pilz als auch das Wirtsgras Vorteile aus der Symbiose ziehen. Die Population der *Neotyphodium*-Pilze erhält von der Wirtspflanze einen Lebensraum, Nährstoffe und die Möglichkeit zur Vermehrung und Entwicklung. Auf der anderen Seite wird die Population der Gräser durch die Anwesenheit des Pilzes konkurrenzfähiger gegenüber äußeren biotischen und abiotischen Streßfaktoren. In Abb. 6 ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt.

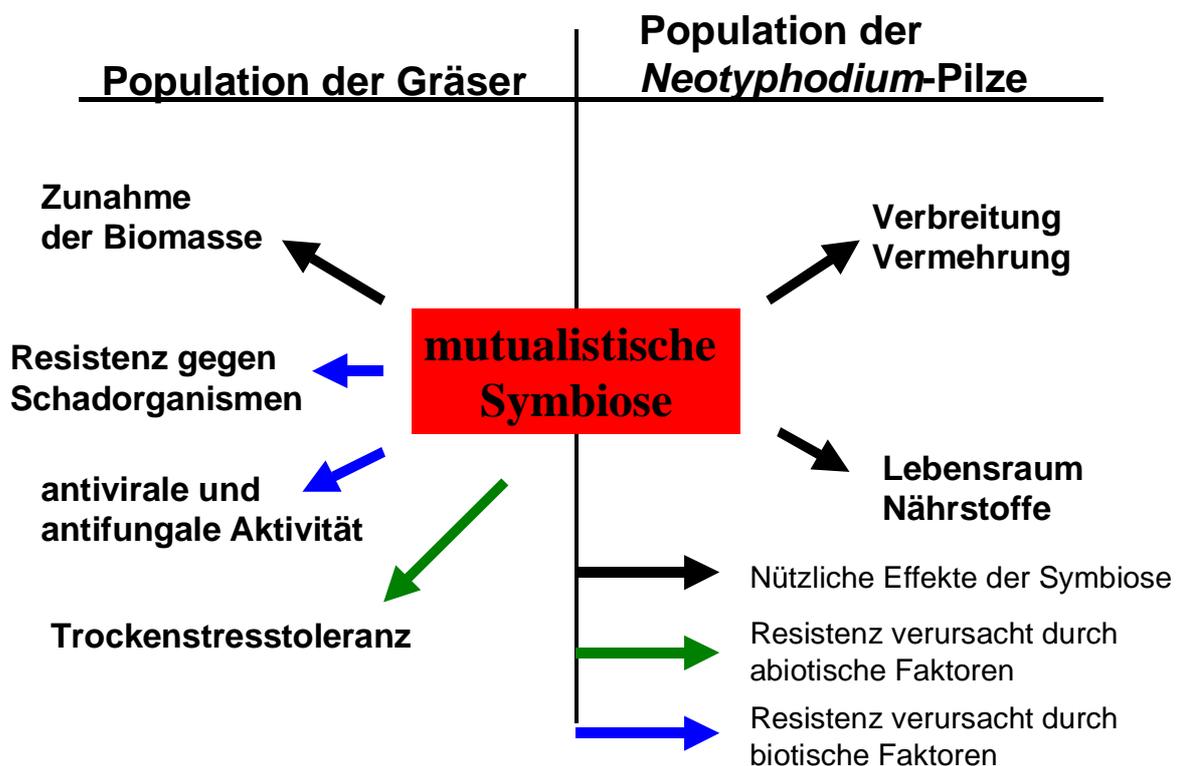


Abb. 6: Mögliche Nutzen der *Neotyphodium*-Gras Interaktion [verändert nach GRAND-RAVEL, 1997]

Wichtig bei dieser Betrachtungsweise ist, dass immer die ganze Population betrachtet wird. So zeigten auch Untersuchungen, dass bei einzelnen Individuen (Pflanzen) die Bestockung, Biomassenproduktion, spezifisches Blattgewicht und Dürre-Toleranz nicht immer durch den *Neotyphodium*-Pilz gesteigert wird (ARACHEVALETA et al., 1989; HILL et al., 1990; 1991 und WHITE et al., 1992). Die bessere Konkurrenzfähigkeit der *neotyphodium*-besiedelten Pflanzen ist also darauf zurückzuführen, dass einige Individuen der Population mit starken Stresssituationen (Dürrestress etc.) besser zurechtkommen und somit wahrscheinlicher überleben werden. Wären alle Individuen der Population gegenüber Stresssituationen resistent, so würde dies einen erheblich höheren Energieaufwand bedeuten. In Zeiten ohne große Stresssituation wären solche Populationen gegenüber nicht besiedelten Populationen weniger wettbewerbsfähig. Es kommt somit zu einer Abschätzung zwischen den Kosten und Nutzen der Symbiose. Diese

Betrachtungsweise wird auch durch die *Neotyphodium*-Besiedlungsraten von Populationen unterstützt. So ist nur in sehr seltenen Fällen eine Population zu 100 % mit dem *Neotyphodium*-Pilz besiedelt (LEWIS et. al., 1997).

1.4.1. Positive Effekte der mutualistischen Symbiose

Nachdem BACON et al. (1977) den Zusammenhang zwischen den *Neotyphodium*-Pilz und den Vergiftungserscheinungen bei den Weidetieren auf *F. arundinacea* Weiden erkannt hatte, war das vorangige Ziel der Endophyten-Forschung die Eliminierung des Pilzes in den *F. arundinacea* Futtergräsern. Jedoch zeigte sich hierbei, dass nur *neotyphodium*-besiedelte Sorten im warmen Südosten des US-Bundesstaates Georgia angebaut und genutzt werden konnten. Weiden der gleichen *neotyphodium*-freien Sorten überlebten nicht (BOUTON, 1989). Neben BOUTON (1989) fanden auch andere Forschergruppen weitere positive Effekte der mutualistischen Symbiose zwischen den *Neotyphodium*-Pilz und den entsprechenden Wirtsgräsern.

Bei der Interaktion zwischen dem Pilz *N. coenophialum* und dem natürlichen Wirtsgras *F. arundinacea* wurden folgende positive Effekte beobachtet:

ARACHEVALETA et al. (1989) fanden eine gesteigerte Bestockung und dadurch eine höhere Biomassenproduktion bei den *neotyphodium*-besiedelten Populationen/Sorten sowie eine bessere Trockenheitsverträglichkeit. In den Untersuchungen von HILL et al. (1990) konnte eine bessere Anpassungsfähigkeit der *neotyphodium*-besiedelten Populationen/Sorten an neue Umweltbedingungen nachgewiesen werden. Weiter wurden eine Vielzahl von Resistenzeffekten gegenüber Insekten und Mikroorganismen bei den *neotyphodium*-besiedelten *F. arundinacea* Populationen/Sorten festgestellt (SIEGEL et al. 1985, 1987; WEST et al., 1988; KIMMONS et al., 1989). Andere Untersuchungen zeigten, dass die *neotyphodium*-besiedelten Populationen/Sorten Krankheiten, die durch Mikroorganismen (Pilze, Bakterien und Viren) verursacht werden, besser verkraften als die nicht besiedelten Vergleichsvarianten (KOSHINO et al., 1987; FORD & KIRKPATRICK, 1989; JOOST & BATES, 1989; WEST et al., 1989; MAHMOOD et al., 1993).

Auch bei der mutualistischen Symbiose zwischen dem Pilz *N. lolii* und dem natürlichen Wirtsgras *L. perenne* wurden positive Effekte beobachtet:

LATCH et al. (1985) berichteten, dass *neotyphodium*-besiedelte *L. perenne*-Sorten/Populationen eine Steigerung des Wachstums zeigen. Wie bei den *neotyphodium*-besiedelten *F. arundinacea* Sorten/Populationen wurde auch bei den *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Sorten/Populationen ebenfalls eine Ertragssteigerung (SIEGEL et al., 1987, MIKA, 1990) und eine erhöhte Trockenheitsresistenz (WEST, 1994) nachgewiesen. Mehrere Forschergruppen berichteten von Wachstumshemmungen verschiedener Schädlinge durch die Anwesenheit des *N. lolii*-Pilzes (PRESTIDGE et al., 1982; FUNK et al., 1983; BARKER et al., 1984; AHMAD et al., 1986). CUNNINGHAM et al. (1993) fanden eine Reduktion von Viruskrankheiten in den *neotyphodium*-besiedelten Sorten/Populationen. EEREN et al. (1997a) konnten in ihren Untersuchungen eine Reproduktions- und Wachstumshemmung bei Nematoden nachweisen, die auf das Vorhandensein des *N. lolii*-Pilzes zurückzuführen war. KOSHINO et al. (1987) berichteten von Resistenzerscheinungen gegenüber Pilzkrankheiten.

Die Symbiose zwischen dem Pilz *N. uncinatum* und dem natürlichen Wirtsgras *F. pratensis* führt nach Berichten verschiedener Forschergruppen zu folgenden Vorteilen:

SCHMIDT (1994) fand in ihren Untersuchungen eine abschreckende Wirkung der *neotyphodium*-besiedelten Populationen/Sorten gegenüber Blatt- und Wurzelläusen sowie eine erhöhte Wurzel- und Biomasse. Auch SCHÖBERLEIN & PFANNMÖLLER (1996) bestätigten mit ihren Untersuchungen die insektenabschreckende Wirkung der endophythaligen Gräser. Weiter konnten sie in *in vitro*-Experimenten eine Antibiosiswirkung gegenüber eine *Rhizoctonia*-Art nachweisen. Diese fungizide Wirkung des *N. uncinatum* wurde auch von anderen Forschern

sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen (SCHMIDT, 1994; EIERDANZ, 1996). MALINOWSKI et al. (1997) berichteten von einer erhöhten Trockenstresstoleranz und Konkurrenzfähigkeit der besiedelten Gräser.

1.4.2. Negative Effekte der mutualistischen Symbiose

Neben den beschriebenen positiven Effekten der Symbiose zwischen *Neotyphodium*-Pilze und den entsprechenden Wirtsgräsern, kann es durch die Präsenz des Pilzes in den Gräsern zu negativen Auswirkungen kommen. Diese negativen Auswirkungen beziehen sich dabei auf die Umgebung und nicht auf die Pflanze. Durch die Bildung von verschiedenen spezifischen Alkaloiden kann es zu Erkrankungen bei den Weidetieren (Rinder, Schafe, Pferde etc.) kommen.

„ryegrass staggers“ (spezielle Form der Taumelkrankheit)

„ryegrass staggers“ ist eine Weidetierkrankung, die ausschließlich auf mit *N. lolii* besiedelten *L. perenne*-Weiden zu beobachten ist. Die neuromuskuläre Erkrankung tritt schwerpunktmäßig in Neuseeland, Australien und USA auf (ROWAN, 1993). Daneben gibt es vereinzelte Berichte aus Europa, in denen vom Auftreten der Erkrankung in Großbritannien, Frankreich, den Niederlanden und Deutschland berichtet wird (LEWIS & CLEMENTS, 1986; RAYNAL, 1991; FINK-GREMMELS & BLOM, 1993; DAPPRICH, 1996). Nach Schätzungen liegen die Schäden dieser Krankheit, die durch den Pilz *N. lolii* hervorgerufen wird, bei mehreren 100 Millionen Dollar jährlich (SIEGEL et al., 1987).



Abb. 7: Krankheitssymptome der Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ beim Schaf und Rind (Quelle: Dr. L. Fletcher, Neuseeland)

Von der Krankheit können alle Weidetiere betroffen sein, wobei Schafe, Pferde und Rehwild aufgrund ihrer Freßgewohnheiten anfälliger für die Krankheit sind als Rindvieh (PRESTIDGE, 1993).

Hauptauslöser dieser Krankheit ist das vom Pilz *N. lolii* in der Pflanze gebildete Sekundärmetabolit Lolitrem B (GALLAGHER et al., 1981; BALL et al., 1995). Daneben können aber auch andere, chemisch ähnlich gebaute Alkaloide, wie z. B. Paxillin die Ursache für die Erkrankung „ryegrass staggers“ sein (WEEDON & MANTLE, 1987; MILES et al., 1992; FLETCHER et al., 1993; PENN et al., 1993).

Im basalen Teil der Graspflanze, in den Blattscheiden, finden sich die höchsten Konzentrationen an Lolitrem B (GALLAGHER et al., 1987; VAN HEESWIJCK & McDONALD, 1992). Aus diesem Grunde ist „ryegrass staggers“ auch eine typische Erkrankung auf intensiv genutzten *L. perenne*

Weiden. Niedrig geschnittene und/oder intensiv beweidete Weiden sind wesentlich toxischer als hochgewachsene (CHEEKE, 1995).

Oberhalb eines Lolitrem B-Gehaltes von 2000 µg/kg TM kommt es zu sichtbaren Symptomen bei den Weidetieren (DI MENNA et al., 1992). Symptome dieser Krankheit sind eine steife Gangart, Muskelzittern und -krämpfe, Koordinationsprobleme, Desorientierung und Hypersensibilität gegenüber äußeren Reizen bei den Weidetieren (GALLAGHER et al., 1984; siehe Abb. 7). Weiter wurde bei den erkrankten Weidetieren eine geringere Futterraufnahme, geringere Fruchtbarkeit und ein niedrigerer Prolaktinspiegel festgestellt (FLETCHER, 1986; PRESTIDGE, 1993; EEREN et al., 1997b). Die Krankheit selber ist nicht tödlich, und das Weidetier regeneriert sich sehr schnell, wenn das vergiftete Futter abgesetzt wird. Die Mehrzahl der Todesfälle (Mortalitätsrate liegt bei durchschnittlich 10 %) ist auf Sekundäreffekte wie Erdrücken an Weideeingängen, Ertrinken in Flußbetten oder Verhungern zurückzuführen (HEWITT, 1983).

Zur Vermeidung der Erkrankung „ryegrass staggers“ werden in der Literatur verschiedene Lösungsansätze diskutiert. KEOGH (1973) sowie auch STUEDEMANN & THOMPSON (1993) schlagen ein besonderes Weidenmanagement vor. Die Weiden sollten häufig gewechselt werden, so dass aufgrund der nicht so tief abgegrasteten *L. perenne* Pflanzen das Krankheitsrisiko vermindert wird. Eine andere Bekämpfungsstrategie ist die Behandlung der erkrankten Tiere (THOMPSON & GARNER, 1994) oder die Zucht resistenter Tiere (MORRIS et al., 1995). ROLSTON (1993) befürwortet hingegen die Zucht von toxfreien, *neotyphodium*-besiedelten Grassorten. So würden auf der einen Seite die positiven Effekte der mutualistischen Symbiose zwischen den *Neotyphodium*-Pilz und dem Wirtsgras ausgenutzt, die negativen Effekte hingegen würden ausgeschaltet werden.

„Fescue Toxikose“

Im Jahre 1963 fassten JACOBSON et al. (1963) unter den Oberbegriff „fescue toxicosis“ zwei Tiererkrankungen zusammen, die beide durch den endophytischen Pilz *N. coenophialum* in *F. arundinacea* verursacht werden. Im einzelnen handelt es sich um die Erkrankung „fescue foot“, die bei niedrigen Umgebungstemperaturen, somit hauptsächlich im Winter auftritt, und um die „summer fescue toxicosis“ („summer syndrome“).

Anfang der fünfziger Jahre und in den darauf folgenden Jahren wurde erstmals vom Auftreten der Erkrankung „fescue foot“ in Neuseeland, Australien, USA und Italien berichtet (CUNNINGHAM, 1949; PULSFORD, 1950; GOODMAN, 1952; STEARNS, 1953; ROSSI, 1959). Nach einem plötzlichen Temperaturabfall und fünf- bis fünfzehntägiger Exposition des giftigen *F. arundinacea*-Grases auf die Weidetiere kommt es zu ersten sichtbaren Symptomen. Symptome der Erkrankung „fescue foot“ sind Hautentzündungen im Bereich der Klauen, Schwanzwurzel, Ohren und Maul. Weitere Symptome sind trockene Gangrene an den Gliedmaßen und Lahmheit. In schweren Fällen kann es zum Verlust der gesamten Klaue kommen. Nach CROSS et al. (1995) tritt die Erkrankung nur bei Rindern und Schafen auf.

Mit der Verbreitung der *F. arundinacea* Sorte „Kentucky 31“ in den ariden Zonen der USA wurde in den sechziger Jahren dieses Jahrhunderts bei den Weidetieren die sogenannte „summer fescue toxicosis“ beobachtet (MIKA, 1990). Zum Ausbruch dieser Erkrankung kommt es, wenn die Temperaturen über einen längeren Zeitraum oberhalb von 25 °C liegen.

Ein Merkmal der Weidetiererkrankung „summer fescue toxicosis“ ist eine verminderte Gewichtszunahme bei den Weidetieren (HOVELAND et al., 1984; GARNER et al., 1984; CRAWFORD et al., 1989). Weiter zeigen erkrankte Kühe eine reduzierte Milchproduktion und eine geringere Fruchtbarkeit (DANILSON et al., 1986; PETERS et al., 1992). Daneben zeigen sich Symptome wie extremer Speichelfluß, struppiges Fell und eine erhöhte Nervosität und Körpertemperatur bei den Weidetieren (HOVELAND et al., 1983).

Hauptverantwortlich für die Weidetierkrankung „fescue toxicosis“ sind die durch den Pilz *N. coenophialum* gebildeten Alkaloide; die Ergotalkaloide (besonders Ergovalin). Nach CORNELL et al. (1990) kommt es ab einem Ergovalin-Gehalt von 50 ng/g Trockenmasse im besiedelten Gras zum Auftreten der oben beschriebenen Symptome.

Nach HOVELAND (1993) verursacht die Erkrankung „fescue toxicosis“ der US-amerikanischen Fleischindustrie einen jährlichen Schaden von 609 Mio. US-Dollar.

Eine erprobte Vermeidungsstrategie bei dieser Erkrankung ist es, anstelle von reinen *neotyphodium*-besiedelten *F. arundinacea* Sorten eine Mischung aus Klee und den *neotyphodium*-besiedelten *F. arundinacea* Sorten auszusäen. Hierdurch wird der Allgemeinzustand von Stieren (MCMURPHY et al., 1990; CHESTNUT et al., 1991) und auch von Kuh-Kalb Paaren (STRICKER et al., 1979; HILL et al., 1979; ELLIS et al., 1983) nicht mehr durch die Giftigkeit der *neotyphodium*-besiedelten *F. arundinacea* Weiden beeinträchtigt. Die Anwesenheit von Klee verhindert den Gewichtsverlust bei milchgebenden Kühen, erhöht das Gewicht der abgestillten Kälber und verbessert die Trächtigkeitsrate (GAY et al., 1988; WALLER et al., 1989). Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung der „fescue toxicosis“ ist ein gezieltes Weidenmanagement. RHODES (1991) schlägt vor, im Juli (höchstes Risiko) die Weidetiere auf andere Weiden zu verlagern, um so das Risiko einer Erkrankung zu minimieren. Auch die Zugabe von Mineralien, Vitaminen und anderen Naturprodukten ins Futter der Weidetiere zur Minimierung der Auswirkungen der *neotyphodium*-besiedelten *F. arundinacea* Weiden wurde diskutiert (MUMPTON & FISHMAN, 1977; CHESTNUT et al., 1992; SAMFORD et al., 1993).

1.5. Wichtige Alkaloide der *Neotyphodium* spp.-Gras-Interaktion

Bei der Symbiose zwischen den *Neotyphodium*-Pilzen und den Wirtsgräsern kommt es zur Bildung von einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten. Sekundärmetabolite sind Stoffwechselprodukte, die nicht zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktion einer Zelle oder Organismus notwendig sind (HARTMANN, 1985). Die Aufgaben der Sekundärmetabolite liegen im ökophysiologischen Bereich. Sie spielen eine Rolle als chemische Abwehrstoffe der Pflanzen gegen Herbivore und Mikroorganismen. Im Gegensatz zu den Primärstoffwechselprodukten, die für das Wachstum und die Entwicklung der Individuen essentiell sind, spielen die Sekundärmetabolite eine Rolle bei der Wechselwirkung zwischen Individuum und Umwelt. Für ein isoliert betrachtetes Individuum sind die Sekundärmetabolite nicht notwendig, jedoch erhält das Individuum durch die Sekundärmetabolite bestimmte Eigenschaften/Fähigkeiten, wodurch die Existenz und der Fortbestand des Individuums in der Umwelt gesichert wird. Die Trennung zwischen Primär- und Sekundärmetabolit ist nicht immer möglich. Es gibt auch Stoffe, die beide Voraussetzungen erfüllen. Der Sekundärmetabolit ist voll in den Stoffwechsel integriert. Die Biosynthesewege sind denen der Primärmetaboliten sehr ähnlich. So stellen die Sekundärmetabolite keineswegs Abfallprodukte dar, sondern besitzen sehr vielfältige Aufgaben und können auch wieder abgebaut werden. Aufgrund der immer wieder wechselnden Herausforderungen an die Pflanze im Hinblick auf die Abwehr von Pathogenen oder auch Herbivoren besitzen die Sekundärstoffe eine riesige Strukturvielfalt. Organismen entwickeln sich im Laufe der Evolution immer weiter, so dass bestehende Abwehrstrategien der Pflanzen überwunden werden. Um Überleben zu können, muss somit die Pflanze auf die Angriffe von Pathogenen und Herbivoren flexibel reagieren können.

Im Vergleich zu den anderen Pflanzenarten haben Gräser ein eher gering ausgeprägtes Abwehrsystem. Die Gräser haben sich im Laufe der Coevolution mit grasenden Tieren an die vorübergehende Beweidung und dem damit verbundenen Verlust an Assimilationsfläche angepasst (CHEEKE, 1995).

Die Bildung der Naturstoffe in den *neotyphodium*-besiedelten Gräsern ist ebenfalls eine Form der Abwehr von „Feinden“. Diese „Feinde“ können pilzliche und bakterielle Mikroorganismen, Viren, Schaderreger (Insekten) und/oder auch Tiere (Pferde, Schafe, Rinder etc.) sein. Es wurden in den *neotyphodium*-besiedelten Gräsern Naturstoffe von vier verschiedenen Substanzgruppen nachgewiesen. In Tab. 4 sind diese Substanzgruppen mit ihren wichtigsten Vertretern dargestellt. Es war lange unklar, ob diese Naturstoffe vom Gras oder dem Pilz *Neotyphodium* spp. gebildet werden. Mittlerweile gilt es jedoch als erwiesen, dass alle Substanzen vom Pilz selber produziert werden. Die Naturstoffe (Ergovalin, Lolitrem B, Loline und Peramin) konnten in *in vitro*-Kulturen der entsprechenden *Neotyphodium*-Pilze nachgewiesen werden (PORTER et al., 1979; MILES et al., 1992; ROWAN, 1993; SCHARDL et al., 1997). Deshalb werden diese Naturstoffe auch als Mykotoxine bezeichnet.

Tab. 4: Mykotoxine, die bei der Symbiose zwischen *Neotyphodium* spp. und den Wirtsgräsern gebildet werden

Substanz- klasse	wichtigste Vertreter	<i>in vitro</i>			Referenz
		<i>N. coen.</i>	<i>N. lolii</i>	<i>N. unc.</i>	
Ergotalkaloide	Ergovalin	+	+	-	PORTER et al., 1979
Indolisoprenoide	Lolitrem B	+	+	+	MILES et al., 1992
Amino- pyrrolizidine	Loline	-	-	+	SCHARDL et al., 1997
Azaindolizidine	Peramin	+	+	-	ROWAN, 1993
Substanz- klasse	wichtigste Vertreter	<i>in vivo</i>			Referenz
		<i>N. coen./ F. arun.</i>	<i>N. lolii/ L. per.</i>	<i>N. unc./ F. prat.</i>	
Ergotalkaloide	Ergovalin	+	+	-	BACON et al., 1981
Indolisoprenoide	Lolitrem B	-	+	-	GALLAGHER et al., 1981
Amino- pyrrolizidine	Loline	+	-	+	YATES & TOOKEY, 1965
Azaindolizidine	Peramin	+	+	-	ROWAN et al., 1986

N. coen. = *Neotyphodium coenophialum*; *N. unc.* = *Neotyphodium uncinatum*;

F. arun. = *Festuca arundinacea*; *L. per.* = *Lolium perenne*, *F. prat.* = *Festuca pratensis*

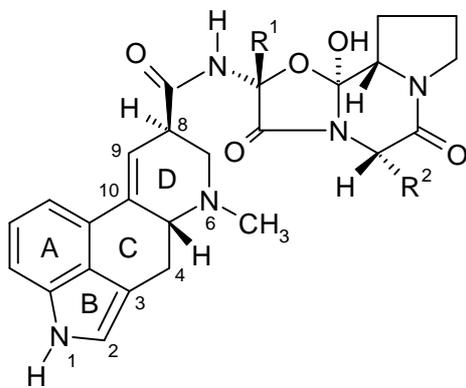
+ = nachweisbar; - = nicht nachweisbar

1.5.1. Ergotalkaloide

Aus Tab. 4 geht hervor, dass bei der Symbiose zwischen *N. coenophialum* und *F. arundinacea* sowie *N. lolii* und *L. perenne* in der Pflanze Ergotalkaloide gebildet werden. Diese Ergotalkaloide sind hauptverantwortlich für die Weidetierkrankung „fescue toxicosis“ (BACON et al., 1986; LYONS et al., 1986). PORTER et al. (1979) zeigten, dass die endophytischen Pilze *in vitro*, d. h. auf speziellen Nährmedien, Ergotalkaloide bilden. Diese Ergotalkaloide sind identisch mit denen, die in der Pflanze gebildet werden (BACON et al., 1981). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* lassen sich die Ergotalkaloide bei den Pilzen *N. coenophialum* und *N. lolii* nachweisen. Beim Pilz *N. uncinatum* konnten Ergotalkaloide bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Die natürlichen Ergotalkaloide lassen sich in fünf größere Klassen einteilen: Den Clavinen, Lysergsäure und einfache Lysergsäureamide, den Peptidalkaloiden sowie den Peptamalkaloiden.

Der wichtigste Vertreter der Ergotalkaloide bei der Symbiose zwischen den *Neotyphodium* spp. und den Wirtsgräsern ist das Ergovalin, ein Peptidalkaloid (siehe Abb. 8). Sowohl in der Pflanze (LYONS et al., 1986; SIEGEL et al., 1990; ROTTINGHAUS et al., 1991), *in vivo*, als auch in Laborkulturen des Pilzes, *in vitro*, (PORTER et al., 1979; PORTER et al., 1981) ist Ergovalin das am meisten produzierte Ergotalkaloid. In den *in vitro* Kulturen ließen sich weiter geringe Mengen an Ergosin und die C-8 Epimere Ergovalinin und Ergosinin nachweisen. Im Saatgut von mit *N. coenophialum* besiedelten *F. arundinacea* konnte neben Ergovalin auch noch Ergosin und geringe Mengen von Ergotamin, Ergonin, Ergocrystin, Ergocryptin, Ergocornin (siehe Abb. 8) und die C-8 Epimere Ergosinin und Ergotaminin nachgewiesen werden (PLATTNER et al., 1983; YATES et al., 1985). In besiedelten Pflanzenmaterial wurden Ergovalin, Ergosin und Ergonin in Blattscheiden und -spreiten nachgewiesen. Daneben fanden sich geringe Mengen an Ergoptin und Ergocornin (siehe Abb. 8) (LYONS et al., 1986).



Ergotamin Gruppe (R¹= CH₃)

Ergotamin

Ergosin

Ergovalin

Ergoxin Gruppe (R¹= -C₂H₅)

Ergoptin

Beta-Ergoptin

Ergonin

Ergotoxin Gruppe (R¹=-iso-Propyl)

Ergocrystin

Alpha-Ergocryptin*Beta*-Ergocryptin

Ergocornin

R²-CH₂Ph

-iso-Butyl

-iso-Propyl

R²

-iso-Butyl

-sec-Butyl

-iso-Propyl

R²-CH₂Ph

-iso-Butyl

-sec-Butyl

-iso-Propyl

Abb. 8: Strukturformeln der Ergotalkaloide, die in *neotyphodium*-besiedelten Gräsern nachgewiesen wurden

Die C-8 Epimere der Peptidalkaloide Ergotaminin, Ergosinin und Ergovalinin werden als Artefakte angesehen, die bei der Aufbereitung entstehen.

Neben den Peptidalkaloiden wurden sowohl in den *in vitro* Kulturen von *N. coenophialum* (PORTER et al., 1979; PORTER et al., 1981) als auch in den besiedelten *F. arundinacea* Gräsern (LYONS et al., 1986) Alkaloide der Clavingruppe isoliert. Die nachgewiesenen Alkaloide sind Chanoclavin 1, Agroclavin, Elymoclavin, 6,7-Secoagroclavin und Penniclavin (siehe Abb. 9).

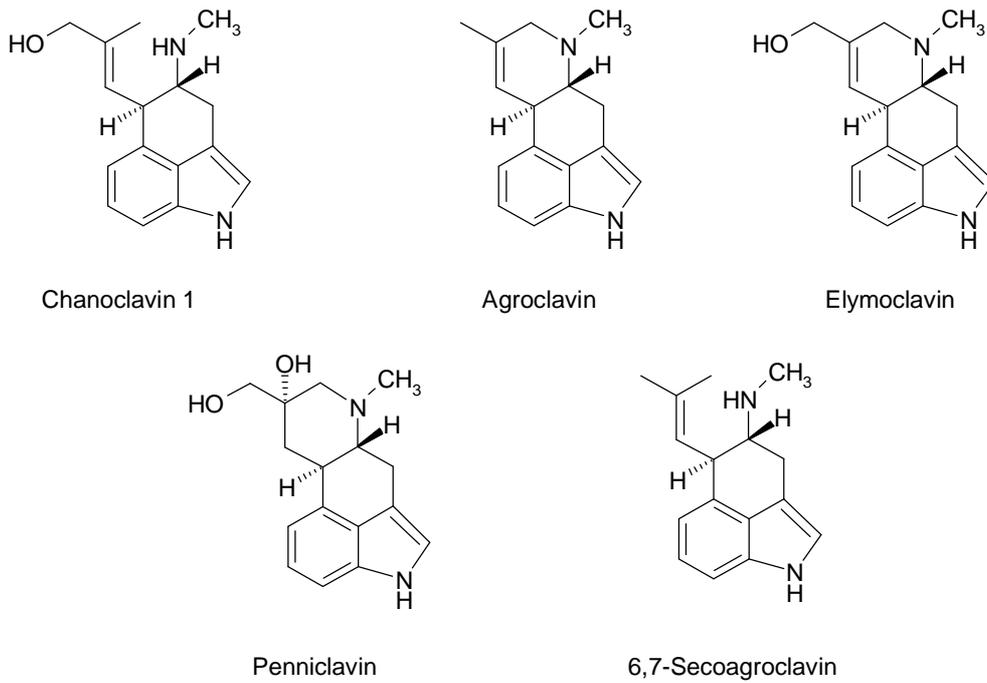


Abb. 9: Strukturformeln der Clavinalkaloide, die in *neotyphodium*-besiedelten Gräsern nachgewiesen wurden

Weiter wurden Lysergsäureamid in Pflanzenproben (PETROSKI & POWELL, 1991; SHELBY, 1992) von *neotyphodium*-besiedelten *F. arundinacea* und Ergonovin im Saatgut von *neotyphodium*-besiedelten *F. arundinacea* (YATES & POWELL, 1988; PETROSKI & POWELL, 1991) nachgewiesen (siehe Abb. 10).

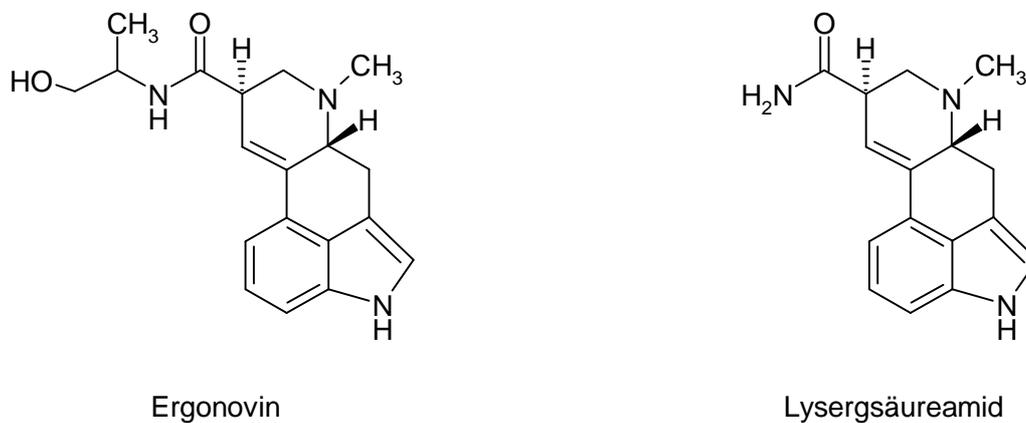


Abb. 10: Strukturformeln der Ergotalkaloide Ergonovin und Lysergsäure

Beide Substanzen werden jedoch nicht vom Pilz *N. coenophialum* gebildet. So wird das Lysergsäureamid wahrscheinlich bei der Extraktion als Artefakt gebildet (AGURELL, 1966; FLOSS, 1976). Ergonovin hingegen deutet auf eine Verunreinigung der untersuchten Proben mit dem Pilz *Claviceps purpurea* hin (YATES & POWELL, 1988), von dem bekannt ist, dass er Ergonovin bildet. In *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Proben wurden von den Ergotalkaloiden Ergovalin und Ergotamin nachgewiesen (ROWAN & SHAW, 1987).

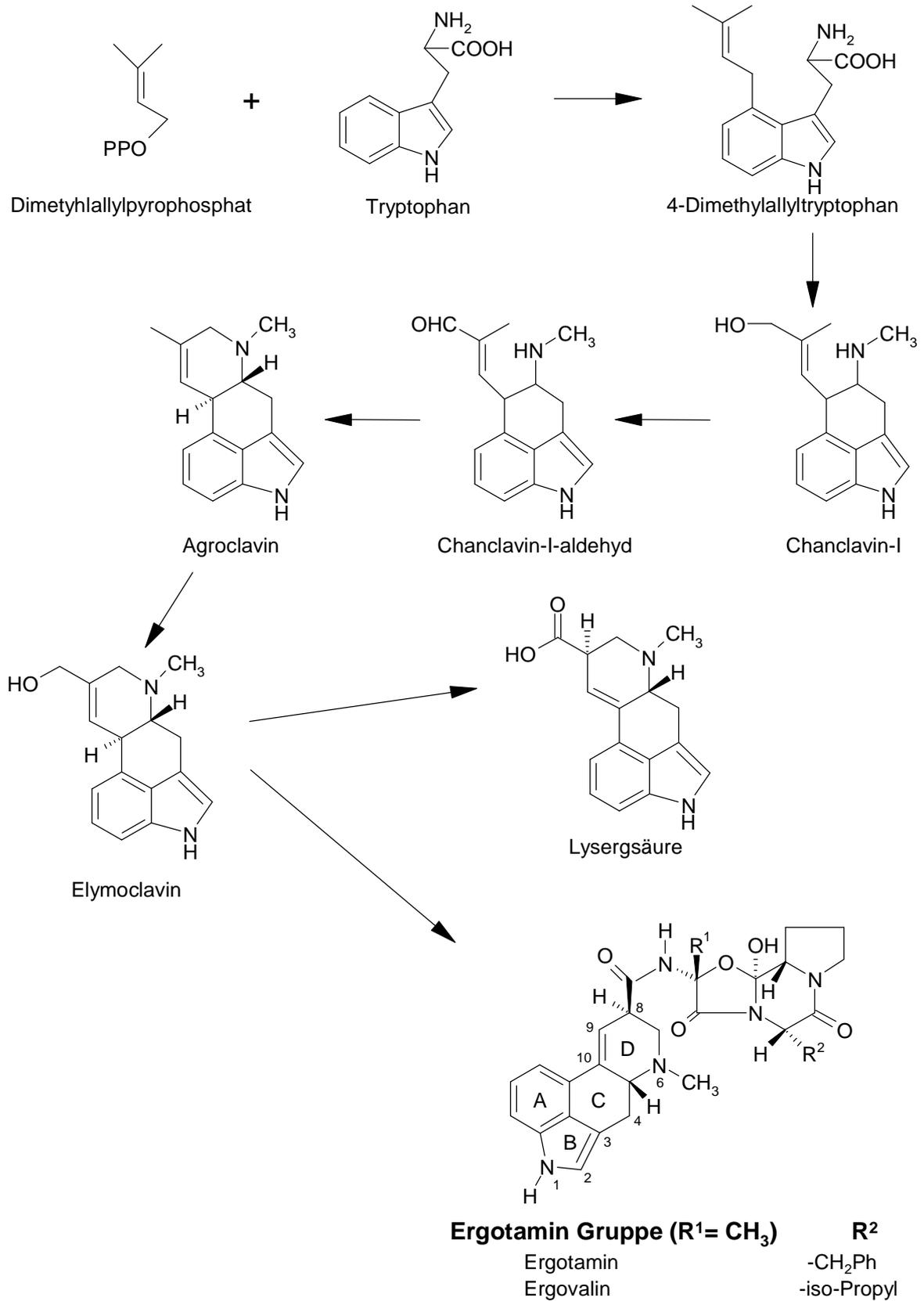


Abb. 11: Biosynthese der Ergotalkaloide

Die Biosynthese der Ergotalkaloide durch den Pilz *Claviceps* spp. ist aufgrund der therapeutischen Wirksamkeit einiger Ergotalkaloide gut aufgeklärt (FLOSS, 1976; BERDE & SCHILD, 1978; SOCIC & GABERC-POREKAR, 1992; GARNER et al., 1993). Die Biosynthese der Ergotalkaloide, die von den *Neotyphodium*-Pilzen gebildet werden, sollten nach dem gleichen Schema ablaufen. Ausgehend vom Tryptophan und einer isoprenoiden C₅-Einheit, dem Dimethylallylpyrophosphat, bildet sich unter Verlust der Carboxylgruppe das Ergolingerüst. Die einzelnen Schritte der Biosynthese sind in Abb. 11 dargestellt.

Aus Tryptophan und Dimethylallylpyrophosphat wird 4-Dimethylallyltryptophan gebildet. Aus dem 4-Dimethylallyltryptophan bildet sich als Zwischenstufe auf dem Weg zum Ergolingerüst das Chanoclavin-I. Hierbei kommt es vor dem Ringschluss zur Hydroxilierung der cis-Methylgruppe des Dimethylallylrestes, die dann durch eine cis, trans-Isomerisierung zur trans-Hydroxymethylgruppe des Chanoclavin-I wird. Chanoclavin-I wird zum Chanoclavin-I-aldehyd oxidiert, der in enzymgebundener Form unter intermediärer Aufhebung der allylischen Doppelbindung durch Reaktion der Aldehyd- mit der Aminogruppe in das Agroclavin übergeht. Durch eine Oxigenase wird Agroclavin zum Elymoclavin hydrolysiert. Elymoclavin kann durch eine Dehydrierung sowie der Wanderung einer Doppelbindung zur Lysergsäure umgewandelt werden. Über die Bildung der Peptidalkaloide, wie z. B. Ergotamin und Ergovalin ist wenig bekannt. Wahrscheinlich bildet sich direkt eine aktivierte Form der Lysergsäure, die zu den entsprechenden Amiden umgesetzt wird.

Für die Extraktion, Isolierung und Identifikation der Ergotalkaloide aus den *neotyphodium*-besiedelten Gräsern gibt es verschiedenste Vorschriften. Bei der Aufarbeitung der Proben ist zu beachten, dass die Ergotalkaloide außerordentlich empfindlich sind gegenüber photolytischer oder Luftoxidation, sowie einer raschen Hydratation und einer Epimerisierung am C-8-Atom des Lysergsäurerestes unterliegen (BERDE & SCHILD, 1978; GARNER et al., 1993; PORTER, 1994). Um die Zersetzung und Epimerisierung der Ergotalkaloide zu verhindern, wird möglichst unter Lichtausschluss und bei niedrigen Temperaturen (< 25 °C) gearbeitet. Zur Identifizierung und Quantifizierung wird die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenz- oder UV-Detektion eingesetzt (BETHKE et al., 1976; WURST et al., 1978; YATES & POWELL, 1988; ROTTINGHAUS et al., 1991; CRAIG et al., 1994). Daneben spielt auch die Dünnschichtchromatographie (DC) als preiswerte und schnelle Methode eine Rolle (PORTER et al., 1979; PERELLINO et al., 1993). Die Identifizierung und Quantifizierung der Ergotalkaloide von besiedelten Gräsern und von *in vitro*-Kulturen mittels Massenspektroskopie wurde mit elektronischer Ionisierung (PORTER et al., 1979), chemischer Ionisierung (PORTER & BETOWSKI, 1981; PORTER et al., 1981) und mit MS/MS-Kopplung (PLATTNER et al., 1983; YATES et al., 1985; LYONS et al., 1986; PORTER et al., 1987) durchgeführt.

Nach CORNELL et al. (1990) kommt es oberhalb eines Ergovalin-Gehaltes von 50 ng/g Trockenmasse des besiedelten Grases zu ersten Symptomen der Weidetierkrankung „fescue toxicosis“. Jedoch ist Ergovalin nicht allein verantwortlich für das Auftreten der „fescue toxicosis“, auch andere Ergotalkaloide und die Pyrrolizidinalkaloide N-Formyllolin und N-Acetyllolin vergrößern das Risiko der Weidetierkrankung „fescue toxicosis“. Die gefundenen Ergovalin-Gehalte in besiedelten *F. arundinacea* Gras und Saatgut variierten von 2000 ng/g bis 6000 ng/g Trockenmasse. Dabei ist der Ergovalin-Gehalt abhängig von der Jahreszeit und der Stickstoffdüngung (LYONS et al., 1986; BELESKY et al., 1988; LYONS et al., 1990; ROTTINGHAUS et al., 1991; ARACHEVALETA et al., 1992). Im mit *N. lolii* besiedelten *L. perenne* fanden sich Ergovalin-Gehalte von 5000 ng/g Trockenmasse.

1.5.2. Paxillinindole

Eine weitere wichtige Gruppe der toxischen Sekundärmetabolite sind die Indolisoprenoide. Nach PENN et al. (1993) wird diese Verbindungsklasse von allen drei endophytischen Pilzen *N. lolii*, *N. coenophialum* und *N. uncinatum* auf *in vitro*-Kulturen gebildet. Bei den Pilzen *N. coenophialum* und *N. uncinatum* wurden die Indolisoprenoide jedoch nur in geringen Mengen nachgewiesen. Wesentlich größere Mengen wurden beim Pilz *N. lolii* festgestellt. In der Natur, *in vivo*, wurden die Indolisoprenoide bisher nur bei der Symbiose zwischen *N. lolii* und *L. perenne* nachgewiesen. (GALLAGHER et al., 1985; WEEDON & MANTLE, 1987). Bei den Symbiosen zwischen *N. coenophialum* und *F. arundinacea* bzw. *N. uncinatum* und *F. pratensis* wurden die Indolisoprenoide bisher noch nicht beobachtet.

Der wichtigste Vertreter der Indolisoprenoide bei der Symbiose zwischen *N. lolii* und *L. perenne* ist das Lolitrem B. Sowohl in der Pflanze (GALLAGHER et al., 1984; MILES et al., 1992, 1993) als auch in den *in vitro*-Kulturen (MILES et al., 1992; PENN et al., 1993) von *N. lolii* ist Lolitrem B in den überwiegenden Fällen das am meisten gebildete Alkaloid. Aus mit *N. lolii* besiedelten Gras wurden weitere fünf Lolitreme, und zwar Lolitrem A, C, D, E und F in geringen Mengen isoliert (GALLAGHER et al., 1981; MILES et al., 1994; MUNDAY-FINCH et al., 1995, 1996). Neben den Lolitremen wurden weiterhin in den besiedelten *L. perenne* Gräsern Paxillin und Lolillin nachgewiesen (WEEDON & MANTLE, 1987; MUNDAY-FINCH et al., 1997). Im Jahr 1998 wurden Lolicin A und B sowie 31-Epilolitrem N und F weitere vier neue Lolitreme aus den besiedelten Gräsern in geringen Mengen isoliert (MUNDAY-FINCH et al., 1998). In den *in vitro*-Kulturen von *N. lolii* wurden neben dem Alkaloid Lolitrem B noch Paxillin und Lolitriol nachgewiesen (PENN et al., 1993).

MANTLE & WEEDON (1994) schlagen den in Abb. 12 dargestellten Biosyntheseweg der Lolitreme vor.

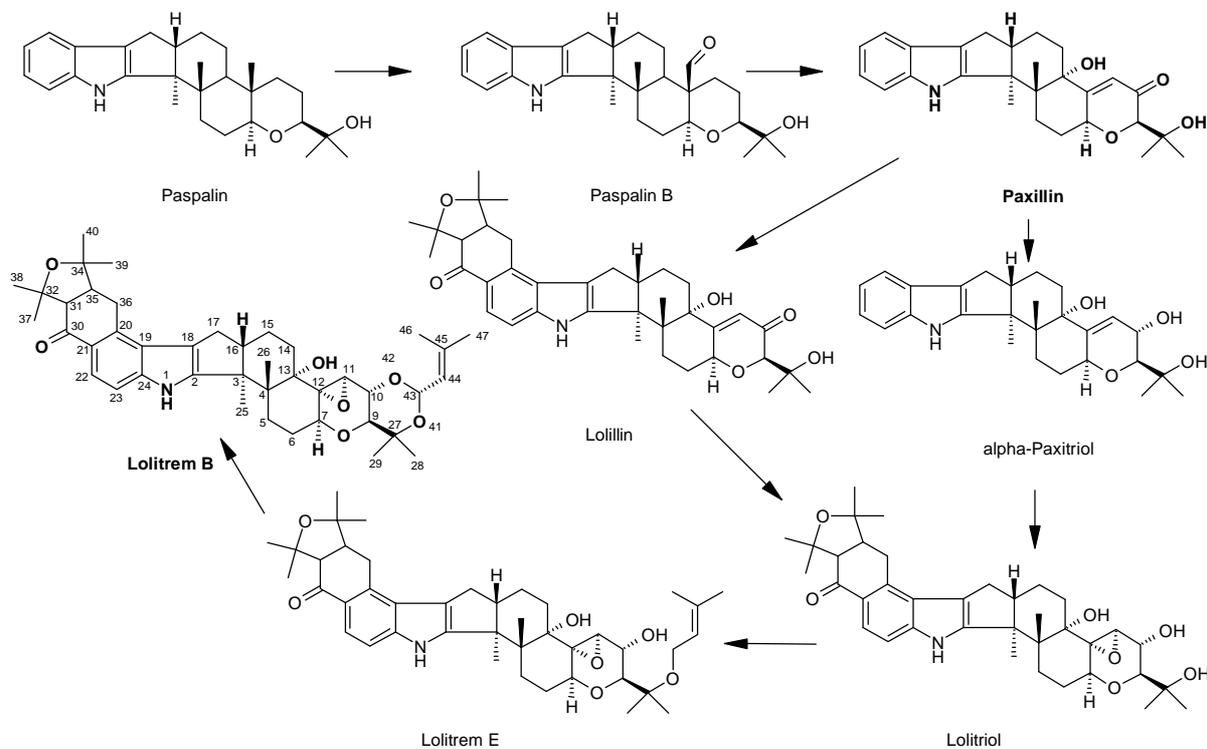


Abb. 12: Möglicher Biosyntheseweg von Lolitrem B, ausgehend vom Paspalin [nach MANTLE & WEEDON, 1994; MUNDAY-FINCH et al., 1997]

Ausgehend vom Paspalin bildet sich das sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesene Intermediat Paxillin (WEEDON & MANTLE, 1987; MILES et al., 1992; PENN & MANTLE, 1994). Durch Reduktion der Ketogruppe an C-10 entsteht das α -Paxitriol, welches durch Addition zweier Isopreneinheiten und einer Epoxidierung einer Doppelbindung zum Lolitriol umgesetzt wird. MUNDAY-FINCH et al. (1997) schlagen nach der Isolierung und Identifikation von Lolillin für die Bildung des Lolitriols einen etwas anderen Biosyntheseweg vor. Aus dem Paxillin bildet sich durch Addition zweier Isopreneinheiten an den Positionen C-20 und C-21 des Paxillinskeletts das Lolillin. Diese Addition wurde in analoger Weise auch bei der Biosynthese der Penitrems und Janthitrems postuliert (MANTLE & PENN, 1989; PENN & MANTLE, 1994). Durch Reduktion der Ketogruppe an C-10 und der Epoxidierung der Doppelbindung C-11 (12) entsteht aus dem Lolillin das Lolitriol. Durch Addition einer weiteren Isopreneinheit an das Lolitriol bildet sich Lolitrem E, aus dem sich schließlich das Lolitrem B bildet.

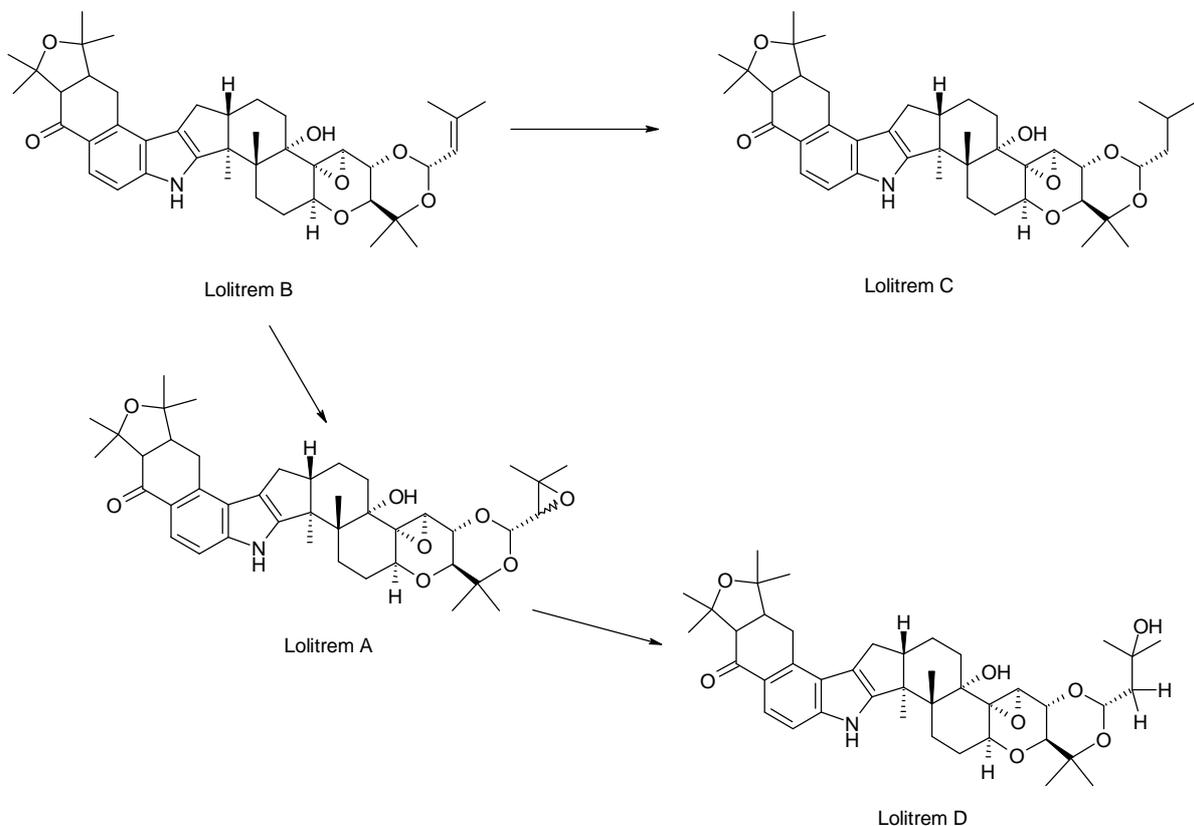


Abb. 13: Strukturformeln von Lolitrem A, B, C und D

Lolitrem A entsteht durch Epoxidierung der Doppelbindung an C-44 (45). Wird das gebildete Epoxid mit einem Hydridion geöffnet, ist die Bildung von Lolitrem D denkbar. Alternativ wird durch die Hydrierung von Lolitrem B an der Doppelbindung C-44 (45) Lolitrem C erhalten (siehe Abb. 13). Ein weiteres Lolitrem, das Lolitrem F ist ein Stereoisomer von Lolitrem B. Die H-Atome an C-31 und C-35 stehen beim Lolitrem F cis zueinander im Gegensatz zum Lolitrem B, wo die H-Atome trans zueinander angeordnet sind. Es wird vermutet, dass das Enzym, welches am Aufbau des Ringsystems beteiligt ist, einen Mangel an Stereospezifität besitzt, und es somit zur Bildung der cis-ständigen H-Atome kommen kann (MUNDAY-FINCH et al., 1997). Aus diesem Grunde wird erwartet, dass im mit *N. lolii* besiedelten *L. perenne* auch die analogen

Stereoisomere des Lolitriols, Lolitrem A und Lolitrem E vorhanden sind, jedoch in wesentlich geringeren Mengen.

Zur Identifizierung und Quantifizierung des wichtigsten Indolisoprenoids wird die HPLC mit Fluoreszenzdetektion (GALLAGHER et al., 1985) angewendet. Mit dieser HPLC-Methode können bis zu 80 Proben pro Tag analysiert werden. Auch die Dünnschichtchromatographie kann für den Nachweis von Lolitrem B in mit *N. lolii* besiedelten *L. perenne* verwandt werden (BERNY et al., 1997).

Nach DI MENNA et al. (1992) sowie PRESTIDGE & GALLAGHER (1989) kommt es oberhalb eines Lolitrem B-Gehaltes von 2000 µg/kg Trockenmasse zum Auftreten der Symptome (Koordinationsschwierigkeiten, Schreckhaftigkeit, Muskelkrämpfe etc.) der Weidetierkrankung „ryegrass staggers“. Neben der Hauptwirksubstanz Lolitrem B können die Lolitreme A, C, D, E sowie Paxillin die Erkrankung „ryegrass staggers“ verstärken.

Der Lolitrem B-Gehalt in *N. lolii* besiedelten *L. perenne* variierten von 1000-10000 µg/kg Trockenmasse. Dabei ist der Lolitrem B-Gehalt abhängig von der Jahreszeit. Die höchsten Lolitrem B-Gehalte finden sich im Sommer und im frühen Herbst. Im Winter und Frühling sind die Lolitrem B-Gehalte auf einen relativ stabilen niedrigen Level (DI MENNA et al., 1992; BALL et al., 1995). Innerhalb der Pflanze finden sich die höchsten Lolitrem B-Gehalte in den Blattscheiden. Wesentlich geringere Lolitrem B-Gehalte werden in den Blattspreiten und den Wurzeln der *N. lolii* besiedelten *L. perenne* Pflanzen nachgewiesen (DI MENNA et al., 1992; BALL et al., 1995, 1997).

1.5.3. Aminopyrrolizidine

Aus Tab. 4 geht hervor, dass die wichtige Gruppe der Aminopyrrolizidine, die Loline, bei den Symbiosen *N. coenophialum* und *F. arundinacea* bzw. *N. uncinatum* und *F. pratensis* gebildet werden (BUSH et al., 1982; 1993; SIEGEL et al., 1990). In der Symbiose zwischen *N. lolii* und *L. perenne* konnten bisher noch keine Aminopyrrolizidine nachgewiesen werden. Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Aminopyrrolizidinalkaloide vom Gras als Antwort auf die Anwesenheit des Pilzes *N. coenophialum* gebildet werden (SIEGEL et al., 1990). Jedoch gelang im Jahre 1997 SCHARDL et al. (1997) der Nachweis von Pyrrolizidinalkaloiden in *in vitro*-Kulturen von *N. uncinatum*. Somit gehören auch die Pyrrolizidinalkaloide zur Gruppe der Mykotoxine. In *in vitro*-Kulturen von *N. coenophialum* und *N. lolii* konnten bisher noch keine Pyrrolizidinalkaloide nachgewiesen werden.

Die wichtigsten Vertreter der Aminopyrrolizidine im mit *N. coenophialum* besiedelten *F. arundinacea* sind das N-Formyllolin und N-Acetyllolin (KENNEDY & BUSH, 1983). Daneben spielen bei der Kombination *N. coenophialum*/*F. arundinacea* Lolin, Norlolin, N-Methylolin, N-Formylnorlolin und N-Acetylnorlolin eine untergeordnete Rolle (YATES et al., 1990; PETROSKI & POWELL, 1991). Im mit *N. uncinatum* besiedelten *F. pratensis* ist der Sachverhalt ähnlich. Die Hauptkomponente der Aminopyrrolizidinalkaloide ist hier das N-Formyllolin, gefolgt vom N-Acetyllolin und dem N-Acetylnorlolin. Weiter konnten im besiedelten *F. pratensis* geringe Mengen von Lolin und N-Methylolin nachgewiesen werden (JUSTUS et al., 1997).



Abb. 14: Strukturformeln der Aminopyrrolizidinalkaloide

Im Jahr 1986 gelang TUFARIELLO et al. (1986) die Totalsynthese des Lolins (siehe Abb. 15). Durch Reaktion eines Nitrons mit Methyl-4-hydroxycrotonat erhält man nach mehreren Zwischenstufen Methyl-2β-hydroxy-7,7-dimethoxy-8α-pyrrolizidin-1β-carboxylat. Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid und anschließende Acetalisierung des Produktes ergibt das Diacetat. Umsetzung des Diacetates mit Trifluoressigsäure und Natriumbicarbonat führt schließlich zum Keton 2β-Acetyl-1α-acetyl-methyl-7-oxo-8α-pyrrolizidin. Nach Reduktion des Ketons zum Alkohol wird durch Abspaltung der Acetalgruppen das Diol erhalten, welches unter Bildung der Sauerstoffbrücke weiterreagiert. Durch Manipulation des Substituenten am C1-Atom wird schließlich Lolin erhalten. Die beschriebene Totalsynthese ist eine Vielstufensynthese und somit nicht für die Herstellung großer Mengen von Lolin geeignet.

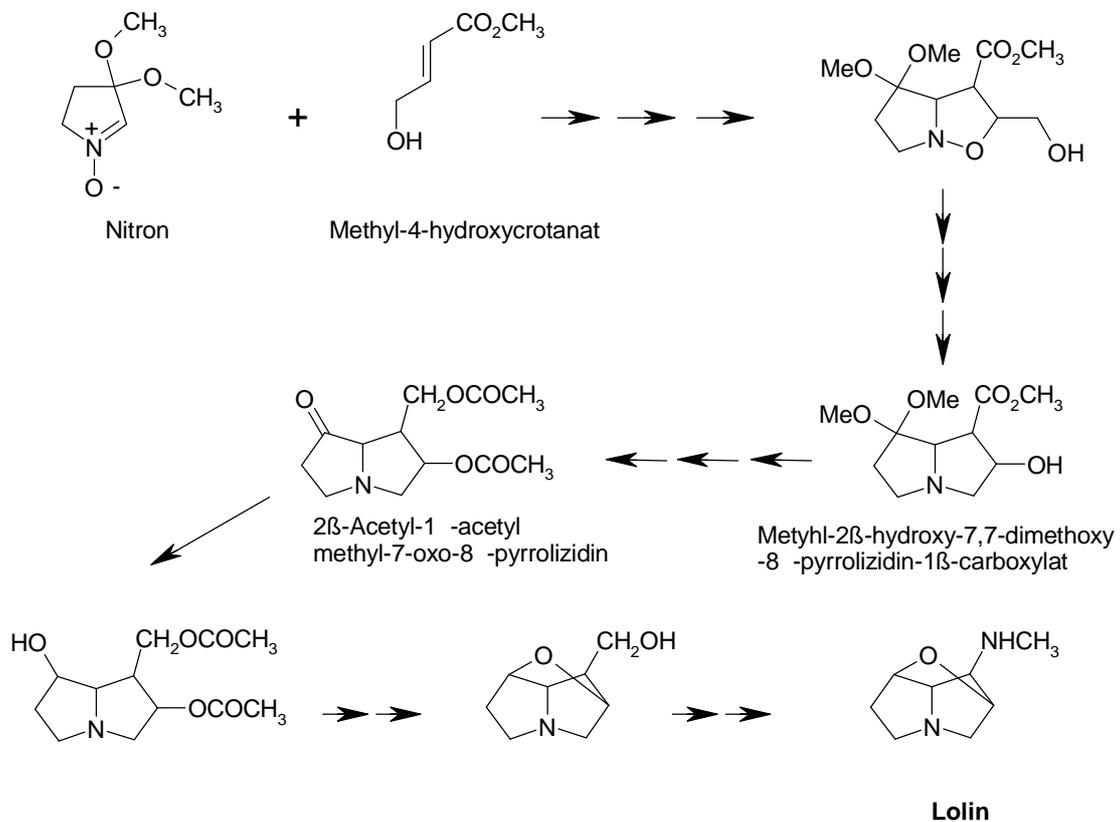


Abb. 15: Totalsynthese von Loline [nach TUFARIELLO et al., 1986]

Aus diesem Grunde haben PETROSKI et al. (1989) zur Herstellung der anderen Aminopyrrolizidine sämtliche Aminopyrrolizidine aus mit *N. coenophialum* besiedelten *F. arundinacea* Saatgut isoliert und in das Lolin umgewandelt. Ausgehend vom Lolin wurden die anderen Aminopyrrolizidine N-Formyllolin, N-Acetyllolin, N-Methylolin, Norlolin, N-Formylnorlolin und N-Acetylnorlolin synthetisiert.

Die Biosynthese der Loline ist bis heute noch weitgehend ungeklärt. Jedoch waren Biosynthesen anderer Pyrrolizidinbasen Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Aufgrund dieser Studien kann davon ausgegangen werden, dass die Aminosäure Ornithin auch der Ausgangspunkt der Biosynthese der Aminopyrrolizidinalkaloide ist (siehe Abb. 16). Ornithin wird mittels der Ornithin-carboxylase decarboxyliert und es entsteht so Putrescin (NOWACKI & BYERRUM, 1962; BOTTOMLEY & GEISSMAN, 1964; BALE & CROUT, 1975). Weiter wird angenommen, dass ähnlich wie für das Rosmarinecin (KELLY & ROBIN, 1987) als nächstes Spermidin als Vorstufe für das Pyrrolizidingerüst gebildet wird. Spermidin entsteht aus Putrescin und S-Adenosylmethionin (welches vorher decarboxyliert wurde) als Substrat unter Katalyse der Spermidin Synthetase. Der Ringschluss und die Addition der Sauerstoffbrücke führt schließlich zum Norlolin.

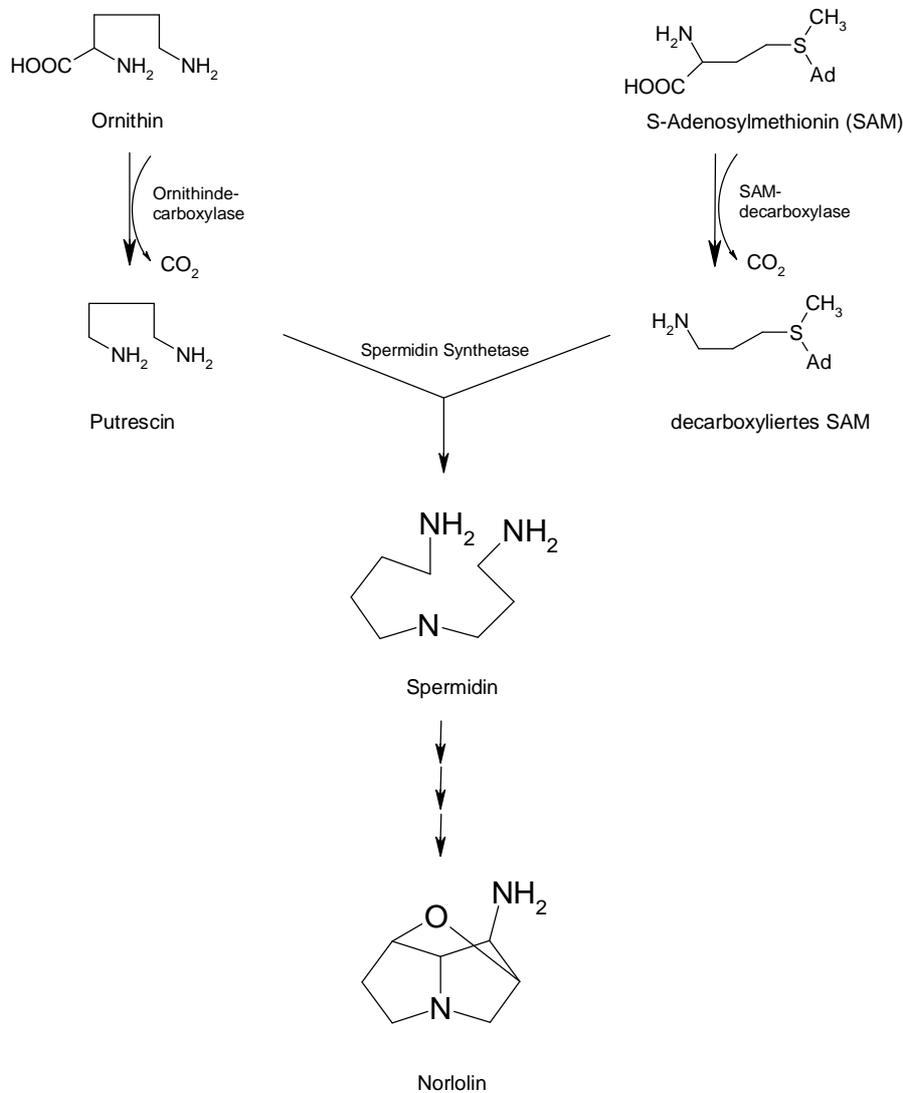


Abb. 16: Vorgeschlagener Biosyntheseweg von Norlolin [nach BUSH et al., 1993]

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Aminopyrrolizidinalkaloide wird aufgrund der relativ leichten Flüchtigkeit hauptsächlich die Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion oder massenspektroskopischer Detektion verwendet (YATES et al., 1990; POWELL & PETROSKI, 1992; TEPASKE et al., 1993). Auch die Dünnschichtchromatographie eignet sich zum Nachweis der Aminopyrrolizidinalkaloide (BUSH & JEFFREYS, 1975).

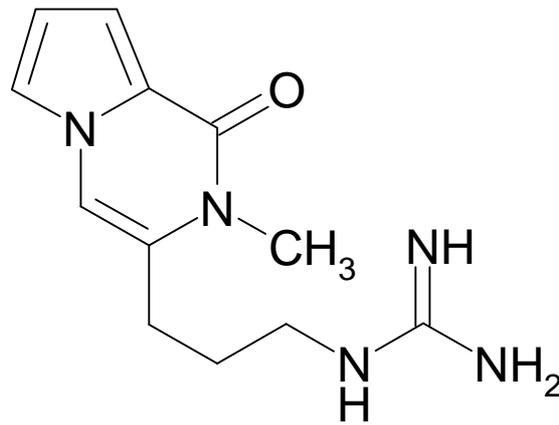
Im mit *Neotyphodium* spp. besiedelten *F. arundinacea* und *F. pratensis* finden sich Lolin-Gehalte von 1800 - 5000 µg/g Trockenmasse. Hierbei ist unter dem Lolin-Gehalt die Summe der beiden wichtigsten Loline N-Formyllolin und N-Acetyllolin zu verstehen (BUSH et al., 1982, 1993; YATES et al., 1990; JUSTUS et al., 1997). Die höchsten Lolin-Gehalte finden sich hierbei in den Ährchen, gefolgt von der Spindel, dem Halm, den Blattspreiten und den Blattscheiden (BUSH et al., 1993; JUSTUS et al., 1997). Der Gehalt an N-Formyllolin und N-Acetyllolin ist im reifen Saatgut wesentlich höher als im vegetativen Gewebe (BUSH et al., 1982). Die Alkaloide verteilen sich innerhalb der Pflanze in alle Pflanzenteile. So wurden auch in den Wurzeln und Blattspreiten die Loline nachgewiesen, obwohl aus diesen Pflanzenteilen der *Neotyphodium*-Pilz bisher noch nicht isoliert werden konnte.

Weiter zeigt auch die Jahreszeit einen Einfluss auf den Lolin-Gehalt. Bei dem mit *N. coenophialum* besiedelten *F. arundinacea* finden sich die höchsten Lolin-Gehalte im späten Sommer. Im Winter und Frühling sind die Lolin-Gehalte geringer (PUTMAN et al., 1991). JUSTUS et al. (1997) fanden bei ihren Untersuchungen an mit *N. uncinatum* besiedelten *F. pratensis* einen ähnlichen Verlauf des Lolin-Gehaltes. Der Lolin-Gehalt steigt von nahezu null Anfang Frühling stetig an. Die höchsten Lolin-Gehalte finden sich während der Samenreife im Sommer. Bei der anschließenden Samenverbreitung und Stängelsenescenz fällt der Lolin-Gehalt; im späten Sommer, in der Periode des vegetativen Wachstums, steigt der Lolin-Gehalt wieder. Daneben wird der Lolin-Gehalt auch von der Temperatur, Nährstoff- und Wasserversorgung beeinflusst. Wassermangel führt zu einem Anstieg des Lolin-Gehaltes (KENNEDY & BUSH, 1983; BELESKY et al., 1989). Nach KENNEDY & BUSH (1983) ist ein Temperaturregime von 21 °C/15 °C optimal zur Bildung der Lolinalkaloide. Bezüglich des Einflusses der Nährstoffversorgung auf den Lolin-Gehalt sind die Berichte in der Literatur widersprüchlich. BELESKY et al. (1989) fanden einen positiven Einfluss des pflanzenverfügbaren Stickstoff auf den Lolin-Gehalt. Bei den Versuchen von KENNEDY & BUSH (1983) wurde kein Einfluss der Stickstoffgabe auf den Lolin-Gehalt gefunden.

Wichtigste Eigenschaft der Aminopyrrolizidine, insbesondere des N-Formyllolins, ist ihre insektenabschreckende Wirkung. Mit angereicherten Fraktionen von N-Formyllolin wurden zahlreiche Biotests durchgeführt. Hier zeigte N-Formyllolin eine insektenabschreckende und teilweise auch toxische Wirkung gegenüber *Rhospalosiphum padi*, *Schizaphis graminum* und *Oncopeltus fasciatus* (JOHNSON et al., 1985; YATES et al., 1989). Aufgrund dieser abschreckenden Wirkung gegenüber Schadinsekten werden die Aminopyrrolizidinalkaloide auch als mögliche Stoffe für die Insektenbekämpfung angesehen (RIEDEL et al., 1991).

1.5.4. Azaindolizidine

Das einzige Azaindolizidin, welches bisher in *Neotyphodium*-besiedelten Gräsern gefunden wurde, ist das Peramin (siehe Abb. 17). In der Natur wird Peramin in mit *N. coenophialum* besiedelten *F. arundinacea* und mit *N. lolii* besiedeltes *L. perenne* gebildet (ROWAN et al., 1986; TAPPER et al., 1989; SIEGEL et al., 1990; ROWAN, 1993). In *in vitro*-Kulturen wurde das Alkaloid beim Pilz *N. coenophialum* und *N. lolii* nachgewiesen (ROWAN et al., 1986).



Peramin

Abb. 17: Strukturformel von Peramin

Im Jahr 1988 gelang DUMAS (1988) die Totalsynthese des Peramins (siehe Abb. 18). Durch Umsetzung von 2-Trichloroacetylpyrrol [Abb. 18, (1)] mit 1-Bromo-5-chloro-2-pentanon [Abb. 18, (2)] wird nach einer N-Alkylierung und anschließenden Ringschluss ein Pyrrolo[2,1-c]oxa-1-on [Abb. 18, (3)] erhalten. Behandlung dieses Oxazin-1-on mit Methylamin und 1 N Salzsäure führt zum 3-(3-Chlorpropyl)-2-methylpyrrolo[1,2-a]pyrazin-1(2H)-on [Abb. 18, (4)]. Die Umwandlung der Chlorkomponente [Abb. 18, (4)] in das entsprechende Amin [Abb. 18, (6)] gelingt mit der Ing-Manske Variante der Gabriel-Synthese. Durch Zugabe von 2-Methyl-2-thiopseudoureasulfat zum Amin [Abb. 18, (6)] im wässrigen Medium ergibt das Peraminsulfat. Durch Anwendung der Ionenaustauschchromatographie wird schließlich die freie Base Peramin erhalten.

Zwei Jahre später stellten BRIMBLE & ROWAN (1990) eine weitere Totalsynthese des Peramins vor (siehe Abb. 19). Durch eine Michael-Addition von einem Nitroalken [Abb. 19, (1)] mit dem Kaliumsalz von Methyl-pyrrol-2-carboxylat [Abb. 19, (2)] wird das Michael-Additions-Produkt [Abb. 19, (3)] als Gemisch von Stereoisomeren in 82 %iger Ausbeute erhalten. Mit Hilfe von Natriumborhydrid-Cobalt-(II)-chlorid wird die Nitrogruppe des Michael-Adduktes zum Amin [Abb. 19, (4)] reduziert. Das Amin [Abb. 19, (4)] cyclisiert zum Lactam [Abb. 19, (5)] in 88 % Ausbeute, wenn unter Rückfluss in Toluol für 24 h erhitzt wird. Behandlung des Lactams [Abb. 19, (5)] mit einem Überschuss von Kaliumhydrid in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur führt zur Eliminierung der Ethoxygruppe unter Ausbildung des ungesättigten Lactams [Abb. 19, (6)] in 80 %iger Ausbeute. Das tertiäre Lactam [Abb. 19, (7)] wird durch weitere Umsetzung des Lactams [Abb. 19, (6)] mit Kaliumhydrid in Dimethylformamid und Addition von Methyljodid erhalten. Durch Reduktion des Esters mit Natriumborhydrid in Methanol wird der entsprechende Alkohol [Abb. 19, (8)] erzeugt. Durch Umsetzung des Alkohols mit Methansulfonylchlorid und Triethylamin bei -60 °C in Tetrahydrofuran gefolgt von einer Addition von einem Überschuss Lithiumbromid bei -60 bis -40 °C ergibt das Bromid [Abb. 19, (9)]. Durch Zugabe dieses Bromids [Abb. 19, (9)] zu einer Lösung von Cyanomethylencuprat bei -40 bis -20 °C in Tetrahydrofuran entsteht das Nitril [Abb. 19, (10)]. Die Reduktion des Nitrils [Abb. 19, (10)] mit Natriumborhydrid ergibt das Amin [Abb. 19, (11)]. Umsetzung desamins [Abb. 19, (11)] mit S-Methylthiuroniumhydrogensulfat führt zum gewünschten Produkt, dem Peramin [Abb. 19, (12)].

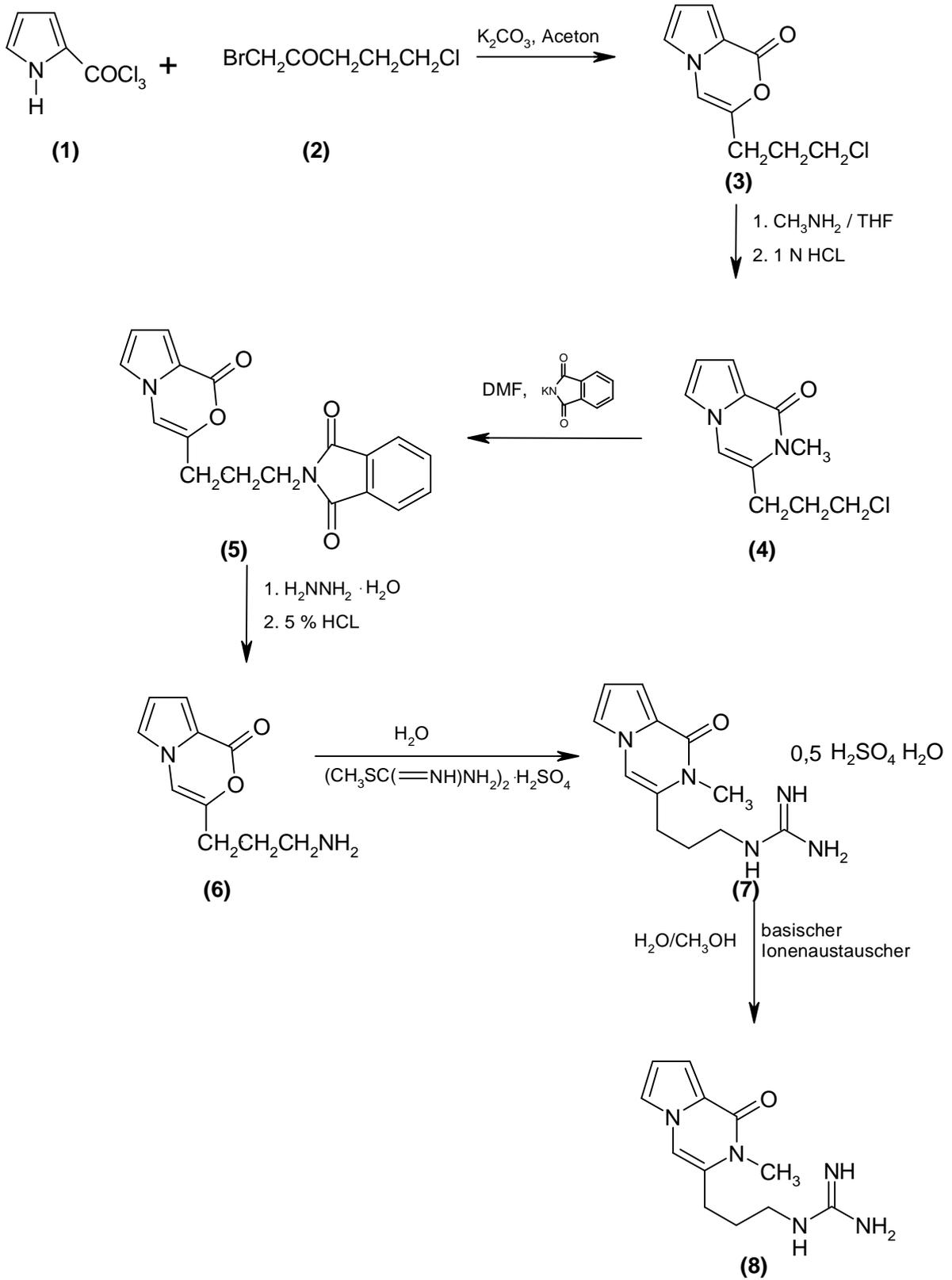


Abb. 18: Totalsynthese von Peramin [nach DUMAS, 1988]

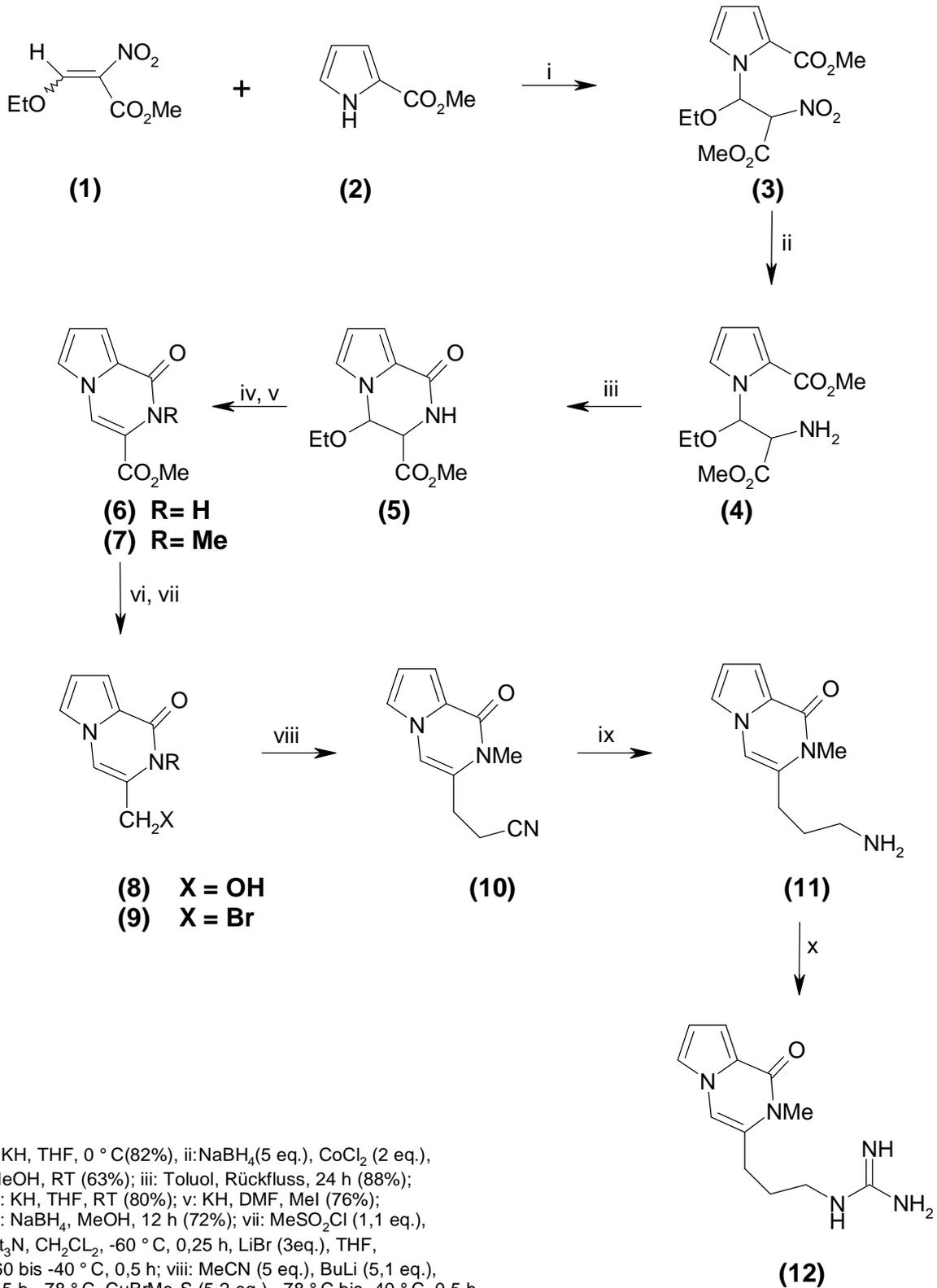


Abb. 19: Totalsynthese von Peramin [nach BRIMBLE & ROWAN, 1990]

Die Biosynthese des Peramins ist bis heute noch ungeklärt. Es wird angenommen, dass Peramin aus den beiden Aminosäuren Prolin und Arginin gebildet wird (ROWAN et al., 1986). Die Aminosäuren Arginin und Prolin sollen an der Oberfläche eines Enzyms linear gebunden werden. Durch die Reduktion der Carbonylgruppe des Arginins mit gleichzeitiger Eliminierung von Wasser und zwei Molekülen Wasserstoff wird Peramin gebildet. Peramin soll also durch Cyclisierungs- und Kondensationsreaktionen mit der abschließenden N-Methylierung (katalysiert von N-Methyltransferase und S-Adenosylmethionin) gebildet werden (siehe Abb. 20).

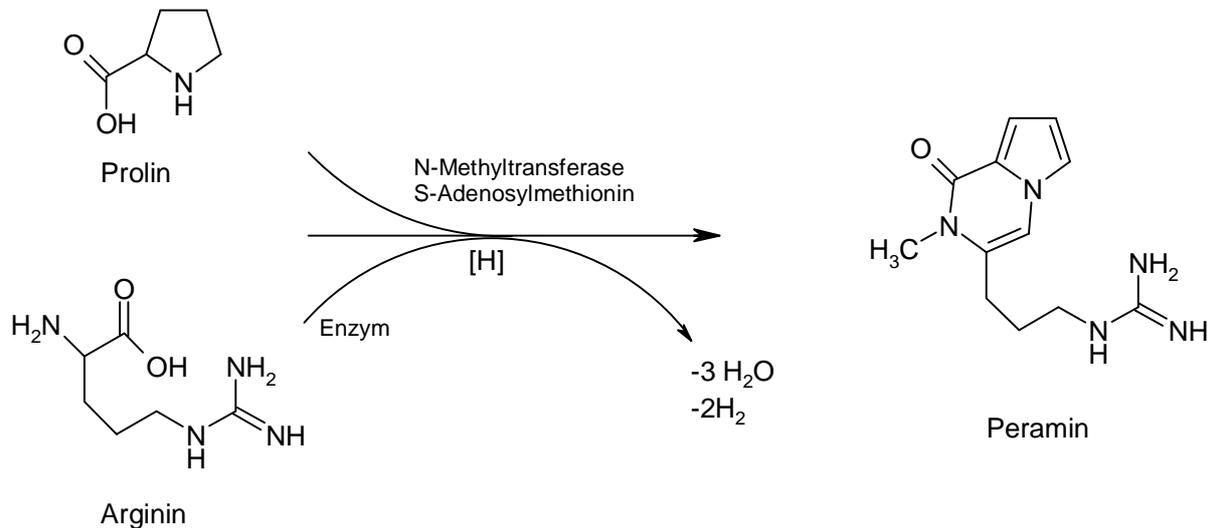


Abb. 20: Vorgeschlagene Biosynthese des Peramins [nach ROWAN et al., 1986]

Aufgrund des stark basischen Charakters der Guanidin-Gruppe an der aliphatischen Seitenkette des Pyrrolopyrazin-Ringes bereitet die Isolierung und Quantifizierung von Peramin einige Schwierigkeiten. TAPPER et al. (1989) entwickelten eine Methode zur Quantifizierung von Peramin und Lolitrem B mit nur einer Probenvorbereitung. Hierbei wird die gefriergetrocknete Probe mit zwei verschiedenen Lösungsmittelgemischen extrahiert. Zuerst wird ein Gemisch aus Methanol/Chloroform verwendet. Daraufhin wird Hexan und Wasser hinzugegeben. Nach Trennung der beiden Phasen wird die organische Phase zur Lolitrem B-Analyse verwendet. Die wässrige Phase wird zur Peramin-Analyse mittels HPLC und UV-Detektion genutzt. FANNIN et al. (1990) benutzen die Umkehrphasen-Dünnschichtchromatographie zur schnellen und günstigen Analyse und Quantifizierung des Peramins in endophyt-besiedelten Gräsern. ROWAN et al. (1986) hat die Fragmentierung des Peramin-Moleküls mit der Massenspektroskopie untersucht.

In mit *N. coenophialum* besiedelten *F. arundinacea* lagen die gefundenen Peramin-Gehalte bei ca. 4 µg/g Trockenmasse. Dagegen waren die gefundenen Peramin-Gehalte im mit *N. lolii* besiedelten *L. perenne* wesentlich höher. Hier lagen die gefundenen Peramin-Gehalte zwischen 5 und 40 µg/g Trockenmasse (FANNIN et al., 1990; SIEGEL et al., 1990). Peramin war in der gesamten Pflanze nachzuweisen. Nach ROYLANCE et al. (1994) fanden sich bei besiedelten *F. arundinacea* Pflanzen die höchsten Peramin-Gehalte im Halmgewebe gefolgt von den Rispen und den Blattspreiten. FANNIN et al. (1990) fanden die höchsten Peramin-Gehalte bei besiedelten *L. perenne* Pflanzen in den Blättern gefolgt vom Halm. Auch in den Wurzeln konnte Peramin nachgewiesen werden. Bei besiedelten *F. arundinacea* Gräsern fanden FANNIN et al. (1990) ungefähr gleiche Peramin-Gehalte in den Blättern und Halmen. In den Wurzeln von besiedelten *F. arundinacea* Pflanzen konnten sie kein Peramin nachweisen.

Die wichtigste Eigenschaft des Peramins ist seine insektenabschreckende Wirkung in den mit *N. coenophialum* und *N. lolii* besiedelten *F. arundinacea* und *L. perenne*. Peramin spielt laut SIEGEL

et al. (1990) eine wichtige Rolle bei der Insektenresistenz von *L. perenne* gegenüber *Listronotus bonariensis*, *Crambus* spp. und *Schizapis graminum*. Dabei scheint das Peramin aufgrund seines „schlechten Geschmacks“ als Antifraßmittel (Repellent), mit nur geringer chronischer Toxizität zu wirken (ROWAN et al., 1990). Versuche mit synthetisch hergestellten Peramin-Analogen haben gezeigt, dass das heterocyclische Ringsystem und die positive Teilladung in der aliphatischen Seitenkette unerlässlich für die Insektenabschreckung sind (ROWAN et al., 1990; ROWAN, 1993).

1.6. Nachweismethoden für *Neotyphodium* spp. in vivo

In Tab. 5 sind die wichtigsten Nachweismethoden für die *Neotyphodium*-Pilze zusammengestellt. Die Nachweismethoden lassen sich grob in vier verschiedene Bereiche einteilen. Zum einem sind dies die Färbemethoden der Mikroskopie. Hierzu zählen die Anilinblau-, Bengalrosa-Färbung sowie die etwas aufwendigere FDA-Färbung. Zu den serologischen Nachweismethoden zählen der ELISA (Enzym Linked Immunosorbant Assay)- und TPIB (Tissue Print Immuno Blot)-Test. Der PCR-Test (Polymerase Chain Reaction) mit anschließender Elektrophorese gehört zu den modernen, molekularbiologischen Verfahren. Die älteste Nachweismethode ist die direkte Isolierung der *Neotyphodium*-Pilze aus Pflanzenmaterial (Karyopsen, Blattscheiden).

Tab. 5: Überblick über die wichtigsten Nachweismethoden der *Neotyphodium* spp. in Karyopsen und Blattscheiden

Nachweismethode	Anwendungsgebiete	Referenz
Anilinblau-Färbung	Karyopsen, Blattscheiden	WELTY et al., (1986)
Bengalrosa-Färbung	Blattscheiden, Karyopsen	SAHA et al., (1988)
FDA-Färbung	Blattscheiden, (Karyopsen)	DAPPRICH, (1996)
ELISA-Test	Karyopsen, Blattscheiden	JOHNSON et al., (1982)
TPIB-Test	Blattscheiden, Karyopsen	GWINN et al., (1991)
PCR-Test	Blattscheiden, Karyopsen	DOSS & WELTY, (1995)
direkte Isolation	Blattscheiden, Karyopsen	NEIL, (1941)

Die Anilinblau-Färbung (WELTY et al., 1986) und die Bengalrosa-Färbung (SAHA et al., 1988) gehören zu den klassischen Färbemethoden der Mikroskopie. Durch diese Färbeverfahren werden die hyalinen, farblosen Hyphen der Pilze *Neotyphodium* farblich hervorgehoben. Bei der Anilinblau-Färbung erscheint das Pilzmycel blau, bei der Bengalrosa-Färbung rosa. Hierdurch wird eine sichere Aussage über eine mögliche Besiedlung des zu untersuchenden Präparates und darüber hinaus eine Beschleunigung des Nachweises erreicht. Ein großer Nachteil dieser beiden Färbemethoden ist, dass mit ihnen keine Informationen über die Vitalität der *Neotyphodium*-Pilze erlangt werden (SIEGEL et al., 1987). Es sind unspezifische Totalfärbungen, bei denen sowohl lebendes als auch totes Pilzmycel angefärbt wird. Weiter werden alle in der Pflanze lebenden Pilze angefärbt. Der Pilz *Neotyphodium* spp. muss anhand seines typischen Aussehens und Wachstums erkannt werden. Bei der Anilinblau-Färbung müssen die Präparate vor der mikroskopischen Untersuchung erhitzt werden, um die Färbung der Hyphen zu verbessern. Bei der Bengalrosa-Färbung entfällt diese Erhitzung. Jedoch muss nach EGGESTEIN (1997) bei der Karyopsenfärbung vor der mikroskopischen Untersuchung die Aleuronschicht der einzelnen zu untersuchenden Karyopsen mit Hilfe eines Binokulars entfernt werden, um ein klares mikroskopisches Bild zu erhalten.

Das von DAPPRICH (1996) entwickelte Färbeverfahren nutzt Fluoresceindiacetat (FDA) als Färbesubstanz. Die acetonische FDA-Lösung dringt in die Zellen des Präparates ein. Dort wird

Fluoresceindiacetat durch enzymatische Hydrolyse in Fluorescein und Acetat gespalten. Fluorescein selber kann die intakten Zellwände nicht durchdringen und es kommt somit zu einer Anhäufung von Fluorescein in den lebenden Zellen. Bei Bestrahlung mit UV-Auflicht (Breitband-Anregung und Sperrfilter mit Transmission oberhalb von 470 nm) fluoresziert das Fluorescein und die lebenden Zellen, insbesondere die Pilzhyphen, treten strahlend grün hervor (STEWART & DEACON, 1995). Ein Vorteil dieser Methode gegenüber den zuvor beschriebenen Totalfärbungen ist, dass mit der FDA-Färbung Aussagen über die Vitalität getroffen werden können. Nur wenn der Pilz vital ist, kommt es zur enzymatischen Spaltung des Fluoresceindiacetat in den Zellzwischenräumen des Pflanzengewebes. Der Material- und Zeitaufwand dieser Methode ist mit denen der zuvor beschriebenen Totalfärbungen vergleichbar. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass diese Methode nur in den Blattscheiden zuverlässig arbeitet. In den Karyopsen kann der Pilz nicht immer nachgewiesen werden (DAPPRICH, 1996). Obwohl die Karyopsen mit vitalem Pilz *Neotyphodium* besiedelt waren, kam es nicht zu einer Fluoreszenz der Pilzhyphen. Es ist denkbar, dass der Pilz in der Karyopse in einem starken Ruhezustand ist, bei dem auch die Aktivität der Enzyme stark eingeschränkt ist. Fluoresceindiacetat kann somit nicht gespalten werden.

Der ELISA-Test stellt eine relativ neue und möglicherweise auch artspezifische Möglichkeit zum Nachweis der *Neotyphodium* spp. dar (JOHNSON et al., 1982; 1983; WELTY et al., 1986). Grundlage dieser Methode sind Antigen-Antikörper Reaktionen. Die Antigenmoleküle werden mit einem Enzym markiert. Es entsteht ein kompetitiv am Antikörper bindendes Enzym-Analyt-Konjugat. Die Antikörpermoleküle sind an der Gefäßwand eines Reagenzröhrchens oder auf einer Mikrotiter-Platte durch einfache Adsorption an der Oberfläche immobilisiert. Nach dem Einfüllen der Probelösung kommt es zu einer konkurrierenden Reaktion des Antigens aus der Probelösung und des enzymmarkierten Antigens mit dem Antikörper. In einem folgenden Waschschrift wird die Lösung entfernt. Nun wird ein Substrat zugegeben, so dass mit dem enzymmarkierten Antigen-Antikörper-Komplex eine enzymatische Reaktion abläuft, die kinetisch-photometrisch ausgewertet werden kann. Durch Vergleich mit einer Kontrolle kann somit eine Aussage über eine mögliche Mycelkonzentration in den Karyopsen oder Pflanzengewebe getroffen werden. Ein Nachteil dieser Methode ist die teure und aufwendige Etablierung des Verfahrens. Zudem ist dieses Verfahren ungeeignet bei der Bestimmung von geringen Besiedlungsraten. Nach WELTY et al. (1986) liegt die Grenze der Genauigkeit bei ca. 10 %.

Das Prinzip des TPIB-Test (GWINN et al., 1991) ist ähnlich wie beim zuvor beschriebenen ELISA-Test. Hier werden die Antigenmoleküle jedoch auf einer Membran (TransBlot transfer medium) immobilisiert. Die ein Millimeter dicken Bestockungstriebe bzw. angeritzten oder die in Wasser aufgeweichten Karyopsen werden dann auf diese Membran gepresst. Nach dem Trocknen der Membran werden enzymgebundene Antikörper zugegeben. Zugabe eines Substrates führt zu einer Farbreaktion an den Stellen, wo sich die speziellen Antigene befinden. Somit kann die Besiedlung des Pflanzengewebes mit dem Pilz *Neotyphodium* nachgewiesen werden. Wie beim ELISA-Test ist auch hier die Etablierung des Verfahrens teuer und zeitaufwendig. Die Ungenauigkeiten der TPIB-Methode schwanken nach GWINN et al. (1991) zwischen 0 und 60 %. Ein molekularbiologisches Verfahren, die polymerase chain reaction (PCR), wurde von DOSS & WELTY (1995) zum Nachweis von *Neotyphodium* spp. im Pflanzengewebe verwendet. Bei diesem Verfahren werden mittels der PCR spezielle DNA-Sequenzen, die einwandfrei dem Pilz *Neotyphodium* spp. zugeordnet werden können, hochvermehrt. Hierzu wird die DNA-Mischung, die zuvor aus dem Pflanzengewebe gewonnen wurde, mit speziellen Primern versetzt und durchläuft mehrere PCR-Zyklen. Danach wird das DNA-Gemisch mit Hilfe der Gelelektrophorese nach Größe, Gewicht und Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt. Das Vorhandensein einer bestimmten Bande oder eines bestimmten Bandenmusters deutet auf das Vorhandensein des *Neotyphodium*-Pilzes hin. Über die Intensität dieser Bande ist eine Quantifizierung des *Neotyphodium*-Pilzes denkbar. Das Aufwinden des richtigen Primers macht dieses Verfahren in der Etablierung sehr teuer und zeitaufwendig. Weiter muss durch aufwendige Versuche

ausgeschlossen werden, dass die benutzte Bande eindeutig vom zu untersuchenden *Neotyphodium*-Pilz generiert wird. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist die sehr hohe Empfindlichkeit des Verfahrens. So gelang DOSS & WELTY (1995) der Nachweis einer *Neotyphodium*-Besiedlung in zwei verschiedenen Genotypen, die zuvor mit anderen Methoden als *neotyphodium*-frei klassifiziert wurden. Im Saatgut dieser Genotypen wurden geringe Mengen Ergovalin nachgewiesen, was ohne eine *Neotyphodium*-Besiedlung nicht erklärbar war. Weiter wird bei diesen Verfahren nur eine sehr geringe Menge an Probenmaterial verwendet.

Die zeitaufwendigste und sicherlich nicht für Serienarbeiten geeignete Nachweismethode ist die direkte Isolierung der *Neotyphodium*-Pilze aus Saatgut oder Pflanzenteilen auf synthetischen Nährmedien *in vitro* (NEIL, 1941; LATCH et al., 1984). Mit diesem arbeitsaufwendigen Verfahren kann die Vitalität der *Neotyphodium*-Pilze nachgewiesen werden. Nur wenn der Pilz vital ist, wächst er aus der Pflanze aus. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die Möglichkeit der Artbestimmung anhand der Morphologie der auswachsenden Pilze (LATCH et al., 1982).

2. Problemstellung

Wie in der Einleitung zuvor beschrieben wird in den USA, Neuseeland und Australien seit Ende der 70er Jahre der Forschungsbereich der *Neotyphodium*-Pilze intensiv bearbeitet. Ziel der dortigen Endophytenforschung ist es, die negativen Effekte der *Neotyphodium*/Gras Symbiose auszuschalten und sich die positiven Effekte zu Nutze zu machen. Wie das „3rd International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium“ in Athens, USA im Jahr 1997 zeigte, beschäftigt sich die aktuelle Endophytenforschung in Übersee vor allem mit dem Einfluss einer *Neotyphodium*-Besiedlung auf den Stoffwechsel des Graswirtes. Ziel dieser Forschungen ist es, durch Manipulation von *Neotyphodium*-Pilzen spezifische *Neotyphodium*-Elitestämme zu erzeugen, um diese dann zur Züchtung von verbesserten Grassorten mit gewünschten Merkmalen (Schadinsektenresistenz, Dürretoleranz etc.) zu verwenden.

Obwohl nach SIEGEL et al. (1987) der Ursprung der *Neotyphodium*-Pilze in Europa liegt, ist in Europa, insbesondere in Deutschland nur wenig über die Auswirkungen der *Neotyphodium*/Gras Symbiose unter den hier herrschenden Bedingungen bekannt. Die europäische Endophytenforschung befasst sich unter anderem mit dem Vorkommen der *Neotyphodium*-Pilze und der Bedeutung der Auswirkungen der *Neotyphodium*/Gras Interaktion. Aus fast allen Ländern Europas liegen Arbeiten zum Vorkommen der *Neotyphodium*-Pilze in europäischen Sorten und Ökotypen vor (OLDENBURG, 1994; BAERT et al., 1994; DAPPRICH, 1996; GRAND-RAVEL, 1997; LEWIS et al., 1997). Bezüglich der Weidetierkrankungen „ryegrass staggers“ und „fescue toxicosis“ liegen nur vereinzelte Berichte aus Europa vor, in denen vom Auftreten der Erkrankungen in Großbritannien, Frankreich, den Niederlanden und Deutschland berichtet wird (LEWIS & CLEMENTS, 1986; RAYNAL, 1991; FINK-GREMMELS & BLOM, 1993; DAPPRICH, 1996). Auch über die Bildung der Alkaloide, die bei der Symbiose zwischen *Neotyphodium* spp. und deren Wirtsgräsern gebildet werden, ist nur wenig bekannt unter den in Europa herrschenden Klimabedingungen. OLDENBURG (1996) fand bei ihren Untersuchungen nur geringe Lolitrem B-Gehalte, die weit unterhalb der toxischen Dosis lagen. JUSTUS et al. (1997) fanden bei ihren Untersuchungen Lolin-Gehalte, die mit denen in Übersee vergleichbar sind. Für die Ergotalkaloide und das Alkaloid Peramin liegen zur Zeit noch keine europäischen Untersuchungen vor. Erste Untersuchungen zu den Auswirkungen der *Neotyphodium*/Gras Interaktion auf Schadinsekten sowie Phytopathogenen wurden von SCHMIDT (1994) sowie von LEWIS et al. (1986) durchgeführt.

Vor diesen Hintergrund beinhaltet die vorliegende Arbeit detaillierte Untersuchungen zu den Auswirkungen der *Neotyphodium*/Gras Interaktion unter den klimatischen Bedingungen in Deutschland. Da *L. perenne* eines der bedeutendsten Gräser in Deutschland (KLEY, 1997) ist, wurden die Untersuchungen auf die Symbiose zwischen *N. lolii* und *L. perenne* beschränkt. Es wurden folgende Schwerpunkte bearbeitet:

- Erfassung des Vorkommens von *N. lolii* in Sorten und Ökotypen von *L. perenne*.
- Untersuchungen zum Einfluss der *Neotyphodium*-Besiedlung auf die Pflanzenentwicklung und Ertragsbildung von *L. perenne*.
- *In vivo*-Untersuchungen zum Auftreten des Alkaloids Lolitrem B zur Klärung der Frage, ob unter den in Deutschland herrschenden Umweltbedingungen die Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ auftreten kann.
- *In vivo*-Untersuchungen zu möglichen Parametern (Temperatur, Düngung, Jahreszeit, Schnitthäufigkeit, Sorte), die einen Einfluss auf den Lolitrem B-Gehalt in der Pflanze haben.

- Untersuchungen zur Verteilung von Lolitrem B innerhalb der Pflanze.
- *In vitro*-Untersuchungen zur Bildung der Alkaloide Lolitrem B und Paxillin in *N. lolii*-Isolaten. Ein Ziel der *in vitro*-Untersuchungen ist es, bestimmte *N. lolii*-Isolate zu finden, die nur geringe Mengen Lolitrem B produzieren. Weiter sollen die *in vitro*-Untersuchungen mit den *in vivo*-Untersuchungen verglichen werden.
- Untersuchung von möglichen neuen innovativen Nachweismethoden von *Neotyphodium* im Saatgut.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendeter Nachweis der *Neotyphodium*-Pilze in Karyopsen und Blattscheiden von *L. perenne*

Wie in Kapitel 1.6 beschrieben stehen zum Nachweis der *Neotyphodium*-Pilze in den Karyopsen und Pflanzenmaterial unterschiedlichste Methoden zur Verfügung. Zum Nachweis des Pilzes in den Karyopsen wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Anilinblau-Färbung verwendet. Ausschlaggebend hierfür war die deutlichere Hervorhebung des Pilzmycels bei der mikroskopischen Untersuchung gegenüber der Bengalrosa-Färbung. Denn bei der Bengalrosa-Färbung ist die farbliche Hervorhebung der Pilzhyphen in den Karyopsen oft zu schwach (HIGNIGHT et al., 1993) und eine, wie von EGGESTEIN (1997) praktizierte, Entfernung der Aleuronschicht mittels Binokular zu zeitintensiv. Die serologischen Nachweismethoden (ELISA, TPIB) fanden aufgrund ihrer zu großen Ungenauigkeit und zeit- und kostenintensiven Etablierung keine Anwendung. Erst ab einer Besiedlungsrate von 10 % wären mit diesen Verfahren gesicherte Ergebnisse möglich (WELTY et al., 1986; GWINN et al., 1991). Auf die Anwendung des molekularbiologischen PCR-Verfahrens wurde aufgrund der zeit- und kostenintensiven Etablierung verzichtet.

In leicht modifizierter Form wurde zum Nachweis der *Neotyphodium*-Pilze in den Karyopsen die Vorgehensweise nach WELTY et al. (1986) verwendet. Hierzu wurden aus der zu untersuchenden Saatgutprobe 200 bis 250 (ca. 0,5 g) Karyopsen randomisiert entnommen und über Nacht, mindestens 15 Stunden, bei Raumtemperatur in 15 bis 20 ml 5 %iger, wässriger Natronlauge, welche 0,1 % (w/v) Anilinblau enthält, gequollen. Nach einminütigen, gründlichen Spülen der Samen unter fließendem Leitungswasser wurde das Saatgut mit 15 bis 20 ml der Färbelösung (1:1:1:5; v/v Milchsäure 85 %ig : Phenol : Glycerin : Wasser), welche 0,1 % Anilinblau enthält, versetzt und für 12 bis 20 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach erneutem Spülen mit Leitungswasser wurden je untersuchter Saatgutprobe 100 Karyopsen als Quetschpräparate mit einem Durchlichtmikroskop bei 160- bis 400-facher Vergrößerung untersucht oder in Leitungswasser zur späteren Untersuchung aufbewahrt.

Zum Nachweis der *Neotyphodium*-Pilze in Blattscheiden wurde auf die von DAPPRICH (1996) entwickelte FDA-Färbung zurückgegriffen. Mit dieser Methode wurden sowohl Jungpflanzen als auch adulte Pflanzen auf die Vitalität des Pilzes *Neotyphodium* untersucht. Hierzu wurde ein möglichst dünner Teil der inneren Epidermis einer Blattscheide am adaxialen Teil eines Bestockungstriebs wie bei NEIL (1940) beschrieben abpräpariert. Die so präparierten Blattscheiden wurden mit der adaxialen Seite nach unten in einen Tropfen der Gebrauchslösung (siehe Tab. 6) gelegt und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach zwei Minuten Reaktionszeit wurden die präparierten Epidermisteile mit einem UV-Auflichtmikroskop (Breitband - Violett - Anregung und Sperrfilter mit Transmission oberhalb 470 nm) bei einer 160- bis 400-fachen Vergrößerung untersucht.

Tab. 6: Zusammensetzung der Lösung zur unspezifischen Vitalfärbung von *Neotyphodium* spp. mit Fluoresceindiaceat (FDA) in Blattscheiden von Gräsern

	Zusammensetzung
Stammlösung	0,5 % (w/v) Fluoresceindiaceat (FDA) in Aceton
Gebrauchslösung*	100 µl Stammlösung 3 ml Aceton 10 ml Wasser (kalt!)

* vor jedem Gebrauch frisch ansetzen

3.2. Isolierung von *Neotyphodium* spp. aus Blattscheiden

Eine wichtige Methode zur Identifizierung und somit auch zur Artunterscheidung der einzelnen *Neotyphodium* spp. ist die direkte Isolierung des Pilzes aus Karyopsen oder Blattscheiden der mit *Neotyphodium*-Pilzen besiedelten Pflanzen. Aufbauend auf den Arbeiten von BACON et al. (1977) wurden in der hier vorliegenden Arbeit die *Neotyphodium*-Pilze aus den Bestockungstrieben der *neotyphodium*-besiedelten Pflanzen wie folgt isoliert:

Die unteren, 3 bis 4 cm langen, Teile der Bestockungstriebe wurden vom Schmutz und abgestorbenen Pflanzenteilen befreit. Diese Triebstücke wurden dann oberflächendesinfiziert. Hierzu wurden die Triebstücke für 30 Sekunden in 70 %igen, wässrigen Isopropanol und anschließend für 10 Minuten in 10 %iger, wässriger Natriumhypochlorid-Lösung getaucht. Nach dem Spülen in sterilen Wasser wurden die Triebstücke in 5 mm lange Stücke zerteilt. Diese 5 mm langen Triebstücke wurden dann zu je 10 Stück in Petrischalen (Durchmesser 90 mm; Höhe 15 mm) mit PDA+-Medium (siehe Tab. 7) ausgelegt. Die ausgebliebenen Enden der Triebstücke wurden hierfür nicht verwendet. Die Explanate wurden leicht in die Oberfläche eingedrückt, die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und bei 22 °C im Dunkeln inkubiert. Infektionen schnell wachsender Pilze wurden sofort entfernt. Die auswachsenden *Neotyphodium*-Pilze wurden unter sterilen Bedingungen ausgeschnitten und mit der Oberseite nach unten auf das neue Nährmedium gelegt. Als Kulturmedium zur Isolierung und Identifizierung der *Neotyphodium*-Pilze wurden die in Tab. 7 aufgeführten Medien verwendet.

Tab. 7: Zusammensetzung und Verwendungszweck der Nährmedien zur *in vitro*-Kultur der *Neotyphodium* spp.

Nährmedium	Zusammensetzung	Verwendungszweck
PDA+	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Liter demineralisiertes Wasser • 39 g potato dextrose agar (Fa. Merck) • 100 mg Streptomycinsulfat (Sigma Chemical Co.) • 100 mg Chloramphenicol (Sigma Chemical Co.) 	Isolierung
PDA	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Liter demineralisiertes Wasser • 39 g potato dextrose agrar (Fa. Merck) 	Isolierung, Erhaltung
PDBA	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Liter demineralisiertes Wasser • 24 g potato dextrose broth (DIFCO Laboratories) • 10 g Agar (Aldrich Chemical Company) 	Erhaltung
CMA	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Liter demineralisiertes Wasser • 17 g corn meal agar (DIFCO Laboratories) 	Sporulation, Dauerkultur

3.3. Erfassung des Vorkommens von *N. lolii* in Sorten und Ökotypen von *L. perenne*

3.3.1. Herkunft der untersuchten Sorten

Im Zeitraum von Oktober 1996 bis zum Januar 1997 wurden alle 84 *L. perenne*-Sorten der Beschreibenden Sortenliste Gräser, Klee, Luzerne (1995) auf den Pilz *N. lolii* untersucht. Saatgut dieser Futtergras-Sorten wurde im September 1996 von den jeweiligen Zuchtfirmen erbeten, so dass von frisch geernteten Material ausgegangen werden kann.

Darüber hinaus wurden 36 holländische *L. perenne*-Sorten auf den Pilz *N. lolii* untersucht. Von diesen Sorten gelangten auch Proben von verschiedenen Saatgutpartien zur Analyse. Es wurden insgesamt 81 verschiedene Saatgutpartien dieser holländischen *L. perenne*-Sorten analysiert.

Zum Nachweis des Pilzes *N. lolii* wurde die in Kapitel 3.1 beschriebene Anilinblau-Färbung verwendet. Pro Sorte wurden 100 Karyopsen untersucht. Der prozentuale Anteil der *neotyphodium*-besiedelten Karyopsen ergab die *Neotyphodium*-Besiedlungsrate.

3.3.2. Herkunft der untersuchten Ökotypen

Hauptschwerpunkt bei den Untersuchungen der Ökotypen war eine rumänische Ökotypensammlung. Im Sommer 1993 wurden von Mitarbeitern der Deutschen Saatveredelung (DSV), Lippstadt in Rumänien ca. 450 Ökotypen aus vier größeren Regionen gesammelt (siehe Abb. 21).

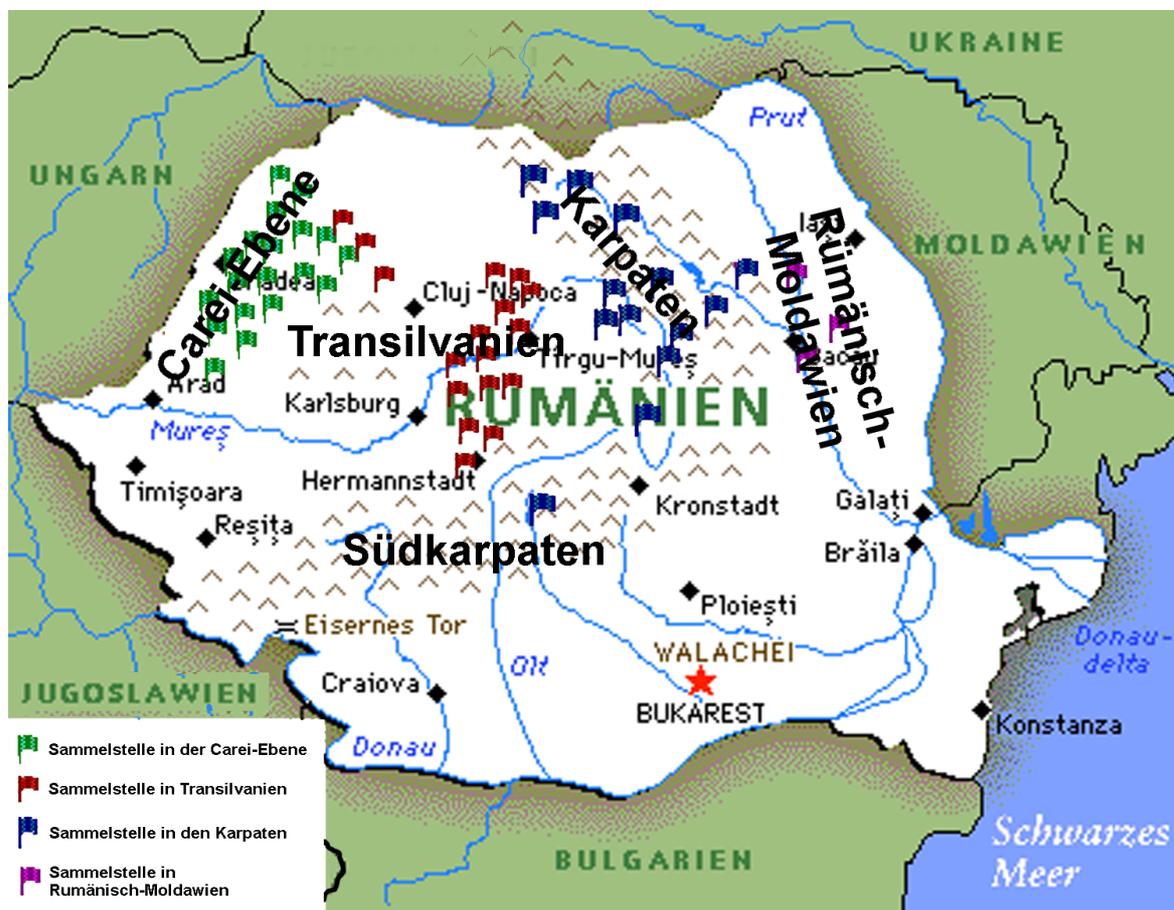


Abb. 21: Herkünfte der 53 Populationen der *Lolium perenne*-Ökotypen aus Rumänien

Die Carei-Ebene ist das nordwestliche rumänische Flachland und geht in die ungarische Pußta über. Transilvanien liegt im nördlichen Zentralrumänien und liegt 200 bis 300 Meter über den Meeresspiegel. Die Karpaten sind gebirgig und liegen 700 und 1400 Meter hoch. Rumänisch Moldawien ist wiederum eine Flachlandregion im Osten Rumäniens mit sehr eisigen Wintern.

Nach dem Transfer nach Deutschland wurden Pflanzenausstiche dieser Ökotypen bei der DSV Asendorf ins Freiland gepflanzt und im Sommer 1994 beerntet. Das erhaltene Saatgut wurde sofort aufbereitet und wurde seitdem in einem entfeuchteten (rel. Luftfeuchte ca. 30 %) und zum Teil klimatisierten Raum gelagert. Von diesen Saatgutproben wurden in Absprache mit Herrn Dr. Feuerstein (DSV Asendorf) 53 repräsentative Saatgutproben auf eine mögliche Besiedlung mit *N. lolii* in den Karyopsen analysiert. Pro Probe wurden wiederum 100 Karyopsen mit Hilfe der Anilinblau-Färbung untersucht. Der prozentuale Anteil der *neotyphodium*-besiedelten Karyopsen ergab die *Neotyphodium*-Besiedlungsrate.

Zur Überprüfung der Vitalität der *Neotyphodium*-Pilze wurden pro *neotyphodium*-besiedelte Probe die Blattscheiden von jeweils 100 Keimpflanzen im 3-4 Blattstadium mit der FDA-Färbung (siehe Kapitel 3.1) überprüft. Hierzu wurden Sämlinge in einer Klimakammer bei 17/12 °C (Tag/Nacht) und 12 h Kunstlicht angezogen. Die weitere Kultivierung erfolgte unter teilkontrollierten Bedingungen im Gewächshaus in 73er Multitopfplatten.

3.4. Einfluss der *Neotyphodium*-Besiedlung auf die Pflanzenentwicklung und Ertragsbildung von *L. perenne*

Zur Untersuchung des Einflusses der *Neotyphodium*-Besiedlung auf die generative und vegetative Leistungsfähigkeit von *L. perenne*-Sorten wurden im Zeitraum von 1996-1998 auf dem Versuchsgut Merklingsen des Fachbereiches Agrarwirtschaft der Universität-GH Paderborn zwei verschiedene Feldversuche angelegt.

Der Versuchsstandort Merklingsen in der Soester Börde ist durch ein langjähriges Temperatur- und Niederschlagsmittel (Standort Bad Sassendorf) von 9,0 °C bzw. 722 mm gekennzeichnet. Am Versuchsstandort dominieren folgende Bodenverhältnisse.

Bodenart: sandiger Lehm (sL)
Bodentyp: Pseudogley-Parabraunerde entstanden aus Lößablagerungen
Bonität: 67 Bodenpunkte
Höhe NN: 100 m

Da bisher in Deutschland nur wenige Untersuchungen zur Problematik der Symbioseeffekte der *Neotyphodium*/Gras-Interaktion erfolgten, stand bei diesen Feldversuchen folgende Frage im Mittelpunkt:

Können auch unter den in Deutschland herrschenden Klimabedingungen die positiven (z. B. höhere Frischmassenproduktion) als auch die negativen Effekte (hohe Lolitrem B-Gehalte) der *Neotyphodium*-Besiedlung auf die Pflanzenentwicklung beobachtet werden?

3.4.1. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998

Die Aussaat am 04.09.1996 fiel in eine Zeitspanne mit guter Wasserversorgung. In den ersten vier Wochen nach der Aussaat wurde eine Niederschlagsmenge von 76 mm gemessen. Die neuseeländische *L. perenne*-Sorte Yatsyn wurde in einem lateinischen Rechteck in fünffacher Wiederholung sowohl als *neotyphodium*-besiedelte und als *neotyphodium*-freie Variante angebaut. Die *Neotyphodium*-Besiedlung betrug in der *neotyphodium*-besiedelten Variante 98 %, in der *neotyphodium*-freien Variante 3 %. Neben dieser Prüfung des Trockenmasse-Ertrages wurde die *neotyphodium*-besiedelte Sorte Yatsyn in fünffacher Wiederholung in zwei verschiedenen Düngungsvarianten angebaut. Die Düngungsvarianten waren wie folgt:

Düngungsstufe höhere Intensität		Düngungsstufe niedrigere Intensität	
14.03.1997	120 kg N/ha	14.03.1997	60 kg N/ha
03.06.1997	80 kg N/ha	03.06.1997	40 kg N/ha
23.07.1997	60 kg N/ha	23.07.1997	30 kg N/ha
gesamt Jahr 1997:	260 kg N/ha		130 kg N/ha
27.03.1998	120 kg N/ha	27.03.1998	60 kg N/ha
09.06.1998	60 kg N/ha	09.06.1998	30 kg N/ha
05.08.1998	60 kg N/ha	05.08.1998	30 kg N/ha
gesamt Jahr 1998:	240 kg N/ha		120 kg N/ha

Die Aussaatmenge betrug 25 kg/ha, die Parzellengröße betrug 14,8 m². Am 15.10.1996 wurde der Feldaufgang, d. h. die Pflanzenzahl/m² ermittelt. Weiter wurden im Untersuchungszeitraum von zwei Jahren insgesamt sechs Schnitte durchgeführt. Im Jahr 1997 erfolgten die Schnitte am 26.05.1997, 17.07.1997 und am 17.10.1997. Im zweiten Nutzungsjahr 1998 erfolgten die Schnitte am 28.05.1998, 03.08.1998 und am 15.10.1998.

3.4.2. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998

Am 10.09.1997 wurde eine Versuchsanlage mit drei verschiedenen Düngungsstufen sowie den *neotyphodium*-besiedelten und *neotyphodium*-freien Varianten der *L. perenne*-Sorten Embassy, Nui und Yatsyn angelegt. Die *Neotyphodium*-Besiedlung der *neotyphodium*-besiedelten Sorte Embassy war 72 %, Nui hatte eine *Neotyphodium*-Besiedlung von 78 % und Yatsyn von 83 %. In den *neotyphodium*-freien Vergleichsvarianten betrugen die *Neotyphodium*-Besiedlungsraten für Embassy 2 %, für Nui 0 % und für Yatsyn 0 %. Weiter wurden folgende Düngungsvarianten verwendet:

Düngungsvariante I (150 kg N/ha Jahr)

02.04.1998	30 kg N/ha
17.06.1998	30 kg N/ha
08.07.1998	30 kg N/ha
04.08.1998	30 kg N/ha
08.09.1998	30 kg N/ha
gesamt:	150 kg N/ha Jahr

Düngungsvariante II (300 kg N/ha Jahr)

02.04.1998	60 kg N/ha
17.06.1998	60 kg N/ha
08.07.1998	60 kg N/ha
04.08.1998	60 kg N/ha
08.09.1998	60 kg N/ha
gesamt:	300 kg N/ha Jahr

Düngungsvariante III (450 kg N/ha Jahr)

02.04.1998	90 kg N/ha
17.06.1998	90 kg N/ha
08.07.1998	90 kg N/ha
04.08.1998	90 kg N/ha
08.09.1998	90 kg N/ha
gesamt:	450 kg N/ha Jahr

Die Prüflieder wurden in vierfacher Wiederholung in einem lateinischen Rechteck angebaut, wobei die Aussaatmenge 25 kg/ha betrug. Die Parzellengröße war 14,8 m².

Im Jahr 1998 erfolgten insgesamt 5 Schnitte (28.05.1998, 07.07.1998, 03.08.1998, 04.09.1998 und 15.10.1998).

3.5. Untersuchungen zum Vorkommen des Alkaloids Lolitrem B *in vivo*

3.5.1. Analyse von Lolitrem B mit der HPLC mit Fluoreszenzdetektion

Wie in Kapitel 1.5.2 beschrieben, ist das wichtigste Alkaloid, welches bei der Symbiose zwischen *N. lolii* und *L. perenne* gebildet wird, Lolitrem B. Lolitrem B wurde mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Fluoreszenzdetektion bestimmt. Es wurde ein HPLC-System der Fa. Merck (Pumpe L 6200A, Fluoreszenzdetektor F 1080F, Autosampler AS 4000A) mit einer LiChrosorb Si 60 Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Fa. Merck) verwendet. Die chromatographischen Bedingungen waren die gleichen wie bei GALLAGHER et al. (1985) beschrieben (Flussrate = 1 ml/min; Eluent: Dichlormethan:Acetonitril 80:20). Die Extinktionswellenlänge wurde auf 268 nm und die Emissionswellenlänge auf 440 nm eingestellt. Lolitrem B wurde über die Retentionszeit identifiziert und über eine externe Standardkurve über die Peakhöhe quantifiziert. Die Analysen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Als Untersuchungsmaterialien dienten bei den *in vivo*-Untersuchungen Saatgutproben und gefriergetrocknete Proben der Frischmasse. Die Probenvorbereitung war bei den einzelnen Materialien wie folgt:

Frischmasseproben

Die zumeist gefriergetrockneten Proben der Frischmasse wurden mit einer Brabender-Hammermühle (Sieb d = 1 mm) vermahlen. 1 g des gemahlene Grases wurden mit 20 ml Chloroform/Methanol (2:1) für eine Stunde auf einem Orbital-Schüttler (120 U/min) geschüttelt. Danach wurden die Proben für 5 Minuten stehengelassen, damit das Pflanzenmaterial

sedimentiert. 2 ml des Überstandes wurden in ein Reagenzglas überführt und bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde wieder in 1 ml Dichlormethan/Acetonitril (80:20) aufgenommen und der Lolitrem B-Analyse zugeführt. Auf eine Festphasenextraktion konnte bei den Frischmasseproben verzichtet werden. Der Lösungsmittelwechsel ist jedoch erforderlich, da Lolitrem B in Methanol keine Fluoreszenz zeigt.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden mit Hilfe des Eichkurvenverfahrens (nach dem DFG-Konzept, FREHSE & THIER, 1991) in Zusatzversuchen bestimmt. Für die Analyse des Lolitrem B-Gehaltes in gefriergetrockneten Frischmasseproben ergab sich eine Nachweisgrenze von 7,6 µg/kg TM. Die Bestimmungsgrenze betrug 11,4 µg/kg TM.

Saatgutproben

Das Saatgut wurde mit einer Brabender-Hammermühle (Sieb $d = 1$ mm) vermahlen. 1 g gemahlene Saatgut wurde mit 20 ml Chlorform/Methanol (2:1) für 1 h auf einem Orbital-Schüttler (120 U/min) geschüttelt. Danach wurde die Probe für 5 Minuten stehengelassen, damit das Pflanzenmaterial sedimentiert. 2 ml des Überstandes wurden in ein Reagenzglas überführt und bis zur Trockne eingedampft. Zur weiteren Aufarbeitung wurde dann die Festphasenextraktion verwendet.

Zuerst wurden die LiChrolut Si 60-Extraktionssäulchen (Fa. Merck) mit 5 ml Dichlormethan konditioniert. Der Rückstand des abgedampften Grasextraktes wurde in 2 ml Dichlormethan gelöst und mit einem Vortex-Mixer gut gelöst. Daraufhin wurde die Probe auf die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde verworfen. Nachdem die Säule mit 5 ml Dichlormethan und 0,5 ml Dichlormethan/Acetonitril (80:20) gewaschen wurde, wurde der Analyt mit 3 ml Dichlormethan/Acetonitril (80:20) eluiert. Nachdem das Eluat bis zur Trockne eingedampft wurde, wurde es wieder in 1 ml Dichlormethan/Acetonitril (80:20) aufgenommen und der Lolitrem B-Analyse zugeführt.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden mit Hilfe des Eichkurvenverfahrens (nach dem DFG-Konzept, FREHSE & THIER, 1991) in Zusatzversuchen bestimmt. Für die Analyse des Lolitrem B-Gehaltes in Saatgutproben ergab sich eine Nachweisgrenze von 8,3 µg/kg TM. Die Bestimmungsgrenze betrug 12,3 µg/kg TM.

3.5.2. Screening von Pflanzenmaterial der rumänischen Ökotypen auf das Alkaloid Lolitrem B

Bei der Untersuchung von Saatgutproben der rumänischen Ökotypen auf das Alkaloid Lolitrem B (siehe Kapitel 4.9.1) stellte sich heraus, dass es Proben gab, in denen das Alkaloid Lolitrem B trotz einer 100 %igen Besiedlung mit dem Pilz *N. lolii* nicht nachweisbar war. Dieses stützte die Hypothese, dass es *N. lolii*-Stämme gibt, die wenig oder gar kein Lolitrem B produzieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zum einen Freilandproben sowie auch Gewächshausproben dieser rumänischen Ökotypen auf das Alkaloid Lolitrem B untersucht.

Freilandproben aller 24 *neotyphodium*-besiedelten rumänischen Ökotypen wurden im Oktober 1996 von der DSV Asendorf zur Verfügung gestellt. Diese Proben wurden bei 65 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend wie auf Seite 42 beschrieben aufgearbeitet.

Daneben wurden aus dem Saatgut von 22 *neotyphodium*-besiedelten rumänischen Ökotypen (von Rö 191 und Rö 410 lagen keine *neotyphodium*-besiedelten Pflanzen vor) jeweils 10 *neotyphodium*-besiedelte Pflanzen (Überprüfung mit der FDA-Methode) herangezogen und im Gewächshaus unter teilkontrollierten Bedingungen kultiviert. Abb. 46 im Anhang zeigt den

Temperaturverlauf während der Kultur. An acht verschiedenen Terminen im Jahr 1997 wurde die Biomasse dieser Pflanzen beerntet (Mischprobe aus 10 Einzelpflanzen je Ökotyp). Die erhaltenen Frischmasseproben wurden gefriergetrocknet und nach der auf Seite 42 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Zum Vergleich wurden drei *L. perenne*-Sorten (Yatsyn, Repell USA und Campania) mit in diese Untersuchungen einbezogen.

3.5.3. Untersuchungen von Frischmasseproben aus Freilandversuchen auf das Alkaloid Lolitrem B

3.5.3.1. Freilandversuch mit *L. perenne* an den Standorten Soest und Asendorf von 1994 bis 1996

Im Jahr 1994 wurde an den Standorten Soest (Versuchsgut Merklingsen der Universität-GH Paderborn) und Asendorf (DSV, Hof Steimke) die *L. perenne*-Sorte Ellett (Herkunft Neuseeland) als *neotyphodium*-positive und *neotyphodium*-negative Variante in vierfacher Wiederholung angebaut. Von den Schnitten der beiden Nutzungsjahre 1995 und 1996 wurden repräsentative Proben auf das Alkaloid Lolitrem B untersucht. Am Standort Asendorf wurden in den beiden Nutzungsjahren insgesamt fünf Schnitte (15.05.1995; 29.06.1995; 23.08.1995 und 31.05.1996; 22.07.1996). Am Standort Soest wurden im Nutzungsjahr 1995 zwei Schnitte (16.05.1995; 12.07.1995) und im Nutzungsjahr 1996 drei Schnitte (31.05.1996; 09.08.1996, 03.10.1996) durchgeführt.

Am Standort Soest wurden die frisch geernteten Frischmasseproben zerkleinert und gefriergetrocknet. Am Standort Asendorf wurden die Frischmasseproben bei 65 °C 48 Stunden getrocknet. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte wie auf Seite 42 beschrieben.

3.5.3.2. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998

Bei den jeweiligen Schnitten (siehe Kapitel 3.4.1) wurde von allen Parzellen eine ca. 300 g schwere, repräsentative Frischmasseprobe genommen. Diese Proben wurden eingefroren und nach der Gefriertrocknung wie auf Seite 42 beschrieben aufgearbeitet und der Lolitrem B-Analyse unterzogen. Insgesamt wurden bei diesem Versuch bei der Trockenmasse-Ertragsprüfung 120 Proben und beim Teilversuch mit den unterschiedlichen Düngungsstufen weitere 60 Proben auf das Alkaloid Lolitrem B untersucht.

3.5.3.3. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998

Bei den jeweiligen Schnitten (siehe Kapitel 3.4.2) wurde von allen Parzellen eine ca. 300 g schwere, repräsentative Frischmasseprobe genommen. Diese Proben wurden eingefroren und nach der Gefriertrocknung wie auf Seite 42 beschrieben aufgearbeitet und der Lolitrem B-Analyse unterzogen. Insgesamt wurden bei diesem Versuch 360 Proben auf das Alkaloid Lolitrem B untersucht.

3.6. Lolitrem B-Gehalt einzelner Individuen innerhalb einer *L. perenne*-Sorte bzw. -Population und Bestimmung des Stichprobenumfanges

Ziel dieser Untersuchungen war es, zu überprüfen, inwieweit der Lolitrem B-Gehalt innerhalb einer Sorte bzw. Population bei den einzelnen Individuen variiert. Gleichzeitig sollte mit diesen Untersuchungen abgeschätzt werden, wie groß der Stichprobenumfang (Anzahl der Pflanzen) für die weiterführenden Untersuchungen sein muss.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden adulte Pflanzen der *L. perenne*-Sorten Kerdion und Campania sowie der rumänischen Ökotypen Rö 198 und Rö 382 verwendet. Vor Beginn des Versuches wurden die Pflanzen auf 1 cm zurückgeschnitten. Es wurden pro Sorte/Ökotyp jeweils 15 mit *N. lolii* besiedelte Pflanzen verwendet. Nach einer vierwöchigen Kultur im Gewächshaus (11.07.1997 bis 12.08.1997) wurden die Pflanzen einzeln beerntet und die entsprechend aufgearbeiteten Frischmasseproben der Lolitrem B-Analyse unterzogen.

3.7. Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt in *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Pflanzen

Wichtigste Fragestellung dieser Untersuchungen war es, inwieweit die Temperatur einen Einfluss auf die Bildung von Lolitrem B in der Pflanze besitzt. Des weiteren sollte ein Testsystem entwickelt werden, mit dem das Gefährdungspotential von *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Sorten, welches vom Alkaloid Lolitrem B ausgeht, abgeschätzt werden kann.

3.7.1. Orientierender Vorversuch zum Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt

In diesem orientierenden Vorversuch wurden acht verschiedene *L. perenne*-Sorten bzw. -Ökotypen unter drei unterschiedlichen Kulturbedingungen kultiviert.

Tab. 8: Kulturbedingungen der *L. perenne*-Versuchspflanzen

	Kulturvariante 1	Kulturvariante 2	Kulturvariante 3
Ort	Klimakammer	Klimakammer	Gewächshaus
Temperatur	17 °C/10 °C (13 h Tag/ 11 h Nacht)	27 °C/19 °C (13 h Tag/ 11 h Nacht)	Gewächshaus (siehe Abb. 46)
Beleuchtung	13 h 2700-3000 Lux	13 h 2700-3000 Lux	Tageslicht
rel. Luftfeuchte	ca. 60 %	ca. 60 %	ca. 45 %
Düngung	60 kg N/ha nach jedem Schnitt	60 kg N/ha nach jedem Schnitt	60 kg N/ha nach jedem Schnitt

Es wurden folgende *L. perenne*-Sorten und Ökotypen verwendet: Sorte Yatsyn (NZ), Sorte Kerdion (NL), Sorte Campania (NL), die Sorte 82/83 (D) und die rumänischen Ökotypen Rö 52, Rö 119, Rö 169 und Rö 176

Alle verwendeten Pflanzen wurden vor Versuchsbeginn mit der FDA-Methode auf *N. lolii* untersucht. Für den Versuch wurden nur *neotyphodium*-besiedelte Pflanzen verwendet. Vor

Versuchsbeginn wurden die Pflanzen in 10 cm x 10 cm große Töpfe mit Einheitserde gepflanzt. Nach einwöchiger Kultur im Gewächshaus wurden die Pflanzen auf ca. 2 cm zurückgeschnitten. Daraufhin wurden pro Prüfglied jeweils fünf Pflanzen auf die Klimakammern und das Gewächshaus verteilt. Bei diesem Versuch wurden insgesamt drei Schnitte (13.06.1997, 11.07.1997 und 12.08.1997) durchgeführt. Vom jeweiligen Schnitt wurde pro Sorte/Ökotyp eine Mischprobe der fünf Pflanzen auf Lolitrem B analysiert.

3.7.2. Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt sowie der Verteilung von Lolitrem B innerhalb der Pflanze

Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt wurden die drei neuseeländischen *L. perenne*-Sorten Yatsyn, Embassy und Nui verwendet. Die Sorte Yatsyn war dabei mit 83 %, Embassy mit 72 % und Nui mit 78 % mit dem Pilz *N. lolii* besiedelt. Aufgrund dieser Besiedlungsraten wurde ein Stichprobenumfang von 25 Pflanzen pro Wiederholung ausgewählt. Es wurden vier Wiederholungen durchgeführt. Beim Versuch wurden zwei verschiedene Temperaturvarianten verwendet:

Tab. 9: Kulturbedingungen der *L. perenne*-Versuchspflanzen

	Temperaturvariante 1	Temperaturvariante 2
Ort	Klimakammer	Klimakammer
Temperatur	17 °C/10 °C (13 h Tag/ 11 h Nacht)	27 °C/19 °C (13 h Tag/ 11 h Nacht)
Beleuchtung	13 h 2700-3000 Lux	13 h 2700-3000 Lux
rel. Luftfeuchte	ca. 60 %	ca. 60 %

Nach einer achtwöchigen Kultur im Gewächshaus wurden die Pflanzen auf ca. 1 cm zurückgeschnitten und in die Klimakammern gestellt. Nach weiteren vier Wochen wurden die Pflanzen beerntet. Dabei wurden die Pflanzen in drei Sektionen, die Wurzelsektion, die Blattscheidensektion (1-5 cm) und die Blattspreitensektion (5-x cm), geteilt. Die erhaltenen Proben wurden gefriergetrocknet und nach dem Vermahlen der Lolitrem B-Analyse unterzogen.

3.8. Untersuchungen zum Vorkommen der Alkaloide Lolitrem B und Paxillin *in vitro*

Ein wichtiges Ziel der Endophytenforschung ist das Auffinden von spezifischen *Neotyphodium*-Isolaten mit bestimmten gewünschten Eigenschaften. Die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen der rumänischen Ökotypen (siehe Kapitel 4.4) deuten daraufhin, dass es *N. lolii*-Stämme gibt, die nur wenig oder gar kein Lolitrem B produzieren. Deshalb wurde in einem nächsten konsequenten Arbeitsschritt an verschiedenen *N. lolii*-Stämmen überprüft, ob die hier in dieser Arbeit verwendeten *N. lolii*-Pilze in der Lage sind, auf entsprechenden Nährmedien *in vitro* den Naturstoff Lolitrem B zu bilden. Daneben wurden die Isolate noch auf Paxillin analysiert. Denn über mehrere Zwischenstufen (siehe Abb. 12) wird aus Paxillin Lolitrem B gebildet. Paxillin ist eine wichtige Zwischenstufe in der Biosynthese von Lolitrem B.

Insgesamt wurden 36 Pilzisolaten auf die Lolitrem B- und Paxillin-Produktion *in vitro* getestet, davon waren 18 Isolate der rumänischen Ökotypen, 16 weitere *N. lolii*-Isolate verschiedener *L. perenne*-Sorten und Ökotypen sowie je ein Isolat der Pilze *Acremonium strictum* und *Penicillium paxilli*. Pro Isolat wurden fünf Wiederholungen durchgeführt.

Aufbauend auf Arbeiten von PENN et al. (1993) wurde die Kultur und Probenvorbereitung wie folgt durchgeführt:

Die untersuchten *N. lolii*-Isolate wurden aus der im Labor für Biotechnologie und Qualitätssicherung vorhandenen Stammsammlung entnommen. Die Isolate wurden auf GPYE-Agar Medium umgesetzt und acht Wochen im Dunkeln bei ca. 21 °C kultiviert. Zur Beimpfung der Kulturen wurden jeweils Inokulate (nach vorheriger Kultivierung auf PDA) definierter Größe (zwei Mycelstücke á 0,6 cm Durchmesser) verwendet (Petrischale d = 9 cm, 20 ml Nährmedium). Das verwendete GPYE-Medium enthielt pro Liter Wasser: 40 g Glucose, 10 g Sojabohnenpepton, 5 g Hefeextrakt und 15 g Agar.

Nach achtwöchiger Kultur wurden die Platten, Mycel und Agar gefriergetrocknet und durch Vermahlen mit einer Mikro-Feinmühle-Culatti bei einer Siebgröße von 1 mm aufgeschlossen. Das erhaltene Mycel/Agar-Gemisch wurde dann mit 10 ml Chloroform / Methanol (2:1) für eine Stunde auf dem Orbital-Schüttler (120 U/min) extrahiert. 2 ml Überstand wurden in ein Reagenzglas überführt und bis zur Trockne eingedampft. Darauf folgte die auf Seite 43 beschriebene Festphasenextraktion. Der Rückstand des Eluates wurde dann in 1 ml Dichlormethan/ Acetonitril (80:20) aufgenommen, und der Lolitrem B- bzw. der Paxillin-Analyse zugeführt.

Die Lolitrem B-Analyse erfolgte wie auf Seite 42 beschrieben.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden mit Hilfe des Eichkurvenverfahrens (nach dem DFG-Konzept, FREHSE & THIER, 1991) in Zusatzversuchen bestimmt. Für die Analyse des Lolitrem B-Gehaltes in Pilzisolaten wurde eine Nachweisgrenze von 6,4 ng/Agarplatte bestimmt. Die Bestimmungsgrenze betrug 10,2 ng/Agarplatte.

Bei der Paxillin-Analyse wurden die gleichen chromatographischen Bedingungen verwendet, wie bei der Lolitrem B-Analyse. Jedoch wurde hier die Dioden-array-Detektion verwendet (DAD-Detektor, L 4500A der Fa. Merck). Auch Paxillin wurde über die Retentionszeit identifiziert und über eine externe Standardkurve über die Peakhöhe quantifiziert. Die Paxillin-Analysen erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden mit Hilfe des Eichkurvenverfahrens (nach dem DFG-Konzept, FREHSE & THIER, 1991) in Zusatzversuchen bestimmt. Für die Analyse des Paxillin-Gehaltes in Pilzisolaten wurde eine Nachweisgrenze von 0,6 µg/Agarplatte bestimmt. Die Bestimmungsgrenze betrug 1,1 µg/Agarplatte.

3.9. Mögliche neue innovative Verfahren zum Nachweis von *Neotyphodium* in Karyopsen

3.9.1. Zusammenhang zwischen Lolitrem B-Gehalt und *Neotyphodium*-Besiedlung in Karyopsen unterschiedlicher Sorten und Ökotypen von *L. perenne*

Es ist denkbar, den *Neotyphodium*-Pilz indirekt über die gebildeten Sekundärmetabolite nachzuweisen. Das Vorhandensein des Indolditerpens Lolitrem B in den Karyopsen deutet auf die Anwesenheit des Pilzes *N. lolii* hin. Bei diesen Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen der *N. lolii*-Besiedlungsrate und dem Lolitrem B-Gehalt in den Karyopsen besteht.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die Karyopsen von 22 *L. perenne*-Sorten und der 53 rumänischen Ökotypen auf den Lolitrem B-Gehalt und die *N. lolii*-Besiedlung (Anilinblau-Färbung) untersucht. Die *N. lolii*-Besiedlung der 53 rumänischen Ökotypen war bekannt (siehe Kapitel 4.1.2). Zur Bestimmung der *N. lolii*-Besiedlung in den 22 *L. perenne*-Sorten wurde die Anilinblau-Färbung verwendet, pro Sorte wurden 100 Karyopsen untersucht. Die Aufarbeitung

und Lolitrem B-Analyse der Karyopsenproben erfolgte nach der auf Seite 43 beschriebenen Methode.

3.9.2. Einsatz der NIR-Spektroskopie zur Bestimmung der *Neotyphodium*-Besiedlung in *L. perenne*

In den letzten Jahren findet die NIR-Spektroskopie immer größere Anwendung im Bereich der quantitativen Analyse von komplex zusammengesetzten Substanzgemischen. Der Wellenlängenbereich der NIR-Spektroskopie ist der nahe Infrarot (IR)-Spektralbereich mit Wellenlängen zwischen 100 und 2500 nm. In diesen kurzwelligen IR-Spektralbereich fallen die Ober- und Kombinationsschwingungen der Moleküle. Die Intensitäten der NIR-Absorptionsbanden sind 10 bis 100 mal geringer als die Absorptionsbanden der MIR-Spektroskopie. Die geringe Intensität der NIR-Banden wird apparatetechnisch durch längere optische Weglängen ausgeglichen. Dadurch ist die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Messungen wesentlich größer als im MIR-Bereich. Große Vorteile der NIR-Spektroskopie sind hierbei eine zerstörungsfreie meist ohne Probenvorbereitung verlaufende Analyse.

Es wäre denkbar, dass die NIR-Technologie auch zur Bestimmung der *Neotyphodium*-Besiedlung in Gräsern eingesetzt werden könnte. Durch die Besiedlung des Grassamens mit dem *Neotyphodium*-Pilz besitzt der Grassamen gegenüber den unbesiedelten Grassamen eine andere Substanzzusammensetzung. Diese veränderte Zusammensetzung könnte sich in den NIR-Spektren niederschlagen und somit zur Identifizierung des Pilzes herangezogen werden.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde bei 18 Saatgutproben verschiedener *L. perenne*-Sorten mit Hilfe der Anilinblau-Färbung die *Neotyphodium*-Besiedlung bestimmt. Hierzu wurden pro Sorte 100 Karyopsen mikroskopisch untersucht (siehe Kapitel 3.1).

Daneben wurden die gleichen Saatgutpartien mit einem NIR-Spektrometer InfrAlyzer 500 der Fa. Bran+Luebbe vermessen. Diese Messungen wurden von Frau Dipl. Ing. D. Timm der Fa. Bran+Luebbe durchgeführt. Es wurden insgesamt zwei verschiedene Messreihen durchgeführt. Bei der ersten Messreihe wurde auf eine Probenvorbereitung vollständig verzichtet. In der zweiten Messreihe wurden die Proben vor der Messung mit einer Mikro-Feinmühle-Culatti und einer Siebgröße von 1 mm vermahlen. Von jeder Probe wurden zwei NIR-Spektren im Spektralbereich von 1000 bis 2500 nm aufgenommen. Die Messungen wurden in der diffusen Reflexion durchgeführt. Für eine Messung wurden ca. 50 g Grassamen benötigt.

Neben dem Versuch über eine Probekalibrierung mit 18 Proben zum gewünschten Ziel zu gelangen, wurden Proben der Sorte Yatsyn mit einer hohen und keiner *Neotyphodium*-Besiedlung vermessen. Diese Messungen wurden von Herrn R. Winzen des NIR/IR-Supports der Universität Essen durchgeführt. Die besiedelte Variante der Sorte Yatsyn hatte eine Besiedlungsrate von 83 %, die Vergleichsvariante hatte eine *Neotyphodium*-Besiedlung von 0 %. Die Proben wurden mit einem Gerät der Fa. Foss mit der „Coarse Grain Cell“ gemessen. Dabei wird eine sehr große Fläche bzw. ein sehr großes Probenvolumen abgescant. Die Messungen wurden in der diffusen Reflexion durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Vorkommen von *N. lolii* in Sorten und Ökotypen von *L. perenne*

Beim Nachweis von *N. lolii* mit Anilinblau erscheinen die Pilzhyphen als dunkelblaue, nur spärlich verzweigte Fäden zwischen den blockartigen Zellen der Aleuronschicht (Abb. 22). Teilweise erscheint der Pilz auch als dichte Mycelmatte zwischen der Aleuronschicht und der Samenschale.

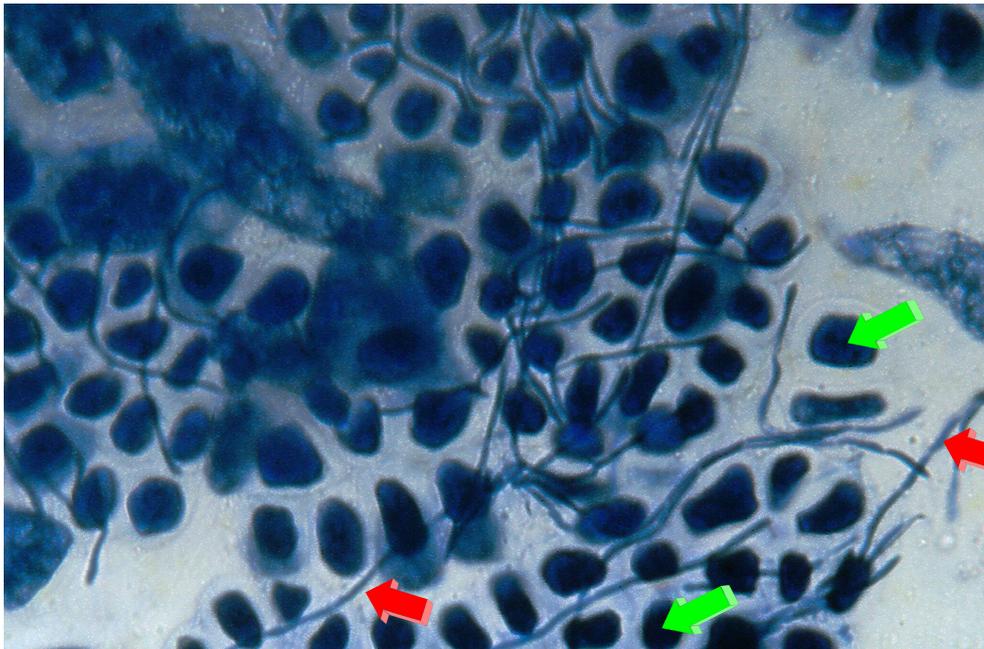


Abb. 22: Hyphen (rote Pfeile) von *Neotyphodium lolii* zwischen den Aleuronzellen (grüne Pfeile) einer Karyopse von *Lolium perenne* nach Färbung mit Anilinblau (mikroskopische Aufnahme bei 160-facher Vergrößerung)

4.1.1. Vorkommen von *N. lolii* in Sorten

In 10 der 84 untersuchten *L. perenne*-Sorten der Beschreibenden Sortenliste Gräser, Klee, Luzerne (1995) wurde der Pilz *N. lolii* nachgewiesen. In Abb. 23 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Besiedlungsrate variierte zwischen 2 und 15 %. Dabei waren sieben Sorten zwischen 1 und 5 %, zwei Sorten zu 8 bzw. 9 %, eine Sorte war zu 15 % besiedelt. Abb. 24 zeigt die *Neotyphodium*-Besiedlung der *L. perenne*-Sorten in Abhängigkeit von der Herkunft. Es lässt sich feststellen, dass 15 % der niederländischen (sechs von 39), 11 % der deutschen (drei von 28) und 6 % der dänischen Sorten (eine von 17) mit dem Pilz *Neotyphodium* besiedelt waren.

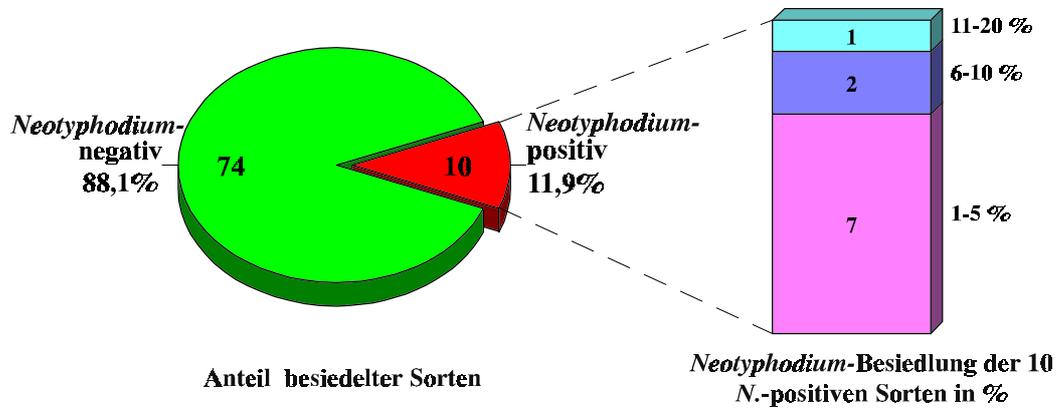


Abb. 23: *Neotyphodium*-Besiedlung im Saatgut der 84 *Lolium perenne*-Futtergras-Sorten der Beschreibenden Sortenliste Gräser, Klee, Luzerne (1995)

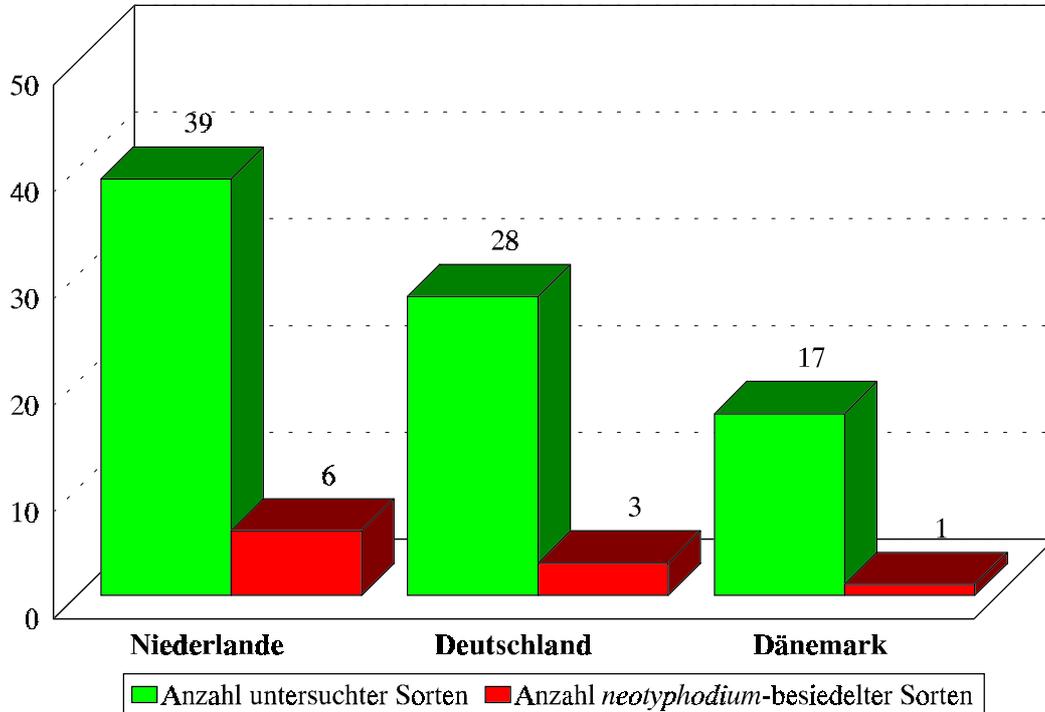


Abb. 24: Herkunft der untersuchten *Lolium perenne*-Sorten der Beschreibenden Sortenliste Gräser, Klee, Luzerne (1995)

Von den 36 untersuchten holländischen *L. perenne*-Sorten waren 16 (44%) mit dem Pilz *N. lolii* besiedelt. Bei sieben *L. perenne*-Sorten lag die *N. lolii*-Besiedlung unterhalb von 20 %. In fünf *L. perenne*-Sorten wurde eine *N. lolii*-Besiedlung zwischen 21 und 40 % festgestellt. Die *L. perenne*-Sorte mit der Codierung lp35-R wies eine *N. lolii*-Besiedlung von 43 % auf; die Sorte lp5-R hatte eine *N. lolii*-Besiedlung von 74 %. Die *L. perenne*-Sorten lp1-R mit 93 % und lp13-F mit 90 % hatten eine *N. lolii*-Besiedlung die zwischen 81 und 100 % lag. In der Abb. 25 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

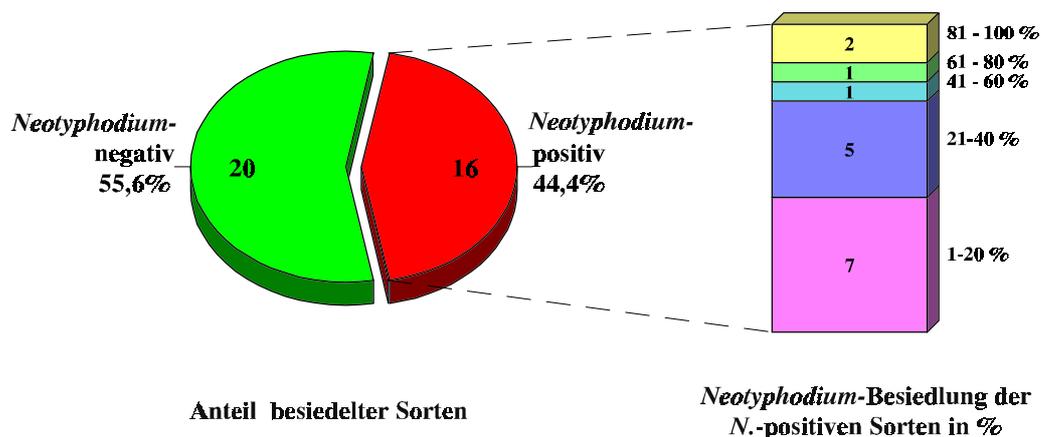


Abb. 25: Neotyphodium-Besiedlung im Saatgut von 36 holländischen *Lolium perenne*-Sorten in 1997/1998

In der Tab. 10 sind die *Neotyphodium*-Besiedlungen von den 16 *neotyphodium*-besiedelten holländischen *L. perenne*-Sorten zusammengefasst. Die detaillierte Analyse der *L. perenne*-Sorten lp29-F und lp21-F zeigten eine geringe Variabilität in der *Neotyphodium*-Besiedlung. Bei der Sorte lp29-F variierte die *Neotyphodium*-Besiedlung von 14 % bis hin zu 22 % bei verschiedenen Saatgutpartien mit unterschiedlichen Vermehrungsorten. Die verschiedenen Saatgutpartien der Sorte lp21-F zeigten eine *Neotyphodium*-Besiedlung von 31 % bis zu 39 %.

Tab. 10: Variabilität der *Neotyphodium*-Besiedlung in % von 16 holländischen *Lolium perenne*-Sorten

<i>L. perenne</i> -Sorte	Saatgutpartie	<i>N. lolii</i> -Besiedlung in %
lp29-F	lp29-1-F	16
	lp29-2-F	19
	lp29-3-F	22
	lp29-4-F	20
	lp29-5-F	16
	lp29-6-F	14
	lp29-7-F	14
	lp29-8-F	15
lp21-F	lp21-1-F	36
	lp21-2-F	39
	lp21-3-F	32
	lp21-4-F	37
	lp21-5-F	38
	lp21-6-F	34
	lp21-7-F	31
lp32-F	lp32-1-F	5
	lp32-2-F	8
	lp32-3-F	9
lp1-R	lp1-1-R	92
	lp1-2-R	94
lp5-R	lp5-1-R	75
	lp5-2-R	72
lp6-R	lp6-1-R	34
	lp6-2-R	36
lp9-F	lp9-1-F	12
	lp9-2-F	10
lp12-F	lp12-1-F	27
	lp12-2-F	34
lp23-R	lp23-1-R	3
	lp23-2-R	5
lp26-F	lp26-1-F	2
	lp26-2-F	0
lp34-F	lp34-1-F	0
	lp34-2-F	1
lp11-R	lp11-1-R	31
lp13-F	lp13-1-F	90
lp16-R	lp16-1-R	31
lp17-R	lp17-1-R	6
lp35-R	lp35-1-R	43

4.1.2. Vorkommen von *N. lolii* in Ökotypen

Bei den Saatgutproben der rumänischen Ökotypensammlung wurden in 24 der 53 untersuchten Proben (45 %) die Pilzhyphen von *Neotyphodium* nachgewiesen. In 17 Proben war die Besiedlungsrate größer als 81 % (siebenmal 100 %). Bei zwei Proben lag die Besiedlungsrate bei 56 bzw. 73 %. Bei den anderen fünf Proben lagen die Besiedlungsraten unterhalb von 20 %. In Abb. 26 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

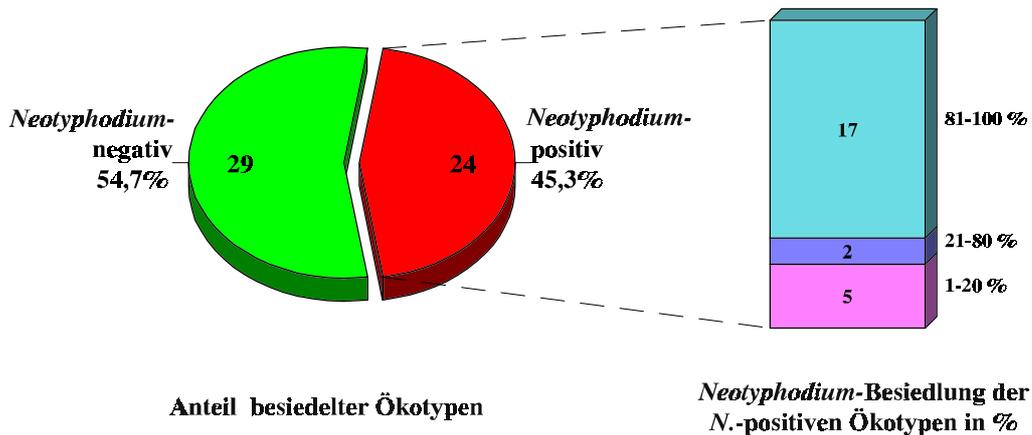


Abb. 26: *Neotyphodium*-Besiedlung im Saatgut von 53 rumänischen Ökotypen von *Lolium perenne* des Erntejahres 1994

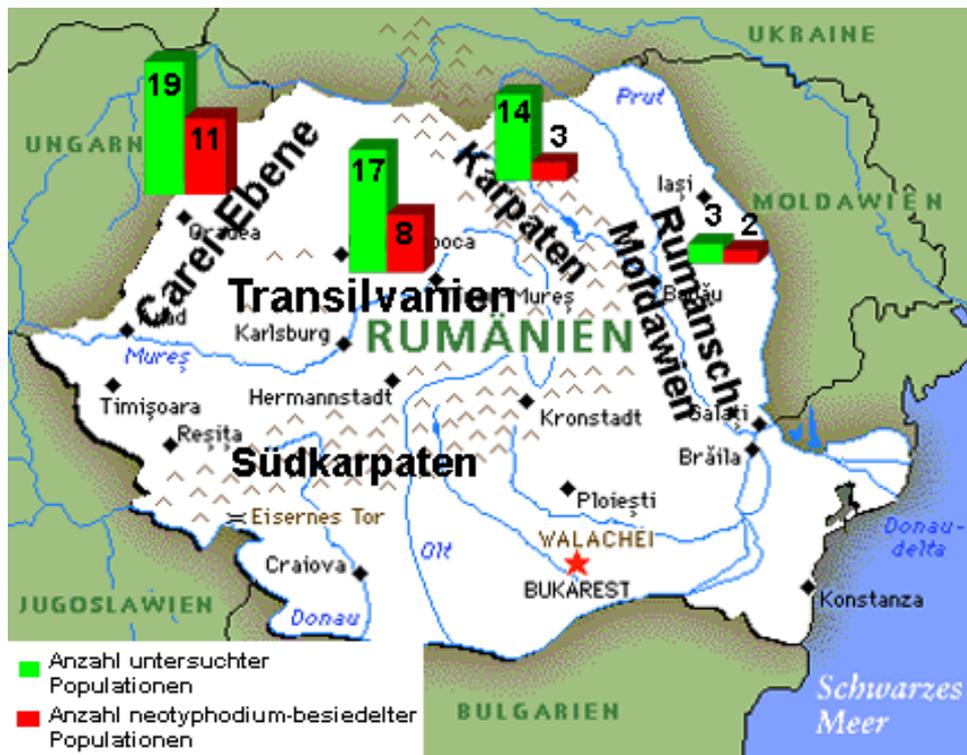


Abb. 27: Anzahl *neotyphodium*-besiedelter Proben in Abhängigkeit der Sammelregion der *Lolium perenne*-Ökotypen aus Rumänien

19 Proben der untersuchten rumänischen Populationen kamen ursprünglich aus der Carei-Ebene. Von diesen 19 Proben waren 11 mit dem Pilz *N. lolii* besiedelt. Die durchschnittliche Besiedlungsrate der besiedelten Proben der Carei Ebene betrug 80 %. Von den 17 Proben der Sammelregion Transilvanien waren acht Proben mit dem Pilz *N. lolii* besiedelt. Hier betrug die durchschnittliche Besiedlungsrate aller besiedelten Proben 66 %. Drei Proben der 14 aus der Sammelregion Karpaten stammenden Proben waren mit dem Pilz *N. lolii* besiedelt. Die durchschnittliche Besiedlungsrate aller besiedelten Proben der Sammelregion Karpaten betrug 70 %. Bei der Sammelregion Rumänisch Moldawien waren zwei von drei Proben mit dem Pilz *N. lolii* besiedelt. Die durchschnittliche Besiedlungsrate aller besiedelten Proben dieser Sammelregion war 94 %.

Vitalitätsüberprüfung

Nach dem Anfärben mit FDA erscheinen die Pilzhyphen von *Neotyphodium* in den Blattscheiden als gelbgrüne, fluoreszierende Fäden (Abb. 28 Bild links).

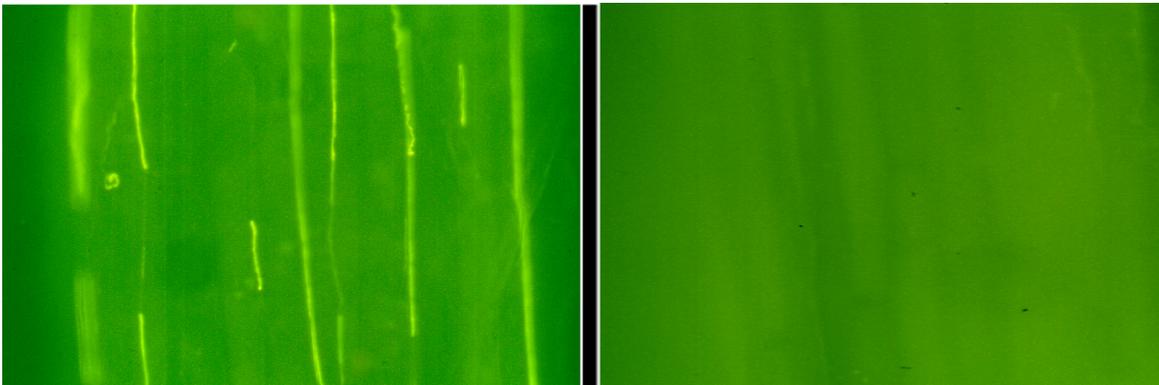


Abb. 28: Bild links: Fluoreszierendes Mycel von *Neotyphodium lolii* zwischen den adaxialen Epidermiszellen aus den basalen Bereich einer *Lolium perenne*-Blattscheide nach der FDA-Färbung; Bild rechts: unbesiedelter basaler Bereich einer *L. perenne* Pflanze nach der FDA-Färbung

Von allen *neotyphodium*-besiedelten rumänischen Ökotypen wurden Keimpflanzen auf *Neotyphodium* untersucht. In Tab. 11 sind die Ergebnisse denen der Anilinblau-Färbung gegenübergestellt.

Tab. 11: *Neotyphodium lolii*-Besiedlung in % in den Karyopsen rumänischer Ökotypen (Erntejahr 1994) und in Keimpflanzen, die aus diesen Karyopsen (nach vorheriger zweijähriger Lagerung) herangezogen wurden

Ökotyp Nr.	<i>N. lolii</i> -Besiedlungsrate in %		
	von Karyopsen der Saatguternte (Sommer 1994) ^a	von Keimpflanzen ^b	Rückgang / Zunahme (abs.)
29	83	74	-9
41	100	95	-5
47	16	15	-1
52	100	100	0
57	98	86	-12
61	3	7	+4
74	97	91	-6
83	97	94	-3
96	100	97	-3
119	100	100	0
134	90	91	+1
169	56	54	-2
170	85	66	-19
176	73	67	-6
191	15	0	-15
198	94	92	-2
203	89	72	-17
223	98	91	-7
281	100	79	-21
283	5	4	-1
382	100	96	-4
410	12	0	-12
422	95	88	-7
452	100	98	-2
durchschnittliche <i>N. lolii</i> -Besiedlung aller Proben	75	69	

^a = 100 Karyopsen pro Probe mit der Anilinblau-Färbung

^b = FDA-Färbung in Keimpflanzen, die aus Karyopsen der Ernte 1994 angezogen wurden; 100 Keimpflanzen (EC 12-16) pro Probe (Saatgut nach zweijähriger Lagerung, Ende 1996)

Bei der anschließenden Vitalitätsüberprüfung mit der FDA-Methode an Keimpflanzen wurde bei den Saatgutproben der 24 besiedelten Populationen eine durchschnittliche Besiedlungsrate von 69 % festgestellt. Dieses heißt, dass relativ 92 % der *N. lolii*-Besiedlung des Ausgangsmaterials vital waren, und somit 8 % der Ausgangsbesiedlung abgestorben waren.

Bei der Betrachtung der Besiedlungsraten der einzelnen Proben war zu erkennen, dass in keiner der 24 besiedelten Populationen die *N. lolii*-Besiedlung nach der zweijährigen Lagerungsphase um mehr als 22 % zurückgegangen war. In zwei Proben, Rö 119 und Rö 52, war kein Rückgang der *N. lolii*-Besiedlung zu beobachten. Bei 14 Proben der 24 Populationen lag der Vitalitätsverlust zwischen 1 und 10 %. In sechs Proben lag der Vitalitätsverlust zwischen 11 und 21 %. Zwei Proben (Rö 191 und Rö 410) wiesen nach der Lagerung kein vitales *N. lolii*-Myzel mehr auf.

4.2. Identifizierung und Sammlung von *Neotyphodium*-Isolaten verschiedener Herkunft

Zur Identifizierung der *Neotyphodium*-Pilze wurden die Pilze wie in Kapitel 3.2 beschrieben aus den Blattscheiden der besiedelten Pflanzen isoliert. Nach etwa vier bis sechs Wochen wuchs das Mycel des *Neotyphodium*-Pilzes seitlich aus den Triebstücken heraus (siehe Abb. 29).



Abb. 29: Ausgewachsenes Mycel (rote Pfeile) von *Neotyphodium lolii* aus ca. 0,5 cm großen Sprossstücken von *Lolium perenne* Pflanzen auf PDA⁺-Medium nach vier- bis sechswöchiger Kultur im Dunkeln bei ca. 21 °C

Bei 22 der 24 *neotyphodium*-besiedelten rumänischen Ökotypen wurde der Pilz isoliert. Der *Neotyphodium*-Pilz der rumänischen Ökotypen Rö 191 und Rö 410 konnte nicht isoliert werden, da nach der Vitalitätsüberprüfung keine besiedelten Pflanzen vorhanden waren.

Durch Vergleich von morphologischen Merkmalen (Wachstumsgeschwindigkeit, Kolonieform und -farbe, Sporencharakteristika) mit denen der Erstbeschreiber (LATCH et al., 1984) wurden alle in der Tab. 12 angegebenen *Neotyphodium*-Pilze als *N. lolii* identifiziert.

Tab. 12: Isolationsdaten der als *Neotyphodium lolii* identifizierten Isolate der rumänischen Ökotypen

Isolat/Ökotyp	Isolationsdatum	Isolat/Ökotyp	Isolationsdatum
Rö 29	03.07.1997	Rö 169	18.11.1996
Rö 41	30.10.1996	Rö 170	09.07.1997
Rö 47	07.07.1997	Rö 176	30.10.1996
Rö 52	18.02.1997	Rö 198	28.07.1997
Rö 57	19.03.1997	Rö 203	09.07.1997
Rö 61	28.07.1997	Rö 223	15.07.1997
Rö 74	07.07.1997	Rö 281	14.03.1997
Rö 83	03.07.1997	Rö 283	19.03.1997
Rö 96	14.03.1997	Rö 382	27.02.1997
Rö 119	25.02.1997	Rö 422	27.02.1997
Rö 134	14.07.1997	Rö 452	21.02.1997

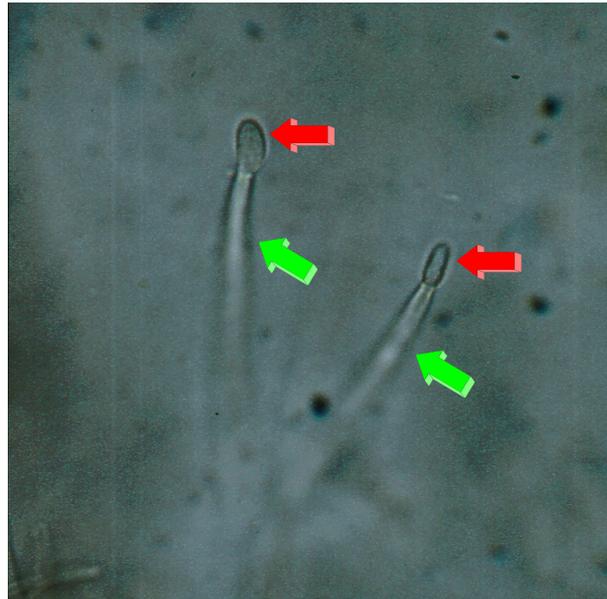


Abb. 30: Konidiosporen (rote Pfeile) und Phialiden (grüne Pfeile) von *Neotyphodium lolii* auf CMA-Medium (mikroskopische Aufnahme bei einer 400-fachen Vergrößerung) nach Kultivierung im Dunkeln bei 21 °C

4.3. Einfluss der *Neotyphodium*-Besiedlung auf die Ertragsbildung von *L. perenne*

4.3.1. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998

In der Tab. 13 sind die Ergebnisse des Feldaufgangs zusammengestellt.

Tab. 13: Feldaufgang in Ø Pflanzenzahl/m² der *Lolium perenne*-Sorte Yatsyn am Standort Merklingsen, fünf Wochen nach der Aussaat (15.10.1996)

Sorte	Variante	Wiederholung	Feldaufgang in Ø Pflanzenzahl/m ²	Mittelwert Feldaufgang in Ø Pflanzenzahl/m ²	GD _{Neo} (5%)	GD _{Neo} (1%)	GD _{Neo} (0,5 %)
					in Ø Pflanzenzahl/m ²		
Yatsyn	N ⁻	a	744	659	85	141	265
		b	685				
		c	681				
		d	629				
		e	555				
Yatsyn	N ⁺	a	680	664	85	141	265
		b	619				
		c	696				
		d	678				
		e	646				

Beim Feldaufgang wurde zwischen der *neotyphodium*-besiedelten und der *neotyphodium*-freien Vergleichsvarianten keine Differenzierung festgestellt.

Im Jahr 1997 wurden von den Parzellen dieses Versuches drei Schnitte geerntet. Mit Hilfe des Trockensubstanzgehaltes wurden die Trockenmasse-Erträge der drei Aufwüchse errechnet. Diese Trockenmasse-Erträge und der Gesamttrockenmasse-Ertrag des Jahres 1997 sind in der Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14: Trockenmasse-Erträge in dt/ha von drei Aufwüchsen und Gesamttrockenmasse-Ertrag der *Lolium perenne*-Sorte Yatsyn am Versuchsstandort Merklingsen in 1997

Prüfglied	Variante	Trockenmasse-Ertrag in dt/ha			
		1. Schnitt 26.05.1997	2. Schnitt 17.07.1997	3. Schnitt 17.10.1997	Gesamt 1997
Yatsyn	N ⁺	44,3**	29,9	15,8	90,0
Yatsyn	N ⁻	38,8	30,2	15,2	84,2
GD _{Neo} (5 %)		3,43			7,05
GD _{Neo} (1 %)		4,98			11,67
GD _{Neo} (0,1 %)		7,48			21,84
Yatsyn	N ⁺ 260 kg N/ha Jahr	47,2*	37,4*	26,6**	111,2*
Yatsyn	N ⁻ 130 kg N/ha Jahr	41,8	31,6	16,9	90,3
GD _{Düngung} (5 %)		5,19			12,91
GD _{Düngung} (1 %)		7,55			21,36
GD _{Düngung} (0,1 %)		11,32			39,98

* = signifikante Unterschiede p = 5-1 %

** = signifikante Unterschiede p = 1-0,1 %

*** = signifikante Unterschiede p < 0,1 %

Die höchsten Trockenmasse-Erträge wurden im Jahr 1997 im ersten Schnitt erreicht. Hier war der Trockenmasse-Ertrag der *neotyphodium*-besiedelten Variante mit 44,3 dt/ha signifikant (p=1 %) höher als bei der *neotyphodium*-freien Vergleichsvarianten (38,8 dt/ha). Bei den beiden nächsten Schnitten des gleichen Jahres wurde keine Differenzierung zwischen der *neotyphodium*-besiedelten und -freien Varianten festgestellt. Der Gesamttrockenmasse-Ertrag des Jahres 1997 lag für die *neotyphodium*-besiedelte Variante bei 90,0 dt/ha, für die *neotyphodium*-freie Variante bei 84,2 dt/ha.

Eine eindeutige Differenzierung zeigte sich im zweiten Teilversuch. Bei allen drei Schnitten und somit auch beim Gesamttrockenmasse-Ertrag des Jahres 1997 war die Variante mit der intensiveren Düngung (260 kg N/ha Jahr) der Vergleichsvarianten mit der niedrigeren Düngung (130 kg N/ha Jahr) signifikant überlegen. Der Gesamttrockenmasse-Ertrag 1997 für die Variante mit der höheren Düngung lag bei 111,2 dt/ha, der Gesamtertrag der Vergleichsvarianten bei 90,3 dt/ha.

Im Jahr 1998 wurden von den Parzellen wiederum drei Schnitte geerntet. Die Trockenmasse-Erträge der drei Aufwüchse sowie des Gesamttrockenmasse-Ertrages des Jahres 1998 sind in der Tab. 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Trockenmasse-Erträge in dt/ha von drei Aufwüchsen und Gesamttrockenmasse-Ertrag der Sorte Yatsyn am Versuchsstandort Merklingsen in 1998

Prüfglied	Variante	Trockenmasse-Ertrag in dt/ha			
		1. Schnitt 28.05.1998	2. Schnitt 03.08.1998	3. Schnitt 15.10.1998	Gesamt 1997
Yatsyn	N ⁺	41,3**	24,2	8,7	74,2
Yatsyn	N ⁻	35,9	25,4	7,6	68,9
GD _{Neo} (5 %)		2,68			7,31
GD _{Neo} (1 %)		3,90			12,09
GD _{Neo} (0,1 %)		5,85			22,63
Yatsyn	N ⁺ 240 kg N/ha Jahr	48,1***	35,6***	11,1	94,8*
Yatsyn	N ⁻ 120 kg N/ha Jahr	38,9	26,0	9,5	74,4
GD _{Düngung} (5 %)		3,98			17,17
GD _{Düngung} (1 %)		5,79			28,42
GD _{Düngung} (0,1 %)		8,69			53,19

* = signifikante Unterschiede p = 5-1 %

** = signifikante Unterschiede p = 1-0,1 %

*** = signifikante Unterschiede p < 0,1 %

Im zweiten Nutzungsjahr 1998 war der Trockenmasse-Ertrag des ersten Schnittes mit 41,3 dt/ha in der *neotyphodium*-besiedelten Variante gegenüber der *neotyphodium*-freien Variante (35,9 dt/ha) signifikant erhöht. Bei den anderen Schnitten als auch beim Gesamttrockenmasse-Ertrag des Jahres 1998 waren keine signifikanten Vorteile für die *neotyphodium*-besiedelte Variante erkennbar.

Beim Teilversuch mit den unterschiedlichen Düngungsintensitäten zeigte sich im Jahr 1998 bei den ersten beiden Schnitten die Ertragsüberlegenheit der düngungsintensiveren Variante (240 kg N/ha Jahr). Bei beiden Schnitten war der Trockenmasse-Ertrag der Variante mit der intensiveren Düngung gegenüber der Vergleichsvarianten mit der niedrigeren Düngung signifikant erhöht. Der Gesamttrockenmasse-Ertrag war mit 94,8 dt/ha bei der intensiveren Düngung signifikant höher als bei der Vergleichsvarianten (74,4 dt/ha) mit der niedrigeren Düngung.

4.3.2. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998

Im Jahr 1998 wurden von den Parzellen dieses Versuches fünf Schnitte geerntet. Mit Hilfe des Trockensubstanzgehaltes wurden die Trockenmasse-Erträge der fünf Aufwüchse errechnet. Diese Trockenmasse-Erträge und der Gesamttrockenmasse-Ertrag des Jahres 1998 sind in der Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16: Trockenmasse-Erträge in dt/ha von fünf Aufwüchsen und Gesamttrockenmasse-Erträge der *Lolium perenne*-Sorten Embassy, Nui und Yatsyn am Versuchsstandort Merklingsen in 1998

	Endophyt-status	Düngungs-variante ^a	Trockenmasse-Ertrag in dt/ha		
			Embassy	Nui	Yatsyn
1. Schnitt 28.05.1998	N ⁺	I	47,0	43,2	56,3**
	N ⁻	I	45,4	45,0	51,9
	N ⁺	II	50,7	53,1***	58,1*
	N ⁻	II	49,6	47,7	54,6
	N ⁺	III	52,9	53,8	60,3***
	N ⁻	III	50,4	52,6	54,2
2. Schnitt 07.07.1998	N ⁺	I	28,6	27,4	25,8
	N ⁻	I	27,0	26,5	26,1
	N ⁺	II	32,0	30,3	32,4
	N ⁻	II	29,7	29,3	32,5
	N ⁺	III	34,7	37,2*	35,7
	N ⁻	III	33,0	33,4	34,1
3. Schnitt 03.08.1998	N ⁺	I	18,3	18,4	18,2
	N ⁻	I	17,9	20,2	18,8
	N ⁺	II	21,5	22,1	20,9
	N ⁻	II	22,4	22,8	19,8
	N ⁺	III	23,6	23,7	24,0
	N ⁻	III	23,7	25,9	23,8
4. Schnitt 04.09.1998	N ⁺	I	6,2	6,3	6,1
	N ⁻	I	6,0	6,2	5,9
	N ⁺	II	7,8	8,4	8,5
	N ⁻	II	7,4	8,0	8,2
	N ⁺	III	9,9	10,1	9,3
	N ⁻	III	9,0	10,0	10,0
5. Schnitt 15.10.1998	N ⁺	I	8,4	8,3	7,6
	N ⁻	I	8,1	8,4	7,1
	N ⁺	II	11,2	12,6	11,6
	N ⁻	II	12,0	11,6	12,1
	N ⁺	III	13,7	14,6	13,5
	N ⁻	III	13,3	14,8	13,4
GD _{Neo} (5 %)			2,98		
GD _{Neo} (1 %)			3,99		
GD _{Neo} (0,1 %)			5,23		
Gesamt 1998	N ⁺	I	108,5	103,6	114,0
	N ⁻	I	104,4	106,3	109,8
	N ⁺	II	123,2	126,5	131,5
	N ⁻	II	121,1	119,4	127,2
	N ⁺	III	134,8	139,4	142,8
	N ⁻	III	129,4	136,7	135,5
GD _{Neo} (5 %)			8,83		
GD _{Neo} (1 %)			12,39		
GD _{Neo} (0,1 %)			17,49		

* = signifikante Unterschiede p = 5-1 %

** = signifikante Unterschiede p = 1-0,1 %

*** = signifikante Unterschiede p < 0,1 %

^aDüngungsvariante I = 150 kg N/ha Jahr, Düngungsvariante II = 300 kg N/ha Jahr, Düngungsvariante III = 450 kg N/ha Jahr

Im Jahr 1998 lag der durchschnittliche Trockenmasse-Ertrag pro Schnitt bei 24,6 dt/ha. Für die *neotyphodium*-besiedelten Varianten lag der durchschnittliche Trockenmasse-Ertrag pro Schnitt bei 25,0 dt/ha und war somit signifikant erhöht gegenüber dem durchschnittlichen Trockenmasse-Ertrag pro Schnitt der *neotyphodium*-freien Variante (24,18 dt/ha; $GD_{Neo} (0,1 \%) = 0,77$ dt/ha). Diese Differenzierung zwischen der *neotyphodium*-besiedelten und *neotyphodium*-freien Variante zeigte sich auch in den Schnitten. Beim ersten Schnitt war in vier von neun möglichen Fällen sowie in einem Fall beim zweiten Schnitt die *neotyphodium*-besiedelte Variante im Trockenmasse-Ertrag der *neotyphodium*-freien Variante signifikant überlegen. Bei den restlichen Schnitten wurde keine Differenzierung festgestellt.

Tab. 17: Trockenmasse-Erträge in dt/ha von fünf Aufwüchsen und Gesamttrockenmasse-Erträge der Sorten Embassy, Nui und Yatsyn am Versuchsstandort Merklingsen in 1998

	Düngungs- variante	Trockenmasse-Ertrag in dt/ha		
		Embassy	Nui	Yatsyn
1. Schnitt 28.05.1998	I	46,2 a	44,0 a	54,1 a
	II	50,1 b	50,4 b	56,3 b
	III	51,7 b	53,2 c	57,3 b
2. Schnitt 07.07.1998	I	27,8 a	27,1 a	26,0 a
	II	30,9 b	29,8 b	32,4 b
	III	33,9 c	35,3 c	34,9 c
3. Schnitt 03.08.1998	I	18,1 a	18,7 a	18,5 a
	II	22,0 b	22,5 b	20,4 b
	III	23,6 b	24,8 c	24,0 c
4. Schnitt 04.09.1998	I	6,1 a	6,2 a	6,0 a
	II	7,6 ab	8,2 ab	8,3 b
	III	9,5 b	10,0 b	9,7 b
5. Schnitt 15.10.1998	I	8,3 a	8,0 a	7,4 a
	II	11,6 b	12,2 b	11,8 b
	III	13,5 b	14,7 c	13,4 b
GD _{Düngung} (5 %)		2,11		
GD _{Düngung} (1 %)		2,82		
GD _{Düngung} (0,1 %)		3,70		
Gesamt 1998	I	106,5 a	104,0 a	112,0 a
	II	122,2 b	123,0 b	129,2 b
	III	132,2 c	138,0 c	139,3 c
GD _{Düngung} (5 %)		6,24		
GD _{Düngung} (1 %)		8,76		
GD _{Düngung} (0,1 %)		12,37		

a, b, c) Werte, die vom gleichen Buchstaben gefolgt werden, unterscheiden sich nicht signifikant
 Düngungsvariante I = 150 kg N/ha Jahr, Düngungsvariante II = 300 kg N/ha Jahr,
 Düngungsvariante III = 450 kg N/ha Jahr

Die durchschnittlichen Trockenmasse-Erträge der fünf Aufwüchse ungeachtet der *Neotyphodium*-Besiedlung sind in der Tab. 17 dargestellt. Zwischen den einzelnen Düngungsvarianten bestanden signifikante Unterschiede im Trockenmasse-Ertrag. Die Varianten mit der intensivsten Düngung wiesen auch die höchsten Trockenmasse-Erträge auf. Für die Düngungsvariante I betrug der durchschnittliche Trockenmasse-Ertrag pro Schnitt 21,5 dt/ha. Der durchschnittliche Trockenmasse-Ertrag der Düngungsvarianten II betrug 25,0 dt/ha, der durchschnittliche Trockenmasse-Ertrag der Düngungsvarianten III 27,3 dt/ha. Alle drei Trockenmasse-Erträge waren bei einer $GD_{\text{Düngung}} (0,1 \%) = 0,95$ dt/ha signifikant unterschiedlich. Auch innerhalb der einzelnen Sorten waren signifikante Unterschiede zu beobachten. Die Sorte Yatsyn hatte mit 25,4 dt/ha den höchsten durchschnittlichen Trockenmasse-Ertrag pro Schnitt. Dieser war signifikant unterschiedlich zu den durchschnittlichen Trockenmasse-Erträgen pro Schnitt der Sorten Embassy (24,1 dt/ha) und Nui (24,3 dt/ha) ($GD_{\text{Sorte}} (0,1 \%) = 0,95$).

4.4. Screening von Pflanzenmaterial der rumänischen Ökotypen auf das Alkaloid Lolitrem B

In Tab. 18 sind die Ergebnisse der Lolitrem B-Untersuchungen des Pflanzenmaterials der verschiedenen rumänischen Ökotypen und der drei *L. perenne*-Sorten zusammengefasst.

In den Freilandproben der rumänischen Ökotypen wurde in fünf der 24 untersuchten Proben das Alkaloid Lolitrem B nachgewiesen. In der Probe des Ökotyps Rö 410 war Lolitrem B nachweisbar, jedoch nicht bestimmbar. In den anderen vier Lolitrem B enthaltenden Freilandproben variierte der Lolitrem B-Gehalt von 27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM beim Ökotyp Rö 119 bis zu 197 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM beim Ökotyp Rö 382.

In den Gewächshausproben der rumänischen Ökotypen wurde bei vier Proben der 22 untersuchten Ökotypen eine nachweisbare Lolitrem B-Produktion festgestellt. Die gemittelten Lolitrem B-Gehalte der vier Proben variierten von 402 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM bis zu 2427 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM. Bei den Proben der anderen 18 rumänischen Ökotypen wurde jeweils zu acht verschiedenen Terminen in dem *neotyphodium*-besiedelten Pflanzenmaterial kein Lolitrem B nachgewiesen.

Tab. 18: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in Frischmasseproben von verschiedenen *Lolium perenne*-Ökotypen (aus Rumänien) und *Lolium perenne*-Sorten

Ökotyp / Sorte	Lolitrem B-Gehalt der Freilandproben (Oktober 1996) in µg/kg TM	Mittelwert des Lolitrem B- Gehaltes in der Trockenmasse ^a (Gewächshaus 1997) in µg/kg TM	Bereich in µg/kg TM
Rö 29	n. n.	n. n.	--
Rö 41	n. n.	n. n.	--
Rö 47	n. n.	n. n.	--
Rö 52	n. n.	n. n.	--
Rö 57	n. n.	n. n.	--
Rö 61	n. n.	n. n.	--
Rö 74	n. n.	n. n.	--
Rö 83	n. n.	n. n.	--
Rö 96	n. n.	n. n.	--
Rö 119	27	1087	573 - 2264
Rö 134	189	402	143 - 671
Rö 169	n. n.	n. n.	--
Rö 170	n. n.	n. n.	--
Rö 176	n. n.	n. n.	--
Rö 191 ^b	n. n.	--	--
Rö 198	67	470	113 - 1122
Rö 203	n. n.	n. n.	--
Rö 223	n. n.	n. n.	--
Rö 281	n. n.	n. n.	--
Rö 283	n. n.	n. n.	--
Rö 382	197	2427	784 - 4278
Rö 410 ^b	n. b.	--	--
Rö 422	n. n.	n. n.	--
Rö 452	n. n.	n. n.	--
Yatsyn (NZ)	--	3240	1530 - 4172
Repell USA	--	451	369 - 533
Campania (NL)	--	138	57 - 191

n. n. = nicht nachweisbar; n. b. = nicht bestimmbar

^a = Mittelwert aus acht Schnitten, bei denen jeweils 10 *neotyphodium*-positive Pflanzen beerntet wurden (Gewächshauskultur 1997)

^b = Von Rö 191 und Rö 410 lag kein *neotyphodium*-positives Material vor, so dass hier keine Gewächshausproben untersucht werden konnten.

4.5. Lolitrem B-Gehalte in Frischmasseproben aus Freilandversuchen

4.5.1. Freilandversuch mit *L. perenne* an den Standorten Merklingsen und Asendorf von 1994 bis 1996

In keiner der *neotyphodium*-negativen Varianten war Lolitrem B nachweisbar. In Tab. 19 und Tab. 20 sind die ermittelten Lolitrem B-Gehalte der *neotyphodium*-positiven Varianten der Standorte Soest und Asendorf der Nutzungsjahre 1995 und 1996 zusammengefasst.

Tab. 19: Lolitrem B-Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM von *Lolium perenne* (Sorte Ellett), *neotyphodium*-besiedelte Variante, am Standort Merklingsen der Nutzungsjahre 1995/1996

Nutzungsjahr	Schnitt	Lolitrem B-Gehalt ^a (Gefriertrocknung) in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM
1995	1. Schnitt (16.05.1995)	n. n.
	2. Schnitt (12.07.1995)	356,4
1996	1. Schnitt (31.05.1996)	28,8
	2. Schnitt (09.08.1996)	373,6
	3. Schnitt (03.10.1996)	48,4

^a=Mittelwert aus vier Wiederholungen, n. n. = nicht nachweisbar

Tab. 20: Lolitrem B-Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM von *Lolium perenne* (Sorte Ellett), *neotyphodium*-besiedelte Variante, am Standort Asendorf der Nutzungsjahre 1995/1996

Nutzungsjahr	Schnitt	Lolitrem B-Gehalt ^a (Trocknung bei 65 °C) in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM
1995	1. Schnitt (15.05.1995)	n. n.
	2. Schnitt (29.06.1995)	124,4
	3. Schnitt (23.08.1995)	267,3
1996	1. Schnitt (31.05.1996)	118,2
	2. Schnitt (22.07.1996)	197,5

^a=Mittelwert aus vier Wiederholungen, n. n. = nicht nachweisbar

Um die ermittelten Lolitrem B-Gehalte von Asendorf mit denen von Merklingsen vergleichen zu können, wurden die Proben vom zweiten und dritten Schnitt 1996, Standort Merklingsen, einmal gefriergetrocknet, zum anderen wurde ein Teil bei 65 °C getrocknet.

Tab. 21: Vergleich der Lolitrem B-Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM bei zwei verschiedenen Trocknungsarten in mit *Neotyphodium lolii*-besiedelten Ganzpflanzen von *Lolium perenne* (Sorte Ellett)

Schnitt	Wdhlg	Lolitrem B-Gehalt (Gefriertrocknung) in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM	Lolitrem B-Gehalt (Trocknung bei 65 $^{\circ}\text{C}$) in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM	Gehaltsverluste durch Trocknung bei 65 $^{\circ}\text{C}$ in %
2. Schnitt 1996	a	321,6	214,2	33,4
	b	400,3	269,9	32,6
	c	444,1	246,9	44,4
	d	328,8	210,0	36,1
3. Schnitt 1996	a	59,5	46,6	21,7
	b	25,2	14,6	42,1
	c	53,0	33,4	37,0
	d	56,1	38,2	31,9
		durchschnittlicher	Gehaltsverlust in [%]	34,9

Der Vergleich der zwei verschiedenen Trocknungsarten (Gefriertrocknung/Trocknung bei 65 $^{\circ}\text{C}$) zeigte, dass sich bei der im Vergleich zur Gefriertrocknung wesentlich drastischeren Trocknung bei 65 $^{\circ}\text{C}$ durchschnittlich 34,9 % des Lolitrem B-Gehalts verflüchtigten.

An den Standorten Merklingsen und Asendorf wurden ähnliche Lolitrem B-Gehalte gefunden. Die Werte variierten von ca. 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM bis hin zu 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM. An beiden Standorten waren jeweils im August des Jahres die höchsten Lolitrem B-Gehalte zu verzeichnen. Die gefundenen Lolitrem B-Gehalte lagen jedoch mit max. 400 $\mu\text{g} / \text{kg}$ TM weit unterhalb der toxischen Dosis von 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM.

4.5.2. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998

Trockenmasse-Ertragsprüfung

Bei allen Schnitten wurde in den 60 Proben der *neotyphodium*-freien Variante der *L. perenne*-Sorte Yatsyn kein Lolitrem B nachgewiesen.

Die Ergebnisse der 60 *neotyphodium*-besiedelten Proben der Sorte Yatsyn sind in der Tab. 22 zusammengefasst.

Tab. 22: Lolitrem B-Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM von *neotyphodium*-besiedelten *Lolium perenne* (Sorte Yatsyn) in 1997 und 1998 bei Trockenmasse-Ertragsprüfungen

	Lolitrem B-Gehalt in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM	
	Sorte Yatsyn	Mittelwert
1. Schnitt 26.05.1997	31,7	25,8
	9,8	
	40,3	
	11,8	
	35,5	
2. Schnitt 17.07.1997	692,4	774,8
	749,6	
	717,9	
	846,2	
	867,7	
3. Schnitt 17.10.1997	954,6	1003,2
	1190,4	
	922,7	
	884,0	
	1064,3	
4. Schnitt 28.05.1998	293,4	196,5
	174,4	
	198,1	
	223,0	
	93,42	
5. Schnitt 03.08.1998	1175,2	1087,9
	1016,7	
	854,0	
	1315,9	
	1077,6	
6. Schnitt 15.10.1998	282,3	314,2
	436,8	
	286,9	
	250,4	
	314,5	

Düngungsversuch

In Tab. 23 und Tab. 24 sind die Lolitrem B-Gehalte der beiden Nutzungsjahre 1997 und 1998 zusammengestellt.

Tab. 23: Lolitrem B-Gehalte in $\mu\text{g/kg}$ TM von *neotyphodium*-besiedelten *Lolium perenne* (Sorte Yatsyn) bei zwei unterschiedlichen Düngungsstufen in 1997

Düngungsstufe in kg N/ha Jahr	Wdhlg.	Lolitrem B-Gehalt in $\mu\text{g/kg}$ TM	Mittelwert Lolitrem B-Gehalt in $\mu\text{g/kg}$ TM
1. Schnitt 26.05.1997			
130	a	15,0	18,3
	b	29,6	
	c	(10,5)	
	d	34,5	
	e	(1,7)	
260	a	103,2	84,0
	b	65,3	
	c	84,6	
	d	53,8	
	e	112,9	
2. Schnitt 17.07.1997			
130	a	1113,5	1140,4
	b	852,7	
	c	1198,2	
	d	968,4	
	e	1569,3	
260	a	1600,6	1771,1***
	b	1204,4	
	c	2024,9	
	d	1620,7	
	e	2405,0	
3. Schnitt 17.10.1997			
130	a	1112,7	1147,5
	b	847,9	
	c	1222,9	
	d	964,9	
	e	1589,5	
260	a	1632,7	1796,5***
	b	1196,5	
	c	2056,5	
	d	1627,7	
	e	2469,2	
GD _{Düngung} (5 %)		119,54	
GD _{Düngung} (1 %)		173,87	
GD _{Düngung} (0,1 %)		260,81	

* = signifikante Unterschiede $p = 5-1$ %

** = signifikante Unterschiede $p = 1-0,1$ %

*** = signifikante Unterschiede $p < 0,1$ %

Im ersten Schnitt des Jahres 1997 wurden bei beiden Düngungsvarianten nur sehr geringe Lolitrem B-Gehalte ermittelt. Bei der Düngungsstufe mit der niedrigeren Intensität (130 kg N/ha Jahr) variierten die Werte zwischen 1,7 µg/kg TM und 34,5 µg/kg TM. Bei der Düngungsvarianten mit der höheren Intensität (260 kg N/ha Jahr) variierten die Werte zwischen 53,8 µg/kg TM und 112,9 µg/kg TM. Der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes lag bei der hohen Düngungsstufe bei 84,0 µg/kg TM, bei der niedrigen Düngungsstufe lag der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes bei 18,3 µg/kg TM.

Beim zweiten Schnitt war der Mittelwert der höheren Düngungsstufe mit 1771,1 µg/kg TM signifikant höher als bei der niedrigen Düngungsstufe. Bei der niedrigen Düngungsstufe lag der Mittelwert bei 1140,4 µg/kg TM.

Auch beim dritten Schnitt zeigte die Düngungsvariante mit der höheren Intensität mit 1796,5 µg/kg TM einen signifikant höheren Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes als bei der Vergleichsvarianten mit der niedrigeren Düngungsstufe. Bei der niedrigeren Düngungsstufe lag der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes bei 1147,5 µg/kg TM.

Im zweiten Nutzungsjahr wurden im Mai nur geringe Lolitrem B-Gehalte festgestellt. Bei den Varianten mit der geringeren Düngung (120 kg N/ha) betrug der mittlere Lolitrem B-Gehalt 101,8 µg/kg TM. Der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes der düngungsintensiveren Variante (240 kg N/ha) war mit 249,4 µg/kg TM nicht signifikant höher.

Beim zweiten Schnitt des Jahres 1998 wurde eine Differenzierung festgestellt. Der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes der Variante mit der höheren N-Stufe war mit 1203,2 µg/kg TM signifikant höher als der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes der Vergleichsvarianten mit der niedrigeren Düngung. Hier lag der Mittelwert bei 802,7 µg/kg TM. Beim dritten Schnitt im Oktober 1998 war keine Differenzierung zwischen den Lolitrem B-Gehalten feststellbar. Für die düngungsintensiveren Parzellen wurde ein mittlerer Lolitrem B-Gehalt von 196,3 µg/kg TM ermittelt, der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes für die geringere Düngungsvariante lag bei 236,7 µg/kg TM.

Tab. 24: Lolitrem B-Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM von *neotyphodium*-besiedelten *Lolium perenne* (Sorte Yatsyn) bei zwei unterschiedlichen Düngungsstufen in 1998

Düngungsstufe in kg N/ha Jahr	Wdhlg.	Lolitrem B-Gehalt in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM	Mittelwert Lolitrem B-Gehalt in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM
1. Schnitt 28.05.1998			
120	a	88,8	101,8
	b	146,1	
	c	76,5	
	d	120,9	
	e	76,7	
240	a	328,9	249,4
	b	154,1	
	c	288,4	
	d	208,5	
	e	267,1	
2. Schnitt 03.08.1998			
120	a	737,2	802,7
	b	926,4	
	c	850,3	
	d	745,2	
	e	754,4	
240	a	951,7	1203,2***
	b	1145,5	
	c	1594,7	
	d	1249,3	
	e	1074,7	
3. Schnitt 15.10.1998			
120	a	244,3	236,7
	b	181,6	
	c	269,1	
	d	226,8	
	e	261,7	
240	a	115,5	196,3
	b	184,0	
	c	185,2	
	d	289,8	
	e	207,1	
GD _{Düngung} (5 %)		152,20	
GD _{Düngung} (1 %)		221,38	
GD _{Düngung} (0,1 %)		332,07	

* = signifikante Unterschiede $p = 5-1$ %

** = signifikante Unterschiede $p = 1-0,1$ %

*** = signifikante Unterschiede $p < 0,1$ %

In der Abb. 31 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

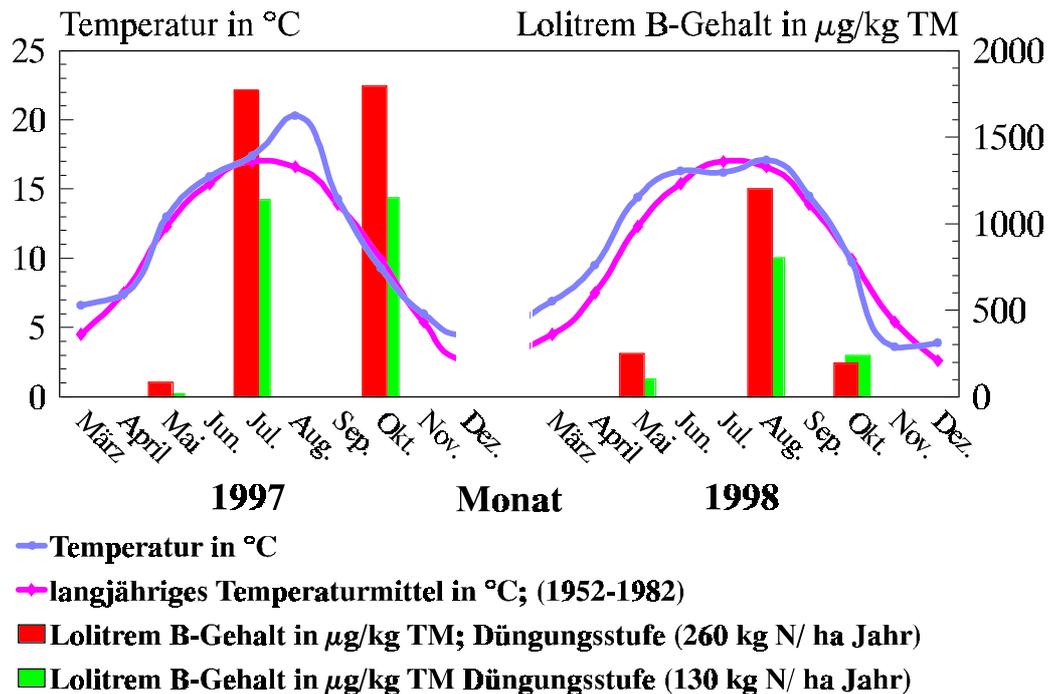


Abb. 31: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in *neotyphodium*-besiedelten *Lolium perenne* (Sorte Yatsyn) im Freiland am Standort Merklingsen der Versuchsjahre 1997 und 1998

4.5.3. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998

Bei den fünf durchgeführten Schnitten von Mai 1998 bis zum Oktober 1998 wurde in den 180 untersuchten Proben der *neotyphodium*-freien Varianten der *L. perenne*-Sorten Embassy, Nui und Yatsyn kein Lolitrem B nachgewiesen.

Die Mittelwerte der Lolitrem B-Gehalte der 180 untersuchten *neotyphodium*-besiedelten Parzellen der Sorten Embassy, Nui und Yatsyn sind in Tab. 25 dargestellt.

Tab. 25: Lolitrem B-Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM in verschiedenen *neotyphodium*-besiedelten *Lolium perenne*-Sorten am Standort Merklingsen bei unterschiedlichen Düngungsstufen in 1998

Schnitt	Düngungsvariante	Lolitrem B-Gehalt in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM*		
		Embassy	Nui	Yatsyn
1. Schnitt 28.05.1998	I	506,9 a	166,0 a	392,9 a
	II	670,0 b	177,7 a	434,5 a
	III	712,4 b	172,1 a	454,1 a
2. Schnitt 07.07.1998	I	484,7 a	102,6 a	586,7 a
	II	467,3 a	69,1 a	596,2 a
	III	519,6 a	80,5 a	535,1 a
3. Schnitt 03.08.1998	I	704,9 a	56,7 a	1136,2 a
	II	656,1 ab	116,1 a	905,7 b
	III	577,1 b	85,9 a	683,2 c
4. Schnitt 04.09.1998	I	567,0 a	59,1 a	1048,9 a
	II	566,8 a	15,9 a	801,0 b
	III	558,7 a	19,0 a	754,3 b
5. Schnitt 15.10.1998	I	218,5 a	66,5 a	262,9 a
	II	162,9 a	78,1 a	169,8 a
	III	160,2 a	97,9 a	238,4 a
GD _{Düngung} (5 %)		114,6		
GD _{Düngung} (1 %)		153,4		
GD _{Düngung} (0,1 %)		200,7		

* Lolitrem B-Gehalt als Mittelwert aus vier Wiederholungen

a, b, c) Werte, die vom gleichen Buchstaben gefolgt werden, unterscheiden sich nicht signifikant
 Düngungsvariante I = 150 kg N/ha Jahr, Düngungsvariante II = 300 kg N/ha Jahr,
 Düngungsvariante III = 450 kg N/ha Jahr

Beim ersten Schnitt des Jahres 1998 wurden bei der Sorte Embassy signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten des Lolitrem B-Gehaltes der drei verschiedenen Düngungsvarianten festgestellt. Für die Düngungsvarianten II und III lag der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes bei 670,0 bzw. 712,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM und war signifikant höher als bei der Düngungsvariante I. Hier lag der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes bei 506,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM. Bei den anderen Sorten konnten beim ersten Schnitt keine Differenzierungen zwischen den Düngungsvarianten festgestellt werden. Beim zweiten Schnitt wurden bei den drei Sorten Embassy, Nui und Yatsyn keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lolitrem B-Gehalten der einzelnen Düngungsvarianten festgestellt. Beim dritten Schnitt wurden bei der Sorte Embassy und Yatsyn signifikante Unterschiede zwischen den Lolitrem B-Gehalten festgestellt. Bei der Sorte Embassy war der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes für die Düngungsvariante I mit 704,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM signifikant höher als der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes der Düngungsvariante III (577,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM). Bei der Sorte Yatsyn hatte die Variante I mit 1136,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM den höchsten Mittelwert der Lolitrem B-Gehalte. Er war signifikant höher als die Mittelwerte der Variante II (905,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM) und der Variante III (683,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM), die zueinander auch signifikant unterschiedlich waren. Beim vierten Schnitt wurde bei der Sorte Yatsyn bei den Lolitrem B-Gehalten eine Differenzierung festgestellt. Der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes der Düngungsvariante I war mit 1048,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM signifikant höher als die Mittelwerte der Vergleichsvariante II und III. Bei den Sorten Embassy und Nui ergaben sich keine Differenzierungen der Lolitrem B-Gehalte.

Beim fünften Schnitt wurden zwischen den Düngungsvarianten keine signifikanten Unterschiede bei den einzelnen Sorten festgestellt.

Weiter lässt sich allgemein folgendes feststellen: Zwischen den einzelnen Düngungsvarianten gibt es bei den Mittelwerten des Lolitrem B-Gehaltes signifikante Unterschiede. Über alle Sorten und Schnitte gemittelt zeigte die Düngungsvariante I einen Lolitrem B-Gehalt von 424,0 µg/kg TM. Bei einer Grenzdifferenz ($p=5\%$) von 29,6 µg/kg TM war er signifikant höher als der gemittelte Lolitrem B-Gehalt der Düngungsvariante II (392,5 µg/kg TM) und der Düngungsvariante III (376,6 µg/kg TM).

Beim Vergleich der Mittelwerte der Lolitrem B-Gehalte der Sorten zeigten sich signifikante Unterschiede. Die Sorte Embassy hatte einen durchschnittlichen Lolitrem B-Gehalt von 502,3 µg/kg TM und war somit signifikant unterschiedlich zu den durchschnittlichen Lolitrem B-Gehalten der Sorten Nui und Yatsyn. Die Sorte Yatsyn zeigte mit 600,0 µg/kg TM den höchsten durchschnittlichen Lolitrem B-Gehalt, die Sorte Nui mit 90,9 µg/kg TM den geringsten Wert.

In Abb. 32, Abb. 33 und Abb. 34 sind die Ergebnisse der Sorten noch einmal graphisch dargestellt.

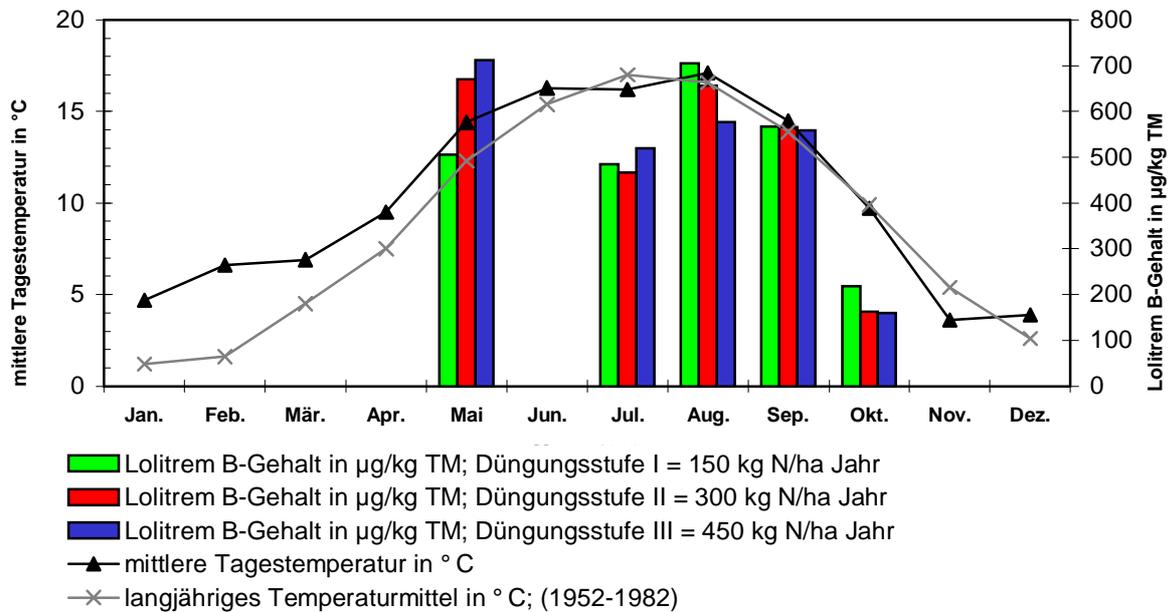


Abb. 32: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in der *neotyphodium*-besiedelten *Lolium perenne*-Sorte Embassy im Freiland am Standort Merklingsen im Versuchsjahr 1998

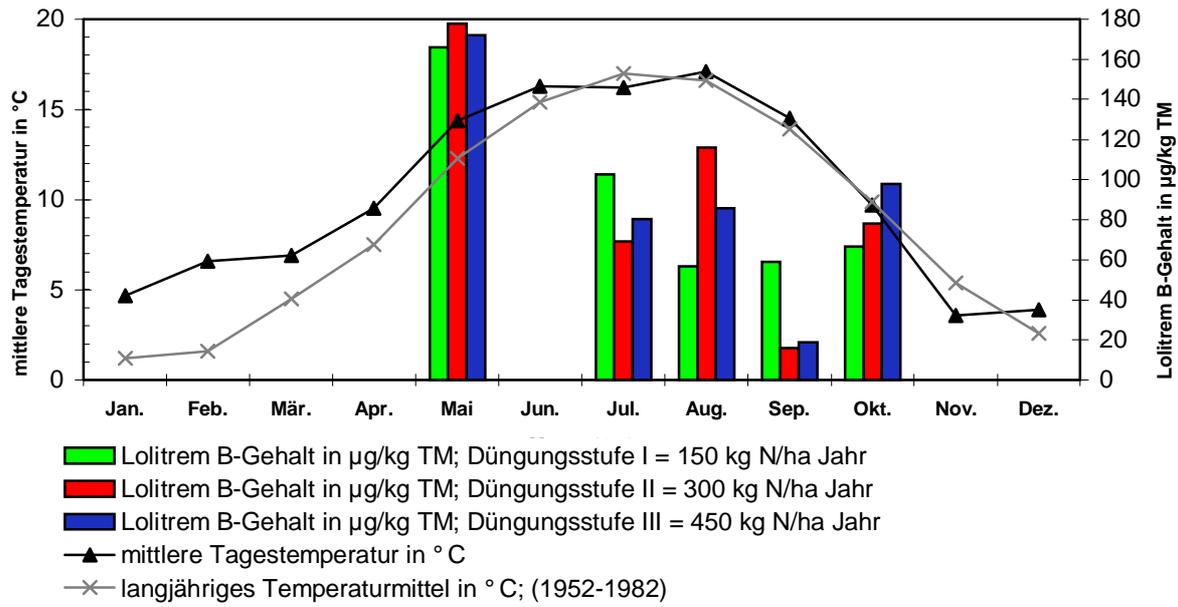


Abb. 33: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in der *neotyphodium*-besiedelten *Lolium perenne*-Sorte Nui im Freiland am Standort Merklingsen im Versuchsjahr 1998

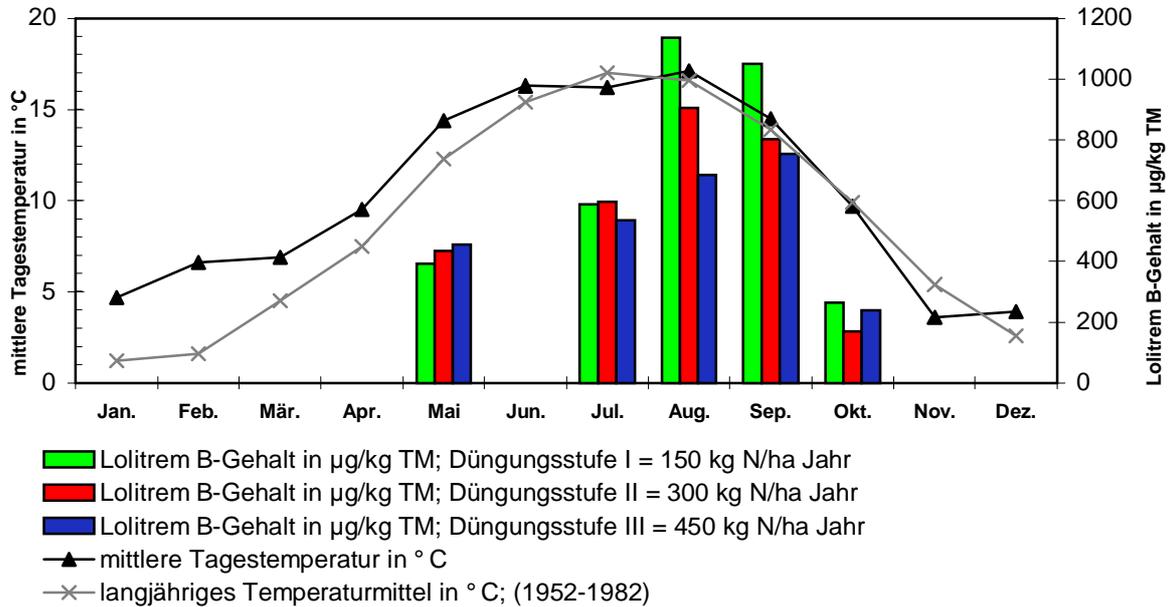


Abb. 34: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in der *neotyphodium*-besiedelten *Lolium perenne*-Sorte Yatsyn im Freiland am Standort Merklingsen im Versuchsjahr 1998

4.6. Untersuchungen zum Vorkommen der Alkaloide Lolitrem B und Paxillin *in vitro*

Es wurde bei insgesamt 34 *N. lolii*-Isolaten und bei zwei weiteren Pilzisolaten der Lolitrem B- und Paxillin-Gehalt bestimmt. In Tab. 26 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Der Paxillin-Gehalt war wesentlich höher als der Lolitrem B-Gehalt. Der Paxillin-Gehalt lag im µg-Bereich, der Lolitrem B-Gehalt lag im ng-Bereich.

Tab. 26: Lolitrem B- und Paxillin-Gehalte von 34 *Neotyphodium lolii*- und zwei weiteren Pilz-Isolaten nach achtwöchiger *in vitro*-Kultur auf GPYE-Agar

Bezeichnung des <i>N. lolii</i> - bzw. Pilz-Isolates	Mittelwert* Lolitrem B-Gehalt in ng/Agarplatte	Mittelwert* Paxillin-Gehalt in µg/Agarplatte
Rö 29	44,9	3,7
Rö 41	85,1	6,6
Rö 52	11,9	9,5
Rö 57	89,4	4,2
Rö 74	12,7	3,6
Rö 83	20,6	3,6
Rö 96	107,5	4,0
Rö 119	70,4	3,8
Rö 134	103,9	2,6
Rö 169	47,3	4,7
Rö 176	58,6	5,0
Rö 198	80,9	4,3
Rö 223	19,4	n. n.
Rö 281	20,7	4,3
Rö 283	33,5	3,2
Rö 382	10,5	3,6
Rö 422	39,3	4,3
Rö 452	19,4	n. n.
100	724,6	n. n.
CBS 2	492,7	19,2
73	296,4	21,1
Yatsyn	283,5	15,1
Ellett	275,3	12,4
Al 2	221,0	12,4
1/94	218,1	4,6
Lp 19/188s	210,6	7,3
10/94	171,2	4,6
38/94	170,6	5,7
Repell USA	164,9	6,9
82/83	119,0	4,9
Al 1	84,9	(0,8) n. b.
37/94	70,9	4,4
F573	19,9	n. n.
73 turbo	77,8	25,1
<i>Acremonium strictum</i>	416,4	1,2
<i>Penicillium paxilli</i>	444,0	132,7

n. n. = nicht nachweisbar; n. b. = nicht bestimmbar

* = Mittelwert aus fünf Wiederholungen

Das Isolat des rumänischen Ökotyps R \ddot{o} 382 zeigte mit 10,5 ng/Agarplatte den geringsten Lolitrem B-Gehalt. Den höchsten Lolitrem B-Gehalt bei den rumänischen Ökotypen hatte das Isolat des rumänischen Ökotyps R \ddot{o} 96. Der Lolitrem B-Gehalt lag hier bei 107,5 ng/Agarplatte. Die Lolitrem B-Gehalte der 16 anderen *N. lolii*-Isolate waren wesentlich höher als die Lolitrem B-Gehalte der Isolate der rumänischen Ökotypen. Den höchsten Lolitrem B-Gehalt zeigte das Isolat 100 mit 724,6 ng/Agarplatte. Weiter wurde auch in den endophytischen Pilzen *A. strictum* und *P. paxilli* der Naturstoff Lolitrem B nachgewiesen. Bei *A. strictum* und *P. paxilli* wurden Lolitrem B-Gehalte von 416,4 ng/Agarplatte bzw. 444,0 ng/Agarplatte gefunden.

In vier Isolaten (R \ddot{o} 223, R \ddot{o} 482, F 573 und 100) wurde kein Paxillin nachgewiesen. Beim größten Teil der Isolate (25 Isolate) lag der Paxillin-Gehalt zwischen 0,8 μ g/Agarplatte beim Isolat Al 1 und 9,5 μ g/Agarplatte beim Isolat des rumänischen Ökotyps R \ddot{o} 52. In sieben Isolaten lag der Paxillin-Gehalt oberhalb von 10 μ g/Agarplatte. Den höchsten Paxillin-Gehalt zeigte der Pilz *P. paxilli* mit 132,7 μ g/Agarplatte.

4.7. Lolitrem B-Gehalte einzelner Individuen innerhalb einer Sorte bzw. Ökotypen von *L. perenne*

In Abb. 35 sind die Ergebnisse der *L. perenne*-Sorten Kerdion und Campania dargestellt. Der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes der Sorte Kerdion betrug 2726 μ g/kg TM mit einer Standardabweichung von 1440 μ g/kg TM. Die ermittelten Lolitrem B-Gehalte variierten von 645 μ g/kg TM bis zu 4815 μ g/kg TM. Der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes der Sorte Campania war mit 253 μ g/kg TM wesentlich geringer. Die Standardabweichung betrug hier 98 μ g/kg TM. Die Lolitrem B-Gehalte lagen im Bereich zwischen 110 μ g/kg TM und 415 μ g/kg TM.

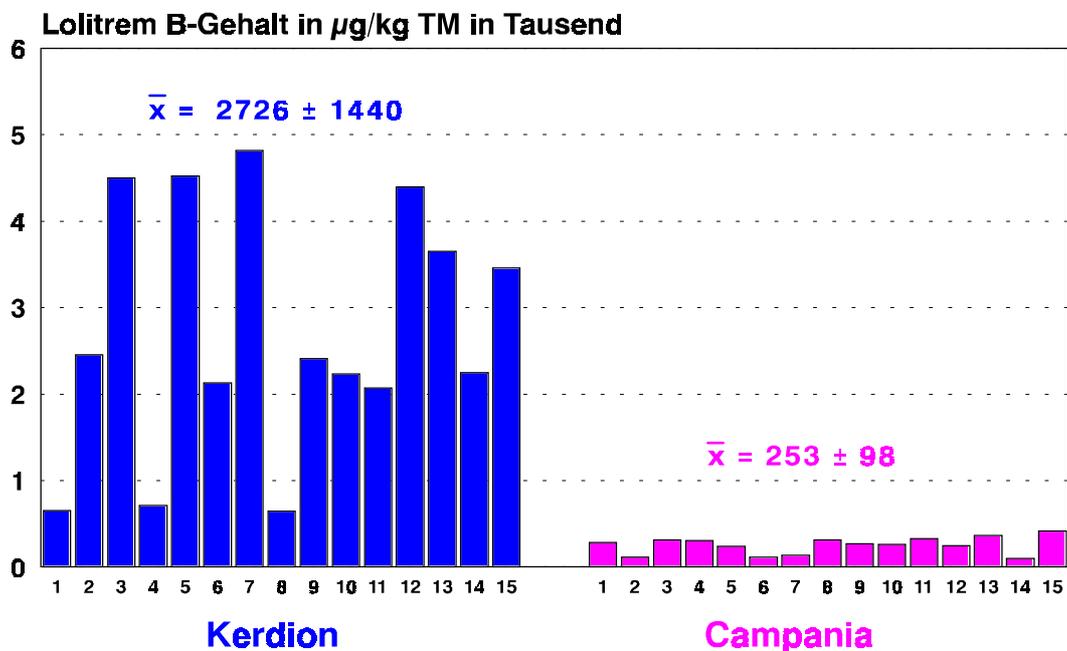


Abb. 35: Vergleich der Lolitrem B-Gehalte in μ g/kg TM einzelner Individuen sowie des Mittelwertes der *Lolium perenne*-Sorten Kerdion und Campania (nach 33 Tagen Kultivierung im Gewächshaus)

In Abb. 36 sind die Lolitrem B-Gehalte der einzelnen Individuen der rumänischen Ökotypen R_ö 198 und R_ö 382 graphisch dargestellt. Beim rumänischen Ökotyp R_ö 198 variierten die Lolitrem B-Gehalte von 536 µg/kg TM bis zu 2472 µg/kg TM. Der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes aller Individuen betrug 1102 µg/kg TM bei einer Standardabweichung von 507 µg/kg TM. Beim rumänischen Ökotyp R_ö 382 variierten die Lolitrem B-Gehalte von 3185 µg/kg TM bis zu 5244 µg/kg TM. Der Mittelwert betrug hier 4172 µg/kg TM mit einer Standardabweichung von 672 µg/kg TM.

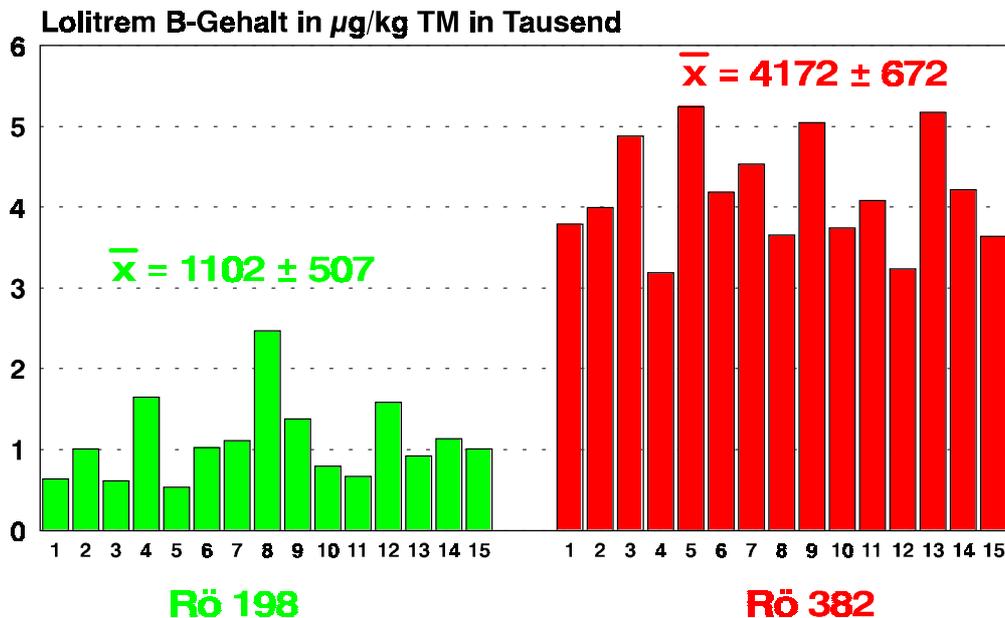


Abb. 36: Vergleich der Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM einzelner Individuen sowie des Mittelwertes der *Lolium perenne*-Ökotypen R_ö 198 und R_ö 382 (nach 33 Tagen Kultivierung im Gewächshaus)

4.8. Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt in *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Pflanzen

4.8.1. Orientierender Vorversuch zum Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt

Die Ergebnisse, die in Tab. 27 zusammengefasst sind, zeigen, dass die Temperatur einen Einfluss auf den Lolitrem B-Gehalt besaß. Gemittelt über alle Prüfglieder zeigten sich bei der Kulturvariante I die geringsten Lolitrem B-Gehalte. Hier lag der mittlere Lolitrem B-Gehalt bei 212 µg/kg TM und war signifikant kleiner als bei der Kulturvariante II und III. Den höchsten mittleren Lolitrem B-Gehalt fand sich bei der Kulturvariante II. Hier lag der mittlere Lolitrem B-Gehalt bei 1499 µg/kg TM und war signifikant höher als bei der Kulturvariante I und III. Der mittlere Lolitrem B-Gehalt der Kulturvariante III lag bei 1125 µg/kg TM.

Im einzelnen sahen die Ergebnisse wie folgt aus. Beim ersten Schnitt wurde bei der Sorte Campania und den Ökotypen R_ö 52, R_ö 169 und R_ö 176 keine Differenzierung im Lolitrem B-Gehalt der einzelnen Kulturvarianten festgestellt. Bei den Sorten Yatsyn, Kerdion, 82/83 und den Ökotypen R_ö 119 wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturvarianten II, III und

der Kulturvariante I festgestellt. Diese Differenzierung zeigte sich auch in den Mittelwerten des ersten Schnittes. Der mittlere Lolitrem B-Gehalt der Kulturvariante I war mit 406 µg/kg TM signifikant geringer als der mittlere Lolitrem B-Gehalt der Kulturvariante II und III. Hier lagen die mittleren Lolitrem B-Gehalte bei 1876 bzw. 1439 µg/kg TM.

Tab. 27: Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM verschiedener *Lolium perenne*-Sorten und -Ökotypen bei drei verschiedenen Kulturvarianten in 1997

Schnitt	Kultur-variante*	Lolitrem B-Gehalt in µg/kg TM								
		Yatsyn	Campania	Kerdion	82/83	Rö 52	Rö 119	Rö 169	Rö 176	Mittelwert
1. Schnitt 13.06.97	I	1731 a	202 a	731 a	356 a	n. n. a	229 a	n. n. a	n. n. a	406 a
	II	7484 b	543 a	2427 b	2888 b	n. n. a	1665 b	n. n. a	n. n. a	1876 b
	III	4172 c	345 a	2213 b	2518 b	n. n. a	2264 c	n. n. a	n. n. a	1439 b
2. Schnitt 11.07.97	I	489 a	147 a	208 a	180 a	n. n. a	108 a	n. n. a	n. n. a	142 a
	II	3493 b	476 a	1489 b	4894 b	n. n. a	1046 b	n. n. a	n. n. a	1425 b
	III	1530 c	168 a	1565 b	1627 c	n. n. a	684 b	n. n. a	n. n. a	697 b
3. Schnitt 12.08.97	I	327 a	59 a	113 a	171 a	n. n. a	43 a	n. n. a	n. n. a	89 a
	II	3254 b	243 a	1743 b	4773 b	n. n. a	1079 b	n. n. a	n. n. a	1197 b
	III	3878 c	235 a	2827 c	1865 c	n. n. a	1098 b	n. n. a	n. n. a	1238 b
GD _{Kulturvariante} (5 %)					535,5					
GD _{Kulturvariante} (1 %)					718,3					
GD _{Kulturvariante} (0,1 %)					958,6					

a, b, c) Werte, die vom gleichen Buchstaben gefolgt werden, unterscheiden sich nicht signifikant

* Kulturvariante I = Klimakammer 17 °C/10 °C; Kulturvariante II = Klimakammer 27 °C/19 °C; Kulturvariante III = Gewächshaus

Beim zweiten und dritten Schnitt waren die Ergebnisse vergleichbar. Für die Sorte Campania und die Ökotypen Rö 52, Rö 169 und Rö 176 wurden keine Differenzierungen im Lolitrem B-Gehalt zwischen den einzelnen Kulturvarianten festgestellt. Bei den Sorten Yatsyn, Kerdion, 82/83 und dem Ökotyp Rö 119 wurde im zweiten und dritten Schnitt eine Differenzierung zwischen den Kulturvarianten II, III und der Kulturvariante I gefunden. Die Lolitrem B-Gehalte für die Kulturvariante I variierten bei diesen Prüfgliedern zwischen 43 und 489 µg/kg TM. Sie waren signifikant geringer als die Lolitrem B-Gehalte der entsprechenden Sorten und Ökotypen der Kulturvariante II und III. Hier variierten die Lolitrem B-Gehalte zwischen 684 µg/kg TM und 4894 µg/kg TM. Zudem wurde bei den Sorten Yatsyn, 82/83 (2. Schnitt) und bei den Sorten Yatsyn, Kerdion, 82/83 (3. Schnitt) eine Differenzierung des Lolitrem B-Gehaltes zwischen den Kulturvarianten II und III festgestellt.

Bemerkenswert sind die gefundenen Ergebnisse für die rumänischen Ökotypen Rö 52, Rö 169 und Rö 176. Bei diesen Ökotypen wurde bei keinem Schnitt Lolitrem B nachgewiesen. Trotz der 100 %igen Besiedlung mit dem Pilz *N. lolii* führte auch die 12-wöchige Kultur bei einer Tagestemperatur von 27 °C (Kulturvariante II) nicht zu einer nachweisbaren Lolitrem B-Produktion.

In Abb. 37 sind die Ergebnisse als Graphik dargestellt.

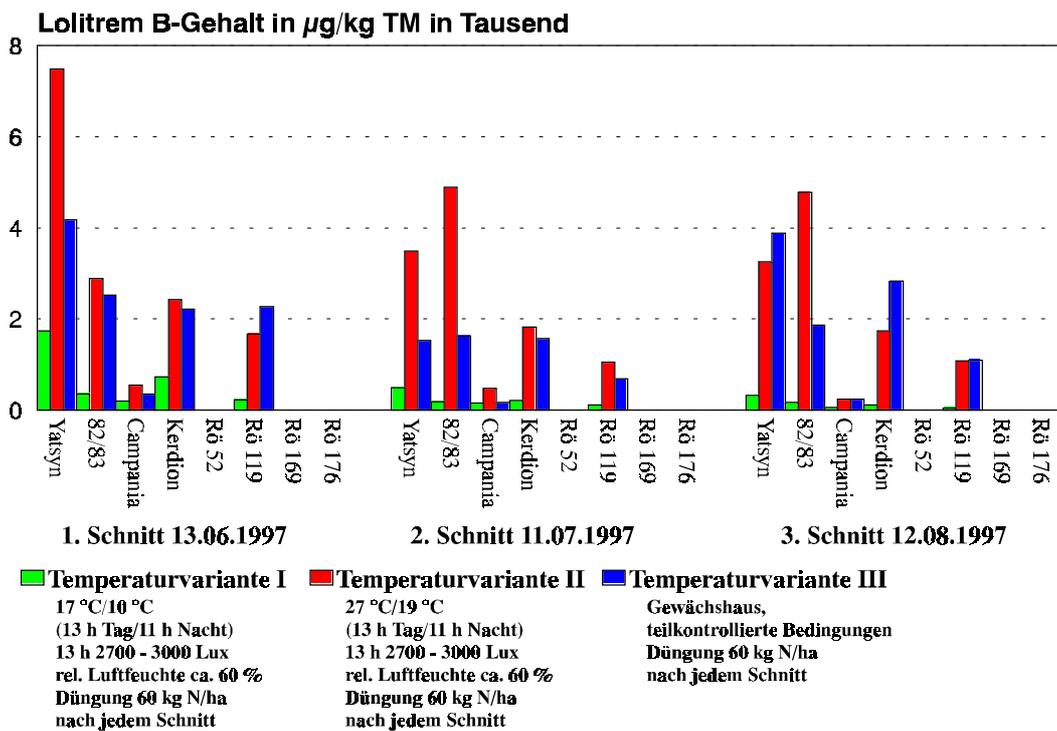


Abb. 37: Lolitrem B-Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM verschiedener *Lolium perenne*-Sorten und -Ökotypen bei drei verschiedenen Kulturvarianten in 1997

4.8.2. Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt sowie der Verteilung von Lolitrem B innerhalb der Pflanze

In Tab. 28 sind die ermittelten Lolitrem B-Gehalte von unterschiedlichen Pflanzensektionen der *L. perenne*-Sorten Yatsyn, Embassy und Nui bei zwei verschiedenen Temperaturvarianten zusammengefasst.

Die statistische Auswertung zeigte, dass es zwischen der Temperaturvariante I und II, den verschiedenen Sektionen der Pflanzen und auch innerhalb der Sorten signifikante Unterschiede gab.

Die erhaltenen mittleren Lolitrem B-Gehalte für die beiden Temperaturvarianten waren höchst signifikant unterschiedlich ($\text{GD}_{\text{Temperaturvariante}}$ ($p=0,1\%$) = 610 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM). Bei der kälteren Temperatur (Klimakammer 17 °C/10 °C) wurde ein mittlerer Lolitrem B-Gehalt von 406 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM ermittelt. Dieser war höchst signifikant kleiner als der mittlere Lolitrem B-Gehalt der Temperaturvarianten II. Der mittlere Lolitrem B-Gehalt bei der wärmeren Temperatur (Klimakammer 27 °C/19 °C) lag bei 2650 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM.

Auch innerhalb der Sektionen der Pflanzen zeigten sich höchst signifikante Unterschiede beim Lolitrem B-Gehalt ($\text{GD}_{\text{Sektion}}$ ($p=0,1\%$) = 747 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM). In der Blattscheidensektion war der mittlere Lolitrem B-Gehalt mit 2869 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM am höchsten, gefolgt von der Blattspreitensektion, hier fand sich ein mittlerer Lolitrem B-Gehalt von 1190 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM. Die geringsten Lolitrem B-Gehalte fanden sich in der Wurzelsektion. Hier lag der mittlere Lolitrem B-Gehalt bei 525 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM.

Bei den Sorten zeigte die Sorte Yatsyn mit 2661 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM den höchsten mittleren Lolitrem B-Gehalt. Für die Sorte Embassy wurde ein mittlerer Lolitrem B-Gehalt von 1542 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM und für die Sorte Nui ein durchschnittlicher Lolitrem B-Gehalt von 382 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM ermittelt. Bei einer Grenzdifferenz von GD_{Sorte} ($p=0,1\%$) = 747 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM waren die Mittelwerte der einzelnen Sorten zueinander höchst signifikant unterschiedlich.

Tab. 28: Lolitrem B-Gehalte in $\mu\text{g/kg}$ TM von verschiedenen Sektionen von *Lolium perenne* in Abhängigkeit von der Temperatur und von der Sorte nach vierwöchiger Kultur in der Klimakammer (25 Pflanzen pro Sorte, $n = 4$) in 1997

Sorte	Sektion	Lolitrem B-Gehalt in $\mu\text{g/kg}$ TM ^a	
		Temperaturvariante I 17 °C/10 °C (Tag/Nacht)	Temperaturvariante II 27 °C/19 °C (Tag/Nacht)
Yatsyn	Blattspreite	374	4385***
	Blattscheide	1484	7597***
	Wurzel	64	2061***
Embassy	Blattspreite	210	1724**
	Blattscheide	1337	5244***
	Wurzel	57	677
Nui	Blattspreite	n. b.	447
	Blattscheide	130	1424*
	Wurzel	n. b.	293
GD _{Temperaturvariante (5 %)}		924	
GD _{Temperaturvariante (1 %)}		1296	
GD _{Temperaturvariante (0,1 %)}		1830	

* = signifikante Unterschiede $p = 5-1$ %

** = signifikante Unterschiede $p = 1-0,1$ %

*** = signifikante Unterschiede $p < 0,1$ %

n. b. = nicht bestimmbar

^a= Mittelwert aus vier Wiederholungen

Im einzelnen waren die Ergebnisse wie folgt:

Bei der Sorte Yatsyn waren unter den Bedingungen der Temperaturvariante II die höchsten Lolitrem B-Gehalte zu verzeichnen. In allen drei Sektionen der Pflanze, Blattscheide, Blattspreite und Wurzeln waren die Lolitrem B-Gehalte höchst signifikant höher als bei den Sektionen der Vergleichsvarianten. Mit 7597 $\mu\text{g/kg}$ TM war der höchste Lolitrem B-Gehalt in der Blattscheidensektion zu beobachten. In der Blattspreitensektion fand sich ein Lolitrem B-Gehalt von 4385 $\mu\text{g/kg}$ TM; in der Wurzelsektion wurde ein Lolitrem B-Gehalt von 2061 $\mu\text{g/kg}$ TM gefunden. Bei der niedrigeren Temperatur wurden in der Blattscheidensektion der Sorte Yatsyn ein Lolitrem B-Gehalt von 1484 $\mu\text{g/kg}$ TM ermittelt. Die Blattspreiten- und Wurzelsektion zeigten Lolitrem B-Gehalte von 374 bzw. 64 $\mu\text{g/kg}$ TM.

Bei der Sorte Embassy war in der Blattscheiden- und Blattspreitensektion der Lolitrem B-Gehalt für die Temperaturvariante II signifikant höher als bei der Vergleichsvarianten. In der Blattscheiden- bzw. Blattspreitensektion fanden sich bei der höheren Temperatur Lolitrem B-Gehalte von 5244 bzw. 1724 $\mu\text{g/kg}$ TM. In der Wurzelsektion lag der Lolitrem B-Gehalt bei 677 $\mu\text{g/kg}$ TM. Bei der niedrigeren Temperatur ergaben sich für die Sorte Embassy in der Blattscheiden-, Blattspreiten- und Wurzelsektion Lolitrem B-Gehalte von 1337, 210 bzw. 57 $\mu\text{g/kg}$ TM.

Bei der Sorte Nui war bei der höheren Temperatur der Lolitrem B-Gehalt in der Blattscheidensektion signifikant höher als in der gleichen Sektion der kälteren Vergleichsvarianten. In der Blattscheiden- bzw. Blattspreitensektion waren die Lolitrem B-Gehalte 1424 bzw. 447 $\mu\text{g/kg}$ TM. In der Wurzelsektion wurde ein Lolitrem B-Gehalt von 293 $\mu\text{g/kg}$ TM gefunden. Bei der niedrigeren Temperatur wurde bei der Sorte Nui mit 130 $\mu\text{g/kg}$ TM nur in der Blattscheidensektion eine nachweisbare Menge Lolitrem B festgestellt. In der Blattspreiten- und Wurzelsektion war unter den kälteren Bedingungen kein Lolitrem B bestimmbar.

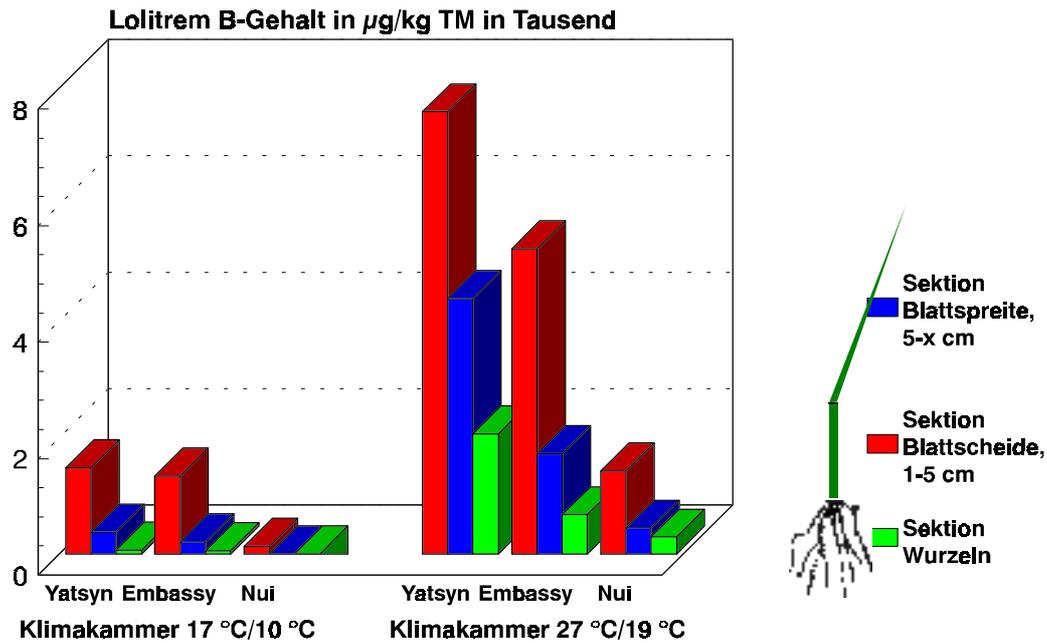


Abb. 38: Lolitrein B-Gehalte in $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM von verschiedenen Sektionen von *Lolium perenne* in Abhängigkeit von der Temperatur und von der Sorte nach vierwöchiger Kultur in der Klimakammer (25 Pflanzen pro Sorte, $n = 4$) in 1997

4.9. Mögliche neue innovative Verfahren zum Nachweis von *Neotyphodium* in Karyopsen

4.9.1. Zusammenhang zwischen Lolitrein B-Gehalt und *Neotyphodium*-Besiedlung im Saatgut unterschiedlicher Sorten und Ökotypen von *L. perenne*

Bei 35 Saatgutproben (29 Saatgutproben der rumänischen Ökotypen und sechs Saatgutproben von *L. perenne*-Sorten) wurde keine *N. lolii*-Besiedlung festgestellt. In keiner dieser *neotyphodium*-negativen Proben konnte Lolitrein B nachgewiesen werden.

In 40 Saatgutproben (24 Saatgutproben der rumänischen Ökotypen und 16 Saatgutproben der *L. perenne*-Sorten) wurde eine *N. lolii*-Besiedlung festgestellt. Die *N. lolii*-Besiedlung variierte hier von 2 bis 100 %. Bei 19 Saatgutproben (zwei *L. perenne*-Sorten und 17 rumänische Ökotypen) lag die *N. lolii*-Besiedlungsrate zwischen 81 und 100 %. Bei sieben Proben der rumänischen Ökotypen war die *N. lolii*-Besiedlung 100 %. Bei vier Saatgutproben (drei *L. perenne*-Sorten und ein rumänischer Ökotyp) lag die *N. lolii*-Besiedlungsrate zwischen 61 und 80 %. Zwei Saatgutproben (eine *L. perenne*-Sorte und ein rumänischer Ökotyp) zeigten eine *N. lolii*-Besiedlungsrate von 43 bzw. 56 %. Drei Saatgutproben von *L. perenne*-Sorten zeigten eine *N. lolii*-Besiedlungsrate, die zwischen 21 und 40 % lag. In 12 Saatgutproben (sieben *L. perenne*-Sorten und ein rumänischer Ökotyp) war die *N. lolii*-Besiedlungsrate unterhalb von 21 %.

Bei den 12 Saatgutproben, die eine *N. lolii*-Besiedlung zwischen 1 und 20 % aufwiesen, variierten die ermittelten Lolitrein B-Gehalte zwischen nicht nachweisbar und 1724 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM. In fünf Saatgutproben konnte kein Lolitrein B nachgewiesen werden.

4.9.2. Einsatz der NIR-Spektroskopie zur Bestimmung der *Neotyphodium*-Besiedlung in *L. perenne*

In Tab. 29 sind die ermittelten *Neotyphodium*-Besiedlungsraten der 18 untersuchten *L. perenne* Saatgutproben zusammengestellt.

Tab. 29: *Neotyphodium*-Besiedlung in % von 18 verschiedenen *Lolium perenne*-Sorten, ermittelt mit Hilfe der Anilinblau-Färbung (Untersuchungsumfang: 100 Karyopsen pro Sorte)

Bezeichnung der <i>L. perenne</i> -Sorte ^a	<i>Neotyphodium</i> -Besiedlung in %
Yatsyn HE	83
Embassy HE	72
Embassy LE	2
Nui HE	78
lp21-1-F	36
lp1-1-R	92
lp30-1-F	0
lp9-1-F	12
lp23-1-R	3
lp6-1-R	34
lp2-1-F	0
lp35-1-R	43
lp16-1-R	31
lp28-8-F	15
lp5-1-R	75
lp37-1-F	8
lp37-2-F	11
lp38-1-F	12

^a= teilweise wurden die Bezeichnungen der *L. perenne*-Sorten auf Wunsch des Züchters verschlüsselt.

Ein Vergleich der Spektren beider Versuchsreihen zeigte, dass durch die Vermahlung der Proben keine zusätzlichen Informationen gewonnen werden. Die Ergebnisse der unvermahlten Proben waren identisch mit denen der vermahlten Proben. Die Abb. 40 zeigt die NIR-Spektren der 18 vermahlten Saatgutproben.

Die Tab. 30 zeigt die Ergebnisse der Kalibration sowie die Vorhersage für die „unbekannten“ Proben. Die Kalibration erfolgte mit Hilfe eines Software-Programms. Das beste Ergebnis ermittelte die Software für eine PLSR-Kalibration (Partial Least Squares Regression mit 10 Faktoren). Der Multiple Korrelationskoeffizient (MKK) und der Standardfehler der Kalibration (SEC) sind dann sehr gut.

MKK = 0,99

SEC = 4,98

SEP = 57,5

Jedoch ist die Vorhersage für neue „unbekannte“ Proben, der Standardfehler der Analyse (SEP) nicht zufriedenstellend. Für die Probe NuiLE mit einer *Neotyphodium*-Besiedlung von 0 % wird beispielsweise eine *Neotyphodium*-Besiedlung von ca. 100 % berechnet.

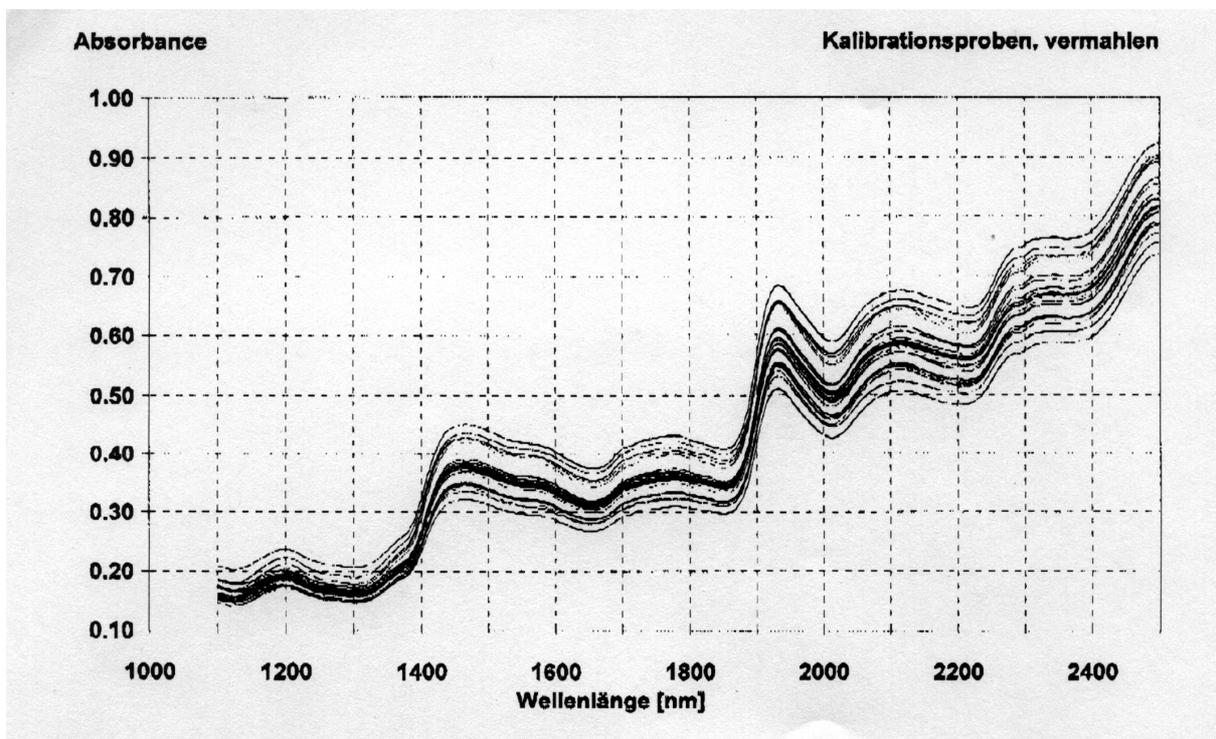
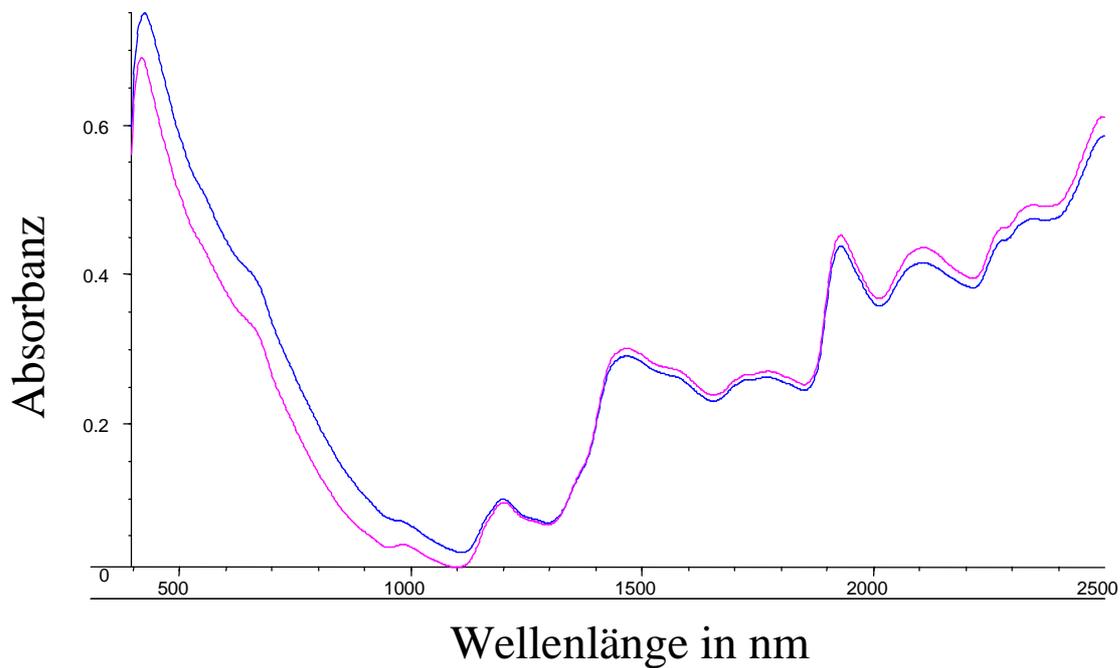


Abb. 40: NIR-Spektren der 18 untersuchten *Lolium perenne*-Sorten

Tab. 30: Probekalibrierung mit 18 verschiedenen *Lolium perenne*-Sorten sowie Berechnung für vier „unbekannte“ Proben

Probe	<i>N. lolii</i> -Besiedlung in %, Ist-Wert, Anilinblau-Färbung	<i>N. lolii</i> -Besiedlung in %, berechnet nach Kalibration	Differenz
Yatsyn HE	83	77,85	-5,15
		90,55	7,55
Embassy HE	72	71,04	-0,96
		66,21	-5,79
Embassy LE	2	5,14	3,14
		7,22	5,22
Nui HE	78	80,33	2,33
		75,15	-2,85
lp21-1-F	36	39,70	3,70
		37,64	1,64
lp1-1-R	92	84,35	-7,65
		90,65	-1,35
lp30-1-F	0	-2,41	-2,41
		-0,71	-0,71
lp9-1-F	12	14,14	2,14
		10,91	-1,09
lp23-1-R	3	8,20	5,20
		4,54	1,54
lp6-1-R	34	35,23	1,23
		28,93	-5,07
lp2-1-F	0	-4,97	-4,97
		-3,02	-3,02
lp35-1-R	43	51,04	8,04
		48,91	5,91
lp16-1-R	31	32,97	1,97
		30,23	-0,77
lp28-8-F	15	15,45	0,45
		12,10	-2,90
lp5-1-R	75	72,66	-2,34
		75,61	0,61
lp37-1-F	8	7,82	-0,18
		12,84	4,84
lp37-2-F	11	6,45	-4,55
		1,35	-9,65
lp38-1-F	12	14,90	2,90
		15,00	3,00
Berechnung der <i>Neotyphodium</i>-Besiedlung bei „unbekannten“ Proben			
Nui LE	0	102,23	102,23
		99,37	99,37
Yatsyn LE	0	21,96	21,96
		11,46	11,46
lp14-1-F	0	-16,29	-16,29
		-16,24	-16,24
lp10-1-R	0	-49,16	-49,16
		-50,53	-50,53

Die Abb. 41 zeigt die NIR-Spektren der *neotyphodium*-besiedelten und der nicht besiedelten Probe der Sorte Yatsyn.

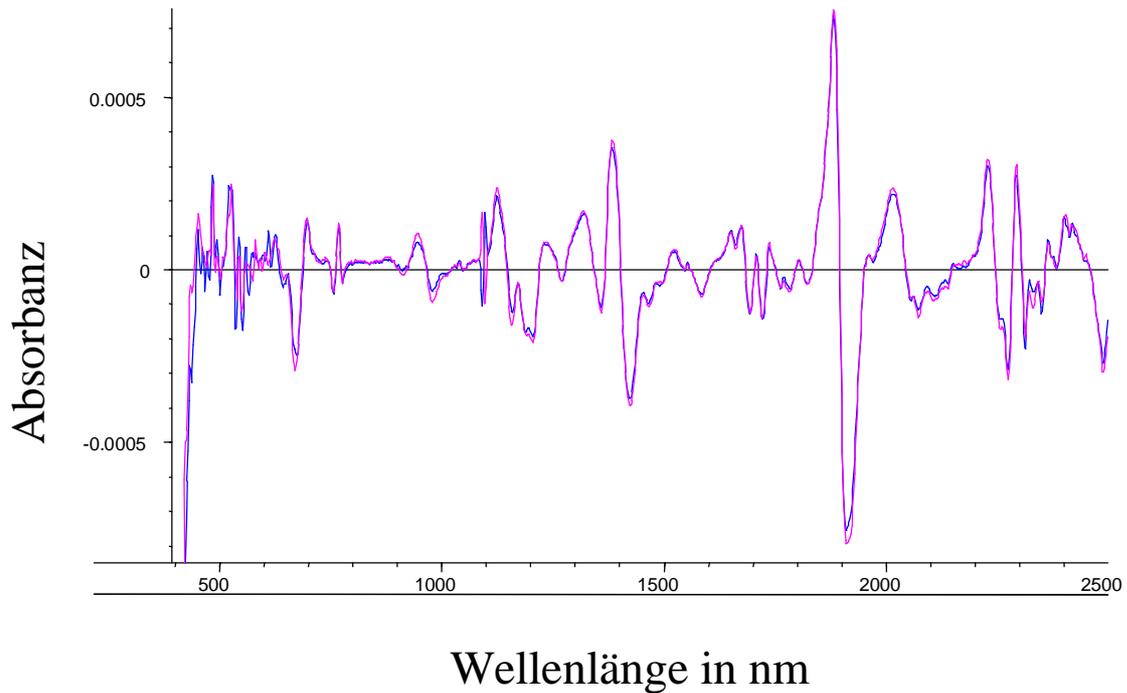


L. perenne Sorte Yatsyn; *Neotyphodium*-Besiedlung: 83 %

L. perenne Sorte Yatsyn; *Neotyphodium*-Besiedlung: 0 %

Abb. 41: NIR-Spektren der *neotyphodium*-besiedelten und der *neotyphodium*-freien *Lolium perenne*-Sorte Yatsyn

Die chemometrische Auswertung der NIR-Spektren der *neotyphodium*-besiedelten und *neotyphodium*-freien Variante der *L. perenne*-Sorte ergab keinerlei signifikanten Unterschiede. Auch bei der zweiten Ableitung mit optimalen Parametern waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die zu beobachtenden Unterschiede bei der zweiten Ableitung sind ausschließlich auf Scattering-Effekte zurückzuführen. Diese würden auch bei Wiederholungsmessungen an ein und derselben Probe auftreten. Die Abb. 42 zeigt die zweiten Ableitungen der NIR-Spektren der beiden vermessenen Varianten.



L. perenne Sorte Yatsyn; *Neotyphodium*-Besiedlung: 83 %

L. perenne Sorte Yatsyn; *Neotyphodium*-Besiedlung: 0 %

Abb. 42: Zweite Ableitungen der NIR-Spektren der *neotyphodium*-besiedelten und der *neotyphodium*-freien *Lolium perenne*-Sorte Yatsyn

5. Diskussion

5.1. Vorkommen von *N. lolii* in Sorten und Ökotypen von *L. perenne*

Die Untersuchungen zum Vorkommen des Pilzes *N. lolii* in *L. perenne*-Sorten zeigten, dass nur wenige Sorten bei nur geringen Besiedlungsraten besiedelt waren. In 10 der 84 untersuchten *L. perenne* Futtergras-Sorten der Beschreibenden Sortenliste fanden sich *Neotyphodium*-Pilze. Die Besiedlungsraten lagen zwischen 2 und 15 %. In der Tab. 31 sind diese Ergebnisse den Ergebnissen anderer Untersuchungen gegenübergestellt.

Tab. 31: Vorkommen von *Neotyphodium lolii* im Saatgut europäischer *Lolium perenne*-Sorten

Anzahl untersuchter <i>L. perenne</i> -Sorten	Anzahl besiedelter Sorten	Bereich der Besiedlungsrate in %	Referenz
38	1	-	LEWIS & CLEMENT, 1986
16	4	1-20 %	LATCH et al., 1986
68	8	1-28 %	DAPPRICH et al., 1994
84	10	1-15 %	eigene Untersuchungen, 1997

Die Untersuchung der 36 holländischen *L. perenne*-Sorten konnte hier nicht berücksichtigt werden, da sie nicht repräsentativ war. Bei dem überwiegenden Teil dieser holländischen Sorten wurde eine *Neotyphodium*-Besiedlung vermutet. Aus Tab. 31 ist ersichtlich, dass die hier vorgestellten Ergebnisse mit den Untersuchungen anderer Forschergruppen gut übereinstimmen. Allgemein lässt sich feststellen, dass in europäischen *L. perenne*-Sorten der endophytische Pilz *N. lolii* nur selten vorhanden war. Gleichzeitig wurden in den besiedelten Sorten nur geringe Besiedlungsraten gefunden. In allen der oben aufgeführten Untersuchungen lagen die Besiedlungsraten unterhalb von 30 %.

Im Gegensatz hierzu waren die Ökotypen von *L. perenne* aus Rumänien wesentlich mehr mit dem Pilz *N. lolii* besiedelt. Im Saatgut der rumänischen Ökotypensammlung wurde in 24 der 53 untersuchten Proben der endophytische Pilz *N. lolii* nachgewiesen. Die Besiedlungsraten variierten von 3 bis zu 100 %. Auch dieses Ergebnis fügt sich gut in die Beobachtungen anderer Forschergruppen ein. Tab. 32 zeigt einen Überblick über das Vorkommen von *Neotyphodium* spp. in Wildpopulationen von *Lolium* spp. in Europa.

Tab. 32: Vorkommen von *Neotyphodium lolii* in Wildpopulationen von *Lolium* spp. in Europa

Land	Anzahl untersuchter Populationen	Anzahl besiedelter Populationen	Bereich der Besiedlungsrate in %	untersuchtes Material *	Referenz
Tschechoslowakei	4	1	2	P	SACKVILLE-HAMILTON et al., 1993
England	28	17	3-72	K, P	TYLER et al., 1981
Irland	28	11	5-35	K	TYLER et al., 1982
Wales	11	5	1-75	K, P	TYLER et al., 1982
Frankreich	255	188	1-100	K	CHARMET et al., 1990
Frankreich	262	188	-	K	GRAND-RAVEL, 1997
Deutschland	38	33	1-80	P	OLDENBURG, 1994
Italien	24	14	5-76	K	BALFOURIER & CHARMET, 1991
Portugal	14	12	30-90	K	LEWIS et. al., 1997
Rumänien	11	11	15-70	K	TYLER et al., 1981
Rumänien	53	24	3-100	K	eigene Untersuchungen, 1997
Spanien	76	57	5-95	K	LEWIS et al., 1997
Schweiz	21	1	5	K	TYLER et al., 1982; CHORLTON & RHODES, 1983

K = Karyopsen, P = Pflanzentriebe

Der Pilz *Neotyphodium* konnte in fast allen Ländern Europas in Ökotypen der *Lolium* spp. nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Sorten liegen die Besiedlungsraten in den Ökotypen wesentlich höher.

Die Untersuchungen zur Variabilität der *Neotyphodium*-Besiedlung innerhalb einer *L. perenne*-Sorte ergaben nur eine geringe Variabilität in der *Neotyphodium*-Besiedlung. So betragen z. B. die Standardabweichungen der *Neotyphodium*-Besiedlung bei den Sorten lp29-F und lp21-F jeweils nur 3 %, obwohl die verschiedenen Saatgutpartien unterschiedliche Vermehrungsorte besaßen. Dieses steht im Widerspruch zu Untersuchungen von DAPPRICH (1996) und EGGESTEIN (1997), die bei ihren Untersuchungen eine große Variabilität in der *Neotyphodium*-Besiedlung festgestellt haben. Die *Neotyphodium*-Besiedlung ist somit sicherlich nicht vergleichbar mit einer genetisch bedingten Sorteneigenschaft. Jedoch zeigen die Untersuchungen, dass es für eine Sorte bzw. Population einen „idealen Bereich“ der *Neotyphodium*-Besiedlung gibt. In diesem Bereich ist der Nutzen der mutualistischen Symbiose zwischen dem Pilz und der Pflanze größer als der Energieaufwand, der für die Symbiose aufgebracht werden muss. Es ist davon auszugehen, dass die *Neotyphodium*-Besiedlung immer mehr zu einem charakteristischen Merkmal in der Saatgutwirtschaft wird. Denn nach dem heutigen Kenntnisstand können die für die Lebensfähigkeit des *Neotyphodium*-Pilzes bedrohlichen Faktoren, wie Langzeitlagerung, hohe Luftfeuchtigkeit und hohe Temperaturen, wenn nötig, weitgehend ausgeschlossen werden.

Bei Betrachtung der Tab. 31 und Tab. 32 wird deutlich, dass in den europäischen *L. perenne*-Sorten eine wesentlich geringere Anzahl mit dem Pilz *Neotyphodium* besiedelt ist als bei den Wildpopulationen der entsprechenden *Lolium*-Arten. Über diese Diskrepanz zwischen der Besiedlungssituation bei den Sorten und den entsprechenden Ökotypen wurde auch in der Literatur berichtet. So fand LATCH et al. (1987), dass kommerzielle Sorten einen geringeren Befall mit dem Pilz *Neotyphodium* aufwiesen als Wildpopulationen der entsprechenden *Lolium*- und

Festuca-Arten. Auch CAGAS (1991) kam zu vergleichbaren Ergebnissen. Er fand in Rohrschwengel-Ökotypen einen bedeutend höheren Befall mit dem Pilz *Neotyphodium* als in den Sorten der gleichen Art. Nach OLDENBURG (1994) waren 87 % des in Deutschland untersuchten Dauergrünlands mit dem Pilz *Neotyphodium* besiedelt. Die Ursachen für diese Diskrepanz liegen wahrscheinlich in der modernen Gräserzüchtung begründet. OSTBOMKE (1998) hatte in seinen umfangreichen Arbeiten festgestellt, dass vor allem die Selektion und bei ungünstigen Lagerungsbedingungen die Lagerung des Saatgutes einen starken Einfluss auf die *Neotyphodium*-Besiedlung ausübten. Dagegen blieb die *Neotyphodium*-Besiedlung während der vegetativen und generativen Phase der Gräser weitgehend stabil. LATCH et al. (1987) sah vor allem in der Lagerung des Saatgutes vor der erneuten Aussaat die Ursache für die Verbreitung der *neotyphodium*-freien Sorten.

Die Vitalitätsüberprüfung der 24 besiedelten Populationen von *L. perenne* aus Rumänien ergab keinen starken Rückgang in der *Neotyphodium*-Besiedlung. Während der gut zweijährigen Lagerung bei 10 bis 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 30 % wurde somit kein starker Verlust der Vitalität von *N. lolii* im Saatgut der rumänischen Wildpopulationen festgestellt. Dieses zeigt, dass die durch die Lagerung bedingten Verluste in der *Neotyphodium* Vitalität durch geeignete Lagerungsbedingungen weitgehend minimiert werden können.

5.2. Einfluss der *Neotyphodium*-Besiedlung auf die Ertragsbildung von *L. perenne*

Die Ergebnisse der in den Jahren 1996 bis 1998 am Standort Merklingsen mit den neuseeländischen *L. perenne*-Sorten Yatsyn, Embassy und Nui durchgeführten Freilandversuche deuten auf eine Ertragsüberlegenheit der *neotyphodium*-besiedelten Sorten hin. Nach den Ergebnissen hat der Pilz *N. lolii* einen positiven Einfluss auf die Ertragsbildung. Beim Freilandversuch mit der Sorte Yatsyn hatte die *neotyphodium*-besiedelte Variante in den Nutzungsjahren 1997 und 1998 einen tendenziellen Trockenmasse-Mehrertrag als die *neotyphodium*-freie Vergleichsvariante. Zudem war der Trockenmasse-Ertrag der *neotyphodium*-besiedelten Variante jeweils im ersten Schnitt der Nutzungsjahre 1997 und 1998 signifikant höher als der Trockenmasse-Ertrag der *neotyphodium*-freien Vergleichsvariante. Auch die Ergebnisse des Freilandversuches mit den Sorten Yatsyn, Embassy und Nui unterstützen die These, dass der Pilz *N. lolii* einen positiven Einfluss auf den Trockenmasse-Ertrag besitzt. In vier von neun möglichen Fällen beim ersten Schnitt sowie in einem Fall beim zweiten Schnitt des Jahres 1998 war die Ertragsüberlegenheit der *neotyphodium*-besiedelten Variante signifikant. Es wurde kein Fall registriert bei dem die *neotyphodium*-freie Variante einen signifikanten Mehrertrag lieferte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den in Deutschland herrschenden Klimabedingungen sich die Präsenz des Pilzes *N. lolii* in den *L. perenne*-Sorten positiv auf die Ertragsbildung auswirken kann. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass die Freilandversuche mit neuseeländischen Sorten durchgeführt worden sind. Dies war leider notwendig, da es auf den europäischen Markt noch keine *L. perenne*-Sorten mit einer hohen *Neotyphodium*-Besiedlung gibt.

In der Literatur finden sich viele Berichte zur Ertragsüberlegenheit der *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Pflanzen. Der aussagekräftigste Bericht stammt von LATCH et al. (1985). Unter kontrollierten Bedingungen in Neuseeland fanden LATCH et al. (1985) bei den *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Pflanzen im Vergleich zu den nicht besiedelten Pflanzen eine signifikante Erhöhung in der totalen Blattfläche, der Anzahl Halme sowie des Blattwachstums. In durchgeführten Freilandversuchen waren die Ergebnisse eher widersprüchlich. LEWIS & CLEMENTS (1990) fanden in Großbritannien in Freilandversuchen keine Differenzierung beim Trockenmasse-Ertrag zwischen den *neotyphodium*-besiedelten und *neotyphodium*-freien Pflanzen.

Bei dem Düngungsversuch mit der *neotyphodium*-besiedelten Sorte Yatsyn kam es bei den Trockenmasse-Erträgen zu den erwarteten Ergebnissen. Bei der Variante mit der höheren Düngung (260 bzw. 240 kg N/ha Jahr) war der Gesamttrockenmasse-Ertrag im Jahr 1997 und 1998 signifikant höher als bei der Variante mit der niedrigeren Düngung (130 bzw. 120 kg N/ha Jahr). Im Jahr 1997 war bei allen drei Schnitten der Trockenmasse-Ertrag der düngungsintensiveren Variante signifikant höher. Im Jahr 1998 fand sich diese signifikante Ertragsüberlegenheit der düngungsintensiveren Variante im ersten und zweiten Schnitt.

Im Düngungsversuch mit den Sorten Yatsyn, Embassy und Nui ließen die Schnitte des Jahres 1998 keine Wechselwirkung zwischen den Endophytstatus und der Stickstoffdüngung erkennen. Die Ertragsüberlegenheit der *neotyphodium*-besiedelten Varianten war hier beim ersten Schnitt des Jahres 1998 bei allen drei Düngungsvarianten zu finden. Beim zweiten Schnitt des Jahres 1998 fand sich diese signifikante Ertragsüberlegenheit bei der höchsten Düngungsstufe. In der Literatur liegen hierzu sehr unterschiedliche Hinweise vor. ARCHEVALETA et al. (1989) fand bei seinen an *F. arundinacea*-Sorten durchgeführten Untersuchungen eine Wechselwirkung zwischen den Endophytstatus und der Düngung. Erst bei hohen Stickstoffgaben wirkte sich die *Neotyphodium*-Präsenz in den *F. arundinacea* Sorten positiv auf die Ertragsbildung aus. CHEPLICK et al. (1989) spricht von einer Konkurrenz des Pilzes *Neotyphodium* und der Pflanze um die Nährstoffe. OVERMAN & WILKINSON (1993) konnten in ihren Arbeiten jedoch keine derartigen Zusammenhänge feststellen.

5.3. Bildung von Lolitrem B in *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Pflanzen

5.3.1. Lolitrem B-Gehalte in Frischmasseproben aus Freilandversuchen

Die in den Freilandversuchen ermittelten Lolitrem B-Gehalte sind sehr unterschiedlich.

Im Freilandversuch (Sorte Ellett) an den Standorten Asendorf und Merklingsen der Jahre 1995 und 1996 wurden Lolitrem B-Gehalte zwischen nicht nachweisbar und 400 µg/kg TM ermittelt. An beiden Standorten waren jeweils im August des Jahres die höchsten Lolitrem B-Gehalte zu verzeichnen.

In den Jahren 1997 und 1998 wurden bei der Trockenmasse-Ertragsprüfung (Sorte Yatsyn) am Standort Merklingsen Lolitrem B-Gehalte zwischen 26 und 1088 µg/kg TM ermittelt. Auch im Düngungsversuch bei der niedrigen Düngungsstufe (130 bzw. 120 kg N/ha Jahr) waren die ermittelten Lolitrem B-Gehalte vergleichbar. Die Lolitrem B-Gehalte lagen im Bereich zwischen 18 und 1148 µg/kg TM. Bei der Variante mit der intensiveren Düngung (260 bzw. 240 kg N/ha Jahr) zeigte die *neotyphodium*-besiedelte Sorte Yatsyn Lolitrem B-Gehalte, die im Bereich zwischen 84 und 1797 µg/kg TM lagen. Bei drei der sechs durchgeführten Schnitte war der Lolitrem B-Gehalt bei der düngungsintensiveren Variante signifikant erhöht. Diese Ergebnisse zeigten einen deutlichen Einfluss der Düngung auf den Lolitrem B-Gehalt. Mit Zunahme der Düngung erhöhte sich auch der Lolitrem B-Gehalt. Von Bedeutung ist weiterhin die Betrachtung der Einzelergebnisse der Parzellen bei der düngungsintensiveren Variante beim zweiten und dritten Schnitt des Jahres 1997. Bei beiden Schnitten lag der ermittelte Lolitrem B-Gehalt in jeweils zwei Parzellen oberhalb der toxischen Dosis von 2000 µg/kg TM, die zum Ausbruch der Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ führen könnten. Es wurde ein Maximalwert von 2470 µg/kg TM erreicht.

Auf den ersten Blick widersprechen die Ergebnisse des Freilandversuches mit den Sorten Yatsyn, Embassy und Nui der zuvor gemachten Behauptung, dass eine höhere Düngung auch zu einem höheren Lolitrem B-Gehalt in der Pflanze führt. Nur im ersten Schnitt des Jahres 1998 konnte bei der Sorte Embassy dieser positive Einfluss der Düngung auf den Lolitrem B-Gehalt festgestellt

werden. Hier hatte die Variante mit der höchsten Düngungsgabe auch den höchsten Lolitrem B-Gehalt. Zu den anderen Schnittterminen war der Trend eher umgekehrt. So wurde bei den Sorten Embassy und Yatsyn in insgesamt drei Fällen ein signifikant höherer Lolitrem B-Gehalt bei der düngungsärmeren Variante festgestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Lolitrem B-Gehalt von vielen Parametern beeinflusst wird. Neben der Witterung, Düngung, Sorte spielen sicherlich noch weitere Faktoren wie z. B. auch die Schnitthäufigkeit eine wichtige Rolle. Die Ergebnisse der beiden Düngungsversuche lassen sich somit auch nur schlecht miteinander vergleichen und verallgemeinern. Beim ersten Düngungsversuch mit der geringen Schnitthäufigkeit (drei Schnitte pro Nutzungsjahr) wurde ein deutlicher Einfluss der Düngung auf den Lolitrem B-Gehalt in der Pflanze festgestellt. Bei der höheren Düngungsvariante wurden in den meisten Fällen auch signifikant höhere Lolitrem B-Gehalte gefunden. Beim zweiten Düngungsversuch mit der höheren Schnitthäufigkeit (fünf Schnitte pro Nutzungsjahr) war es umgekehrt.

5.3.2. Einfluss der Witterung auf den Lolitrem B-Gehalt

Im folgenden werden die in den Freilandversuchen ermittelten Lolitrem B-Gehalte mit den Witterungsdaten (siehe Anhang Abb. 47 bis Abb. 51) der einzelnen Versuchsjahre in Zusammenhang gebracht. Hierdurch soll der Einfluss der Witterung auf den Lolitrem B-Gehalt verdeutlicht werden.

5.3.2.1. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1994 bis 1996

Versuchsjahr 1995

Am 16.05.1995 erfolgte der erste Schnitt beim Freilandversuch mit der *L. perenne*-Sorte Ellett. Nach den langjährigen Mittelwerten waren die Monate Januar, Februar und April 1995 zu warm und zu nass. Der Monat März zeichnete sich dadurch aus, dass er im Vergleich zu den langjährigen Mitteln zu kalt und zu nass war. Die erste Maidekade brachte frühlingshafte Temperaturen, danach wurde es um die Zeit der „Eisheiligen“ regnerisch und kühl. In diese Zeit fiel der erste Schnitt. In der *neotyphodium*-positiven *L. perenne*-Variante wurde kein Lolitrem B nachgewiesen. Die in den ersten viereinhalb Monaten erreichten Temperaturen reichten nicht aus, um nachweisbare Mengen Lolitrem B zu produzieren.

Der zweite Schnitt fand am 12.07.1995 statt. Hier wurde ein Lolitrem B-Gehalt von 356 µg/kg TM ermittelt. Der gegenüber dem ersten Schnitt höhere Lolitrem B-Gehalt ist auf die höheren Temperaturen zurückzuführen. So wurde es in der letzten Maidekade wesentlich wärmer. Dagegen war der Juni 1995 zu trocken und zu kalt. Die mittlere Tagestemperatur des Juni 1995 betrug 14,2 °C und lag mithin 1,2 °C unter dem Mittelwert. Der Monat Juli 1995 war nach den Mittelwerten zu trocken und zu warm. Die mittlere Tagestemperatur betrug 20,3 °C und lag mithin um 3,2 °C über der des Mittels. An Niederschlägen fielen im Juli 1995 44 mm, 53 % des Mittels. Der August 1995 war nach den Monatswerten im Hellwegraum Soest zu warm und zu nass. Die mittlere Tagestemperatur betrug 19 °C und lag mithin um 2,7 °C über der des Mittels. Die Niederschlagsmenge betrug 99 mm, 118 % des Mittels. Der September 1995 war zu nass und zu kühl, der Oktober 1995 nach den Mittelwerten zu warm und zu trocken. Die beiden letzten Monate November 1995 und Dezember 1995 waren zu trocken und zu kalt im Vergleich zu den langjährigen Mitteln.

Versuchsjahr 1996

Im Vergleich zu den langjährigen Mitteln waren die Monate Januar, Februar und März des Jahres 1996 zu kalt und zu trocken. Der April war wärmer als das langjährige Mittel. Die mittlere Tagestemperatur betrug 8,8 °C und lag um 1,3 °C über der des Mittels. Mit 7,1 mm Niederschläge wurde das Mittel zu 13 % erreicht. Der April war zu trocken. Die mittlere Tagestemperatur des Mai betrug 10,8 °C und lag um 1,5 °C unter der des Mittels. Die Niederschläge im Mai lagen mit 58,7 mm im Bereich des langjährigen Mittels, das Mittel wurde zu 105 % erreicht. Am 31. Mai 1996 wurde der erste Schnitt des Jahres 1996 durchgeführt. In der *neotyphodium*-positiven Variante wurde ein Lolitrem B-Gehalt von 29 µg/kg TM ermittelt. Im Vergleich zum ersten Schnitt des Jahres 1995 konnten diesmal geringe Mengen Lolitrem B nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich auf den späteren Schnittermin (2 Wochen später) zurückzuführen.

Im Juni 1996 lag die mittlere Tagestemperatur bei 15,2 °C, 0,2 °C unter dem langjährigen Mittel. Mit 32,7 mm Niederschläge wurden 44 % des Mittels erreicht. Im Juli 1996 betrug die mittlere Tagestemperatur 15,7 °C, sie lag um 1,3 °C unter der des Mittels. Die Niederschläge im Juli 1996 waren mit denen des langjährigen Mittels vergleichbar, es fielen 80,9 mm, dies entsprach 97 % des Mittels. Die mittlere Tagestemperatur des August 1996 betrug 17 °C, sie lag um 0,4 °C über der des Mittels. Weiter war der August zu nass, die Niederschlagsmenge betrug 98,4 mm, 117 % des Mittels. In der ersten Dekade des Augustes, am 09.08.1996 wurde der zweite Schnitt durchgeführt. In der *neotyphodium*-positiven *L. perenne*-Variante wurde ein Lolitrem B-Gehalt von 374 µg/kg TM nachgewiesen. Der Monat September 1996 war zu kalt und zu trocken. Die mittlere Tagestemperatur betrug 11,3 °C, 2,6 °C unter dem Mittel. Die Niederschlagsmenge betrug 45,8 mm, 75 % des Mittels. Anfang Oktober 1996, am 03.10.1996, wurde der dritte Schnitt durchgeführt. Gegenüber dem zweiten Schnitt des gleichen Jahres ist der Lolitrem B-Gehalt wieder stark zurückgegangen. Dieses ist auf den Rückgang der Temperatur zurückzuführen. In der *neotyphodium*-positiven *L. perenne*-Variante wurde ein Lolitrem B-Gehalt von 48 µg/kg TM ermittelt. Die mittlere Tagestemperatur lag im Oktober 1996 bei 10,0 °C, 0,1 °C über dem Mittel. Die Niederschlagsmenge betrug im Oktober 70,3 mm, 119 % des langjährigen Mittels. Der Monat November war im Vergleich zum langjährigen Mittel zu nass. Der Dezember war zu kalt und zu trocken.

5.3.2.2. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1996 bis 1998

Versuchsjahr 1997

Die Durchschnittstemperaturen lagen im Februar und März des Jahres 1997 weit über dem langjährigen Mittel. Mit 8 mm fielen im Januar sehr geringe Niederschläge. Dagegen waren der Februar und März durch hohe Niederschlagssummen gekennzeichnet. Der März 1997 war im Vergleich zu den langjährigen Mitteln zu warm und zu trocken. Die mittlere Tagestemperatur lag bei 6,6 °C, 2,1 °C über dem Mittel. Die Niederschlagsmenge betrug 28 mm, 74 % des Mittels. Die mittlere Tagestemperatur im April betrug 7,4 °C, 0,1 °C unter dem Mittel. Die Niederschlagsmenge betrug 36 mm, 67 % des Mittels. Die mittlere Tagestemperatur im Mai betrug 13,0 °C, 0,7 °C über dem Mittel. Die Niederschlagsmenge betrug 50 mm, 89 % des Mittels. Am 26.05.1997 wurde der erste Schnitt durchgeführt. Die ermittelten Lolitrem B-Gehalte der *neotyphodium*-positiven *L. perenne*-Varianten (Sorte Yatsyn) betrug 18 µg/kg TM (Düngung: 130 g N/ha Jahr) und 84 µg/kg TM (Düngung: 260 kg N/ha Jahr). Diese Lolitrem B-Gehalte sind mit dem gefundenen Lolitrem B-Gehalt (Sorte Ellett) beim ersten Schnitt des Jahres

1996 vergleichbar, Ende Mai wurden bei beiden Freilandversuchen nur geringe Lolitrem B-Gehalte ermittelt.

Die durchschnittlichen Tagestemperaturen der Monate Juni und Juli 1997 lagen über dem Durchschnitt. Die Tagestemperatur im Juni lag bei 15,9 °C, 0,5 °C über dem Mittel. Im Juli betrug die durchschnittliche Tagestemperatur 17,4 °C, 0,4 °C über dem Mittel. Gleichzeitig waren diese Monate durch hohe Niederschläge gekennzeichnet. Im Juni fielen 103 mm, 139 % des Mittels. Die Niederschlagssumme im Juli 1997 betrug 98 mm, 118 % des Mittels. Mitte Juli, am 16.07.1997, kam es zu einem starken Anstieg beim Lolitrem B-Gehalt. In der *neotyphodium*-positiven Versuchsvariante fanden sich im Mittel Lolitrem B-Gehalte von 1140 µg/kg TM (Düngung: 130 kg N/ha Jahr) und 1771 µg/kg TM (Düngung: 260 kg N/ha Jahr). Der wesentlich höhere Lolitrem B-Gehalt im Vergleich zum zweiten Schnitt des Freilandversuchs 1994 bis 1996 (siehe Kapitel 5.3.2.1) im Jahr 1996 ist wahrscheinlich auf die höhere Düngung zurückzuführen. Die etwas höhere Durchschnittstemperatur im Juni/Juli 1997 gegenüber den Monaten Juni/Juli 1996 spielt sicherlich nur eine untergeordnete Rolle.

Die Monate August und September waren im Vergleich zu den langjährigen Mitteln zu warm und zu trocken. Die durchschnittliche Tagestemperatur im August lag bei 20,3 °C, sie lag somit um 3,7 °C über dem Mittel. Die Niederschlagssumme betrug 24 mm, 29 % des Mittels. Im September 1997 lag die durchschnittliche Tagestemperatur bei 14,3 °C, 0,4 °C über dem Mittel. Im September fielen 8 mm Niederschläge, 13 % des Mittels. Die Auswirkungen dieser für August, September und der ersten Dekade des Oktobers ungewöhnlichen, warmen Witterungsbedingungen spiegeln sich im Lolitrem B-Gehalt des dritten Schnittes im Jahr 1997 wieder. Im Gegensatz zum Jahr 1996 wurden im Jahr 1997 im Oktober die höchsten Lolitrem B-Gehalte gefunden. Am 17.10.1997 wurden in der *neotyphodium*-positiven Versuchsvariante Lolitrem B-Gehalte von 1148 µg/kg TM (Düngung: 130 kg N/ha Jahr) und 1797 µg/kg TM (Düngung: 260 kg N/ha Jahr) nachgewiesen. Im Jahr 1997 kam es somit nicht zu einem Rückgang des Lolitrem B-Gehaltes. Hier zeigt sich die Temperaturabhängigkeit des Lolitrem B-Gehaltes, mit Zunahme der Temperatur nimmt auch die Lolitrem B-Produktion zu. Diese Temperaturabhängigkeit konnte auch in Klimakammerversuchen bewiesen werden (siehe Kapitel 4.8).

Im Oktober 1997 lag die durchschnittliche Tagestemperatur bei 9,3 °C, 0,6 °C über dem Mittel. Die Niederschlagsmenge betrug 63 mm, 107 % des Mittels. Die Monate November und Dezember des Jahres 1997 waren zu warm. Weiter war der November zu trocken und der Dezember zu nass.

Versuchsjahr 1998

Im Vergleich zu dem langjährigen Mittel waren die Monate Januar und Februar des Jahres 1998 zu warm und zu trocken. Im Januar lag die mittlere Tagestemperatur bei 4,7 °C, 3,5 °C über dem langjährigen Mittel. Die Niederschlagssumme betrug 37,5 mm, 65 % des Mittels. Im Februar fielen nur 5,4 mm Niederschläge, 11 % des Mittels. Die mittlere Tagestemperatur war mit 6,6 °C 5 °C höher als die mittlere Tagestemperatur des langjährigen Mittels. Die Monate März und April waren im Vergleich zu dem langjährigen Mittel zu warm und zu nass. Die mittlere Tagestemperatur lag im März bei 6,9 °C, im April bei 9,5 °C, sie war gegenüber dem Mittel um 2,4 °C bzw. 2 °C erhöht. Die Niederschlagssumme lag im März bei 77,8 mm, im April bei 72,7 mm. Dies waren 205 % bzw. 135 % des langjährigen Mittels. Die mittlere Tagestemperatur im Mai betrug 14,4 °C, 2,1 °C über dem Mittel. Bei einer Niederschlagsmenge von 30,1 mm war der Monat Mai trockener als der Durchschnitt (54 % des Mittels).

Am 28.05.1998 wurde der erste Schnitt durchgeführt. Die ermittelten Lolitrem B-Gehalte der *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Variante lagen für die höhere Düngungsstufe (240 kg N/ha Jahr) im Mittel bei 249 µg/kg TM. Die Lolitrem B-Gehalte der niedrigeren Düngungsstufe (120 kg N/ha Jahr) lagen im Mittel bei 102 µg/kg TM. Diese Lolitrem B-Gehalte sind wesentlich höher

als die Lolitrem B-Gehalte des ersten Schnittes 1997, der zum fast identischen Termin durchgeführt wurde. Ursache für diese gegenüber 1997 erhöhten Werte könnte die Witterung sein. Die Monate März, April und Mai des Jahres 1998 waren alle um 1-2 °C wärmer als die gleichen Monate des Jahres 1997.

Der Monat Juni hatte eine mittlere Tagestemperatur von 16,3 °C, 0,9 °C über dem Mittel. Weiter war Juni ein sehr nasser Monat. Es fielen 135,9 mm Niederschläge. Im Vergleich zum langjährigen Mittel waren dies 184 %. Die mittlere Tagestemperatur des Monats Juli lag mit 16,2 °C 0,8 °C unter der des Mittels. Auch die Niederschläge waren mit 74,3 mm etwas geringer als die des langjährigen Mittels (90 % des Mittels). In der ersten Augustwoche, am 03.08.1998, wurde der zweite Schnitt durchgeführt. Wie im ersten Versuchsjahr kam es auch im zweiten Versuchsjahr beim zweiten Schnitt zu einem starken Anstieg beim Lolitrem B-Gehalt. Der Wert lag bei der geringeren Düngung im Mittel bei 803 µg/kg TM. Der mittlere Lolitrem B-Gehalt bei der höheren Düngungsvariante betrug 1203 µg/kg TM. Die im zweiten Versuchsjahr ermittelten Lolitrem B-Gehalte waren nicht mehr so hoch wie beim zweiten Schnitt des ersten Versuchsjahres. Ein Vergleich der Witterungsdaten von 1997 und 1998 zeigt, dass die mittleren Tagestemperaturen und die Niederschläge in den Monaten Juni und Juli der beiden Jahre vergleichbar sind. Somit kann die Witterung als Ursache für diese unterschiedlichen Lolitrem B-Gehalte ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache für diese unterschiedlichen Lolitrem B-Gehalte könnte die unterschiedliche Düngung darstellen. Nach dem ersten Schnitt des ersten Versuchsjahres wurden mit einer Aufwandmenge von 80 bzw. 40 kg N/ha Jahr gedüngt. Im zweiten Versuchsjahr war die Aufwandmenge nach dem ersten Schnitt mit 60 bzw. 30 kg N/ha Jahr etwas geringer.

Die durchschnittliche Tagestemperatur im August lag bei 17,1 °C, sie lag um 0,5 °C über dem Mittel. Die Niederschlagssumme war 74,5 mm, 89 % des Mittels. Im September 1998 lag die durchschnittliche Tagestemperatur bei 14,5 °C, 0,6 °C über dem Mittel. Der September war sehr nass, es fielen 130,8 mm Niederschläge, 214 % des langjährigen Mittels. Im Oktober lag die mittlere Tagestemperatur bei 9,7 °C, 0,2 °C über der des langjährigen Mittels. Weiter wurde im Oktober bei der Niederschlagssumme mit 167 mm (283 % des Mittels) der Höchstwert aller Monate erreicht. Am 15.10.1998 wurde der dritte Schnitt durchgeführt. Für die Variante mit der geringeren Düngung wurde ein mittlerer Lolitrem B-Gehalt von 237 µg/kg TM ermittelt. Die Variante mit der höheren Düngung zeigte einen mittleren Lolitrem B-Gehalt von 196 µg/kg TM. Gegenüber dem Jahr 1997 waren im zweiten Versuchsjahr die Lolitrem B-Gehalte wesentlich geringer. Die Werte sind wieder in den Bereich des ersten Schnittes gefallen. Der Grund des hohen Lolitrem B-Gehaltes im Jahr 1997 war die außergewöhnlich hohe mittlere Tagestemperatur im August sowie in der ersten Dekade des Oktobers. Daneben könnte auch noch die Niederschlagsmenge eine gewisse Rolle gespielt haben. So fällt auf, dass im September und Oktober 1998 mit 297,8 mm Niederschläge ungefähr dreimal soviel Niederschläge zu verzeichnen waren als in den gleichen Monaten des Jahres 1997. Hier fielen insgesamt nur 117,8 mm Niederschläge.

Der Monat November war kälter und nasser als das langjährige Mittel. Die mittlere Tagestemperatur lag bei 3,6 °C, 1,8 °C unter dem langjährigen Mittel. Die Niederschlagsmenge betrug 70,5 mm, 126 % des Mittels. Dagegen war der Dezember wieder wärmer und trockener als das Mittel. Die Niederschlagssumme betrug 26,6 mm, 52 % des Mittels. Die mittlere Tagestemperatur lag mit 3,9 °C 1,3 °C über dem langjährigen Mittel.

5.3.2.3. Freilandversuch mit *L. perenne* am Standort Merklingsen von 1997 bis 1998

Versuchsjahr 1998

Der Einfluss der Witterung auf den Lolitrem B-Gehalt in den Sorten Embassy, Nui und Yatsyn war uneinheitlich.

Bei der Sorte Yatsyn zeigte sich ein ähnlicher Verlauf des Lolitrem B-Gehaltes während der Vegetationsperiode wie beim zuvor beschriebenen Freilandversuch (siehe 5.3.2.2). Zu Beginn und am Ende der Vegetationsperiode wurden für die Sorte Yatsyn die geringsten Lolitrem B-Gehalte ermittelt. Im Mai beim ersten Schnitt lagen die ermittelten Lolitrem B-Gehalte im Bereich zwischen 393 und 454 µg/kg TM. Im Oktober beim fünften Schnitt wurden Lolitrem B-Gehalte im Bereich zwischen 170 und 263 µg/kg TM gefunden. Mit dem weiteren Anstieg der mittleren Tagestemperatur in den Monaten Juni, Juli und August steigt auch der Lolitrem B-Gehalt in der Sorte Yatsyn an. Die höchsten Lolitrem B-Gehalte wurden beim dritten Schnitt im August erreicht. Hier lagen die Lolitrem B-Gehalte im Bereich zwischen 683 und 1136 µg/kg TM. Die ermittelten Werte für den vierten Schnitt waren mit denen des dritten vergleichbar (Bereich 754 – 1049 µg/kg TM).

Für die Sorte Embassy wurden die geringsten Lolitrem B-Gehalte gegen Ende der Vegetationsperiode ermittelt. Beim fünften Schnitt lagen die Lolitrem B-Gehalte für die Sorte Embassy im Bereich zwischen 160 und 218 µg/kg TM. Entgegen dem Trend wurden beim ersten Schnitt, im Mai, bei der Sorte Embassy die höchsten Lolitrem B-Gehalte erreicht. Sie lagen im Bereich zwischen 507 bis 712 µg/kg TM. Diese Gehalte waren vergleichbar mit denen des dritten Schnittes. Auch hier lagen die Lolitrem B-Gehalte im Bereich zwischen 577 und 705 µg/kg TM. Die ermittelten Lolitrem B-Gehalte des zweiten und vierten Schnittes lagen im Bereich zwischen 467 und 567 µg/kg TM.

Auch bei der Sorte Nui wurden die höchsten Lolitrem B-Gehalte im ersten Schnitt ermittelt. Je nach Düngungsstufe lagen die Lolitrem B-Gehalte im Bereich zwischen 166 und 178 µg/kg TM. Zu den nächsten vier Schnittterminen variierte der Lolitrem B-Gehalt nur unwesentlich. Die Lolitrem B-Gehalte lagen im Bereich zwischen 16 und 117 µg/kg TM.

5.3.3. Lolitrem B-Gehalt einzelner Individuen innerhalb einer Sorte bzw. Population von *L. perenne* (Bestimmung des Stichprobenumfanges)

Die in Kapitel 4.7 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass der Lolitrem B-Gehalt bei den einzelnen Individuen innerhalb einer Sorte bzw. Population stark schwankt. Dies wird erklärbar durch die große genetische Variabilität der Gräser innerhalb einer Population bzw. Sorte. Gleichzeitig spielt sicherlich auch die genetische Variabilität des Pilzes *N. lolii* eine Rolle. Zur Kompensation dieser großen genetischen Variabilität sollte bei der Untersuchung des Lolitrem B-Gehaltes einer Population bzw. Sorte eine Mischprobe von möglichst vielen Pflanzen untersucht werden. Es muss jedoch ein Kompromiss zwischen Durchführbarkeit und Genauigkeit des Ergebnisses geschlossen werden. Zur Abschätzung des Stichprobenumfanges wurde die Veränderung des Mittelwertes des Lolitrem B-Gehaltes gegen die Anzahl der berücksichtigten Pflanzen aufgetragen.

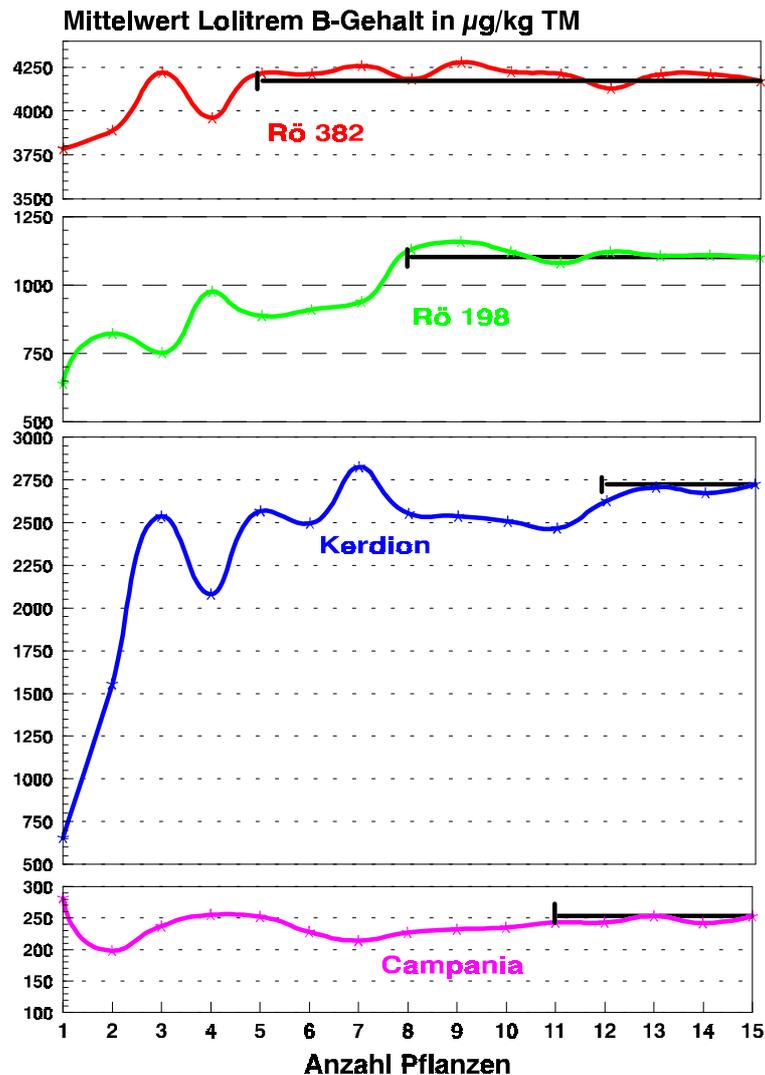


Abb. 43: Veränderung des Mittelwertes des Lolitrem B-Gehaltes mit Zunahme der Stichprobenumfangs von *Lolium perenne*-Versuchspflanzen

Aus Abb. 43 wird deutlich, dass mit Zunahme des Stichprobenumfangs (Anzahl Pflanzen) sich der ermittelte Lolitrem B-Gehalt dem wahren Wert immer mehr annähert. Bei den rumänischen Ökotypen zeigte sich, dass der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes ab fünf bzw. acht Pflanzen nahezu konstant ist. Ab einem Stichprobenumfang von fünf bzw. acht Pflanzen war die Abweichung vom Mittelwert kleiner als 5 %.

Bei den *L. perenne*-Sorten stellte sich heraus, dass bei den Sorten Kerdion und Campania ab 12 bzw. 11 Einzelpflanzen nahezu konstante Werte erreicht wurden.

Für die Praxis bedeutet dies, dass für die Lolitrem B-Bestimmung ein Stichprobenumfang von ca. 10-12 Pflanzen ausreichend ist. Dies gilt jedoch nur dann, wenn alle Pflanzen mit dem Pilz *N. lolii* besiedelt sind. Bei geringeren Besiedlungsraten sollte der Stichprobenumfang erhöht werden. Bei Besiedlungsraten unterhalb von 50 % ist es zweckmäßiger, vor der Lolitrem B-Bestimmung den Endophytstatus zu überprüfen und nur *neotyphodium*-positive Pflanzen für die Lolitrem B-Untersuchung zu verwenden.

Die große Bandbreite des Lolitrem B-Gehaltes ist wie schon weiter oben beschrieben auf die große genetische Variabilität der Gräser und auch der *Neotyphodium*-Pilze zurückzuführen. Die im allgemeinen geringere genetische Variabilität bei den Ökotypen im Gegensatz zu den Sorten wird auch in den Ergebnissen deutlich. Bei den Ökotypen reichte ein Stichprobenumfang von fünf

bzw. acht Einzelpflanzen, bei den Sorten waren 11 bzw. 12 Einzelpflanzen notwendig, um einen konstanten Mittelwert zu erhalten.

5.3.4. Temperaturabhängigkeit des Lolitrem B-Gehaltes in der Pflanze

Sowohl im Versuch mit drei Sorten als auch im orientierenden Vorversuch mit den vier Sorten und vier Ökotypen wurde ein eindeutiger Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt nachgewiesen.

Beim Versuch mit den Sorten Yatsyn, Embassy und Nui wurde bei der niedrigeren Temperaturvariante (17 °C Tag / 10 °C Nacht) ein mittlerer Lolitrem B-Gehalt von 406 µg/kg TM ermittelt, bei der höheren Temperaturvariante (27 °C Tag / 19 °C Nacht) lag der durchschnittliche Lolitrem B-Gehalt bei 2650 µg/kg TM. Bei diesem Versuch führte die Erhöhung der Temperatur um 10 °C zu einer Erhöhung des Lolitrem B-Gehaltes um das sechseinhalbfache. Diese Erhöhung des Lolitrem B-Gehaltes bei der höheren Temperatur wurde in allen untersuchten Sektionen (Blattscheide, Blattspreite und Wurzeln) festgestellt. Auffällig war weiterhin, dass der geringste Unterschied zwischen den Lolitrem B-Gehalten der verschiedenen Temperaturvarianten in der Blattscheidensektion zu finden war. Bei der Sorte Yatsyn und der Sorte Embassy waren die Lolitrem B-Gehalte bei der höheren Temperatur um das fünf bzw. dreifache erhöht, in der Blattspreitensektion betragen diese Werte das zwölfwache (Yatsyn) bzw. achtfache (Embassy). In der Wurzelsektion war der Lolitrem B-Gehalt bei der wärmeren Temperaturvariante gegenüber der kälteren Temperaturvariante um das zweiunddreißigfache (Yatsyn) bzw. das zwölfwache (Embassy) erhöht. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass mit Zunahme der Temperatur auch die Translokation des Lolitrem B innerhalb der Pflanze zunimmt. Das Lolitrem B wird bei einer höheren Temperatur schneller vom Ort seiner Entstehung (Blattscheiden) zu anderen Orten in der Pflanze (Wurzeln, Blattspreiten) transportiert. Somit kommt es zu den größeren Unterschieden im Lolitrem B-Gehalt in den Wurzel- und Blattspreitensektion der beiden verschiedenen Temperaturvarianten.

Beim orientierenden Vorversuch wurde im Mittel durch die Erhöhung der Temperatur um 10 °C eine siebenfache Erhöhung des Lolitrem B-Gehaltes erreicht. Der durchschnittliche Lolitrem B-Gehalt gemittelt über alle Sorten und Ökotypen betrug bei der niedrigeren Temperatur (17 °C Tag / 10 °C Nacht) 212 µg/kg TM, bei der höheren Temperatur (27 °C Tag / 19 °C Nacht) betrug der durchschnittliche Lolitrem B-Gehalt gemittelt über alle Sorten und Ökotypen 1499 µg/kg TM. Dabei ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass bei drei Ökotypen sowohl bei der kälteren als auch bei der wärmeren Temperatur kein Lolitrem B nachweisbar war.

Die Temperaturabhängigkeit des Lolitrem B-Gehaltes wird auch in den durchgeführten Freilandversuchen deutlich. Die höchsten Lolitrem B-Gehalte wurden immer nach warmen Perioden verzeichnet. Die geringsten Lolitrem B-Gehalte wurden zu Beginn der Vegetationsperiode im Mai und im Oktober verzeichnet. Die höchsten Werte wurden im allgemeinen im Hochsommer Ende August festgestellt.

In der Literatur gibt es nur wenige Hinweise auf Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit des Lolitrem B-Gehaltes in mit *neotyphodium*-besiedelten Gräsern. Nach BALL et al. (1995) wurden noch keine Berichte über die Effekte der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt bei kontrollierten Bedingungen veröffentlicht. Jedoch konnten DI MENNA et al. (1992) in Freilandversuchen einen Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt nachweisen. Wahrscheinlich ist der Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt indirekt. Durch eine Erhöhung der Temperatur kommt es innerhalb der Pflanze zu einem schnelleren Pilzwachstum von *N. lolii*. Nach Ergebnissen mehrerer Forschergruppen (MORTIMER et al., 1984; DI MENNA & WALLER, 1986) nimmt die *N. lolii*-Konzentration mit Zunahme der Temperatur zu. Hierdurch kommt es somit zu einer größeren Lolitrem B-Produktion bzw. einem höheren Lolitrem B-Gehalt. Neben dem Wachstum

des Pilzes wird durch die Temperaturänderung auch das Pflanzenwachstum und somit auch über diesen Weg der Lolitrem B-Gehalt beeinflusst.

Andererseits wäre auch eine direkte Beeinflussung des Lolitrem B-Gehaltes durch die Temperaturänderung denkbar. Durch die Temperaturerhöhung würde die Produktionsrate von Lolitrem B erhöht.

5.3.5. Verteilung des Lolitrem B innerhalb der Pflanze

Die Untersuchungen zur Verteilung von Lolitrem B innerhalb der Pflanze zeigten, dass im vegetativen Stadium die höchsten Lolitrem B-Gehalte in der Blattscheidensektion zu finden waren. Dieses traf für alle drei untersuchten Sorten sowohl bei der kälteren als auch bei der wärmeren Temperatur zu. Gemittelt über alle drei Sorten wurde bei der kälteren Temperatur 86,9 % des Lolitrem B in der Blattscheidensektion nachgewiesen. In der Blattspreitensektion fanden sich 10,8 % und in der Wurzelsektion 2,3 % des gesamten Lolitrem B. Bei der wärmeren Temperatur war diese Verteilung etwas zu Gunsten der Blattspreiten- und Wurzelsektion verschoben. In der Blattscheidensektion wurden 62,8 % des gesamten Lolitrem B nachgewiesen. Auf die Blattspreiten- bzw. Wurzelsektion verteilten sich 24,8 bzw. 12,4 % des Lolitrem B. In der Abb. 44 ist dieser Sachverhalt noch einmal graphisch dargestellt.

Lolitrem B-Gehalt in rel. [%]		
	Temperaturvariante I 17 °C/10 °C (Tag/Nacht)	Temperaturvariante II 29 °C/19 °C (Tag/Nacht)
 <p>Sektion Blattspreite, 5-x cm</p>	10,8 %	24,8 %
<p>Sektion Blattscheide, 1-5 cm</p>	86,9 %	62,8 %
<p>Sektion Wurzeln</p>	2,3 %	12,4 %

Abb. 44: Relative Verteilung in % von Lolitrem B innerhalb von *Lolium perenne*-Pflanzen, Kultur in zwei verschiedenen Temperaturregimen

Es ist verständlich, dass die höchsten Lolitrem B-Gehalte in der Blattscheidensektion beobachtet wurden. Denn die Blattscheidensektion ist der Ort, wo auch die höchste Myceldichte des Pilzes *N. lolii* ist (KEOGH & TAPPER, 1993; BALL et al., 1995). Da der Pilz selber der Produzent des Naturstoffes Lolitrem B ist, ist hier auch der Lolitrem B-Gehalt am höchsten. Nach dem heutigen Kenntnisstand ist es bisher noch nicht gelungen, den Pilz *N. lolii* in den Wurzeln direkt nachzuweisen, oder den Pilz aus den Wurzeln zu isolieren.

Die hier dargestellten Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen von HERD et al. (1997). HERD et al. (1997) untersuchten in ihren Arbeiten die Verteilung der metabolischen Aktivität des Pilzes *Neotyphodium* innerhalb der Pflanze. Es zeigte sich, dass 70 % der endophytischen, metabolischen Aktivität in der Blattscheidensektion zu finden waren. In der hier vorliegenden Arbeit wurden im Durchschnitt gemittelt über alle Sorten und Temperaturvarianten 75 % des gebildeten Lolitrem B in der Blattscheidensektion nachgewiesen. Auch in den Wurzeln fanden HERD et al. (1997) eine endophytische metabolische Aktivität. Hierdurch wird die Tatsache, dass auch in den Wurzeln Lolitrem B nachweisbar war, erklärbar.

Den in der Literatur vorhandenen Berichten über die Verteilung des Lolitrem B innerhalb der Pflanze lagen unterschiedliche Methoden und Vorgehensweisen zugrunde. Die untersuchten Pflanzenteile bzw. Einteilung der Pflanze in verschiedene Sektionen variierten sehr stark. Jedoch wurde in allen Berichten (KEOGH & TAPPER, 1993; BALL et al., 1995, 1997) festgestellt, dass im basalen Teil der Pflanze, d. h. in der Blattscheidensektion, die höchsten Lolitrem B-Gehalte zu finden sind. Am umfangreichsten waren die Arbeiten von BALL et al. (1997). Im vegetativen Stadium der *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Pflanzen fanden sich die höchsten Lolitrem B-Gehalte in älteren Blattscheiden sowie in totem Blattmaterial. Im generativen Stadium der Pflanzen fanden sich dagegen die höchsten Lolitrem B-Gehalte in den Karyopsen, ca. 60 % des gesamten Lolitrem B.

5.3.6. Lolitrem B-Gehalte in Sorten und Ökotypen von *L. perenne*

Beim Vergleich der Lolitrem B-Gehalte in Frischmasse- bzw. Karyopsenproben von Sorten und Ökotypen von *L. perenne* fällt auf, dass trotz einer ähnlichen oder gleichen *Neotyphodium*-Besiedlungsrate der Lolitrem B-Gehalt sehr stark variieren kann. Bei den Freilandversuchen mit den Sorten Yatsyn, Embassy und Nui hatten diese Sorten eine ähnliche *Neotyphodium*-Besiedlungsrate, sie lagen zwischen 72 und 83 %. Trotz dieser ähnlichen Besiedlungsraten waren die Lolitrem B-Gehalte sehr unterschiedlich. Yatsyn hatte mit 600 µg/kg TM den höchsten durchschnittlichen Lolitrem B-Gehalt, gefolgt von Embassy mit 502 µg/kg TM. Nui hatte trotz einer höheren *Neotyphodium*-Besiedlung als Embassy mit 91 µg/kg TM den geringsten Lolitrem B-Gehalt.

In den Klimakammerversuchen waren die Verhältnisse vergleichbar. Auch hier hatte die Sorte Yatsyn mit durchschnittlich 2661 µg/kg TM den höchsten Lolitrem B-Gehalt, Embassy einen durchschnittlichen Lolitrem B-Gehalt von 1542 µg/kg TM und die Sorte Nui den geringsten Lolitrem B-Gehalt mit 382 µg/kg TM. Im Freiland hatten die Lolitrem B-Gehalte der Sorten Yatsyn, Embassy und Nui ein Verhältnis von 6,6:5,5:1. In den Klimakammerversuchen betrug dieses Verhältnis 6,9:4,0:1.

Auch in den Gewächshausversuchen mit den Sorten Kerdion und Campania sowie den Ökotypen Rö 198 und Rö 382 war der gleiche Sachverhalt feststellbar. Die Sorte Campania hatte trotz einer 100 %igen *Neotyphodium*-Besiedlung nur einen durchschnittlichen Lolitrem B-Gehalt von 253 µg/kg TM. Die Sorte Kerdion hatte bei gleicher Besiedlung mit 2726 µg/kg TM einen fast elffach höheren Lolitrem B-Gehalt. Bei den rumänischen Ökotypen war es ähnlich. Der rumänische Ökotyp Rö 198 hatte einen durchschnittlichen Lolitrem B-Gehalt von 1102 µg/kg TM; der rumänische Ökotyp Rö 382 einen von 4172 µg/kg TM bei gleicher Besiedlung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Lolitrem B-Gehalt nicht von der Besiedlungsrate abhängig ist. Vielmehr muss der Lolitrem B-Gehalt als sortenspezifische Eigenschaft angesehen werden. Eine hohe Besiedlungsrate mit dem Pilz *Neotyphodium lolii* bedeutet nicht gleichzeitig einen hohen Lolitrem B-Gehalt.

5.4. Vorkommen der Alkaloide Lolitrem B und Paxillin *in vitro*

In der Abb. 45 sind die Ergebnisse der *in vitro*-Bestimmung von Lolitrem B und Paxillin gegenübergestellt.

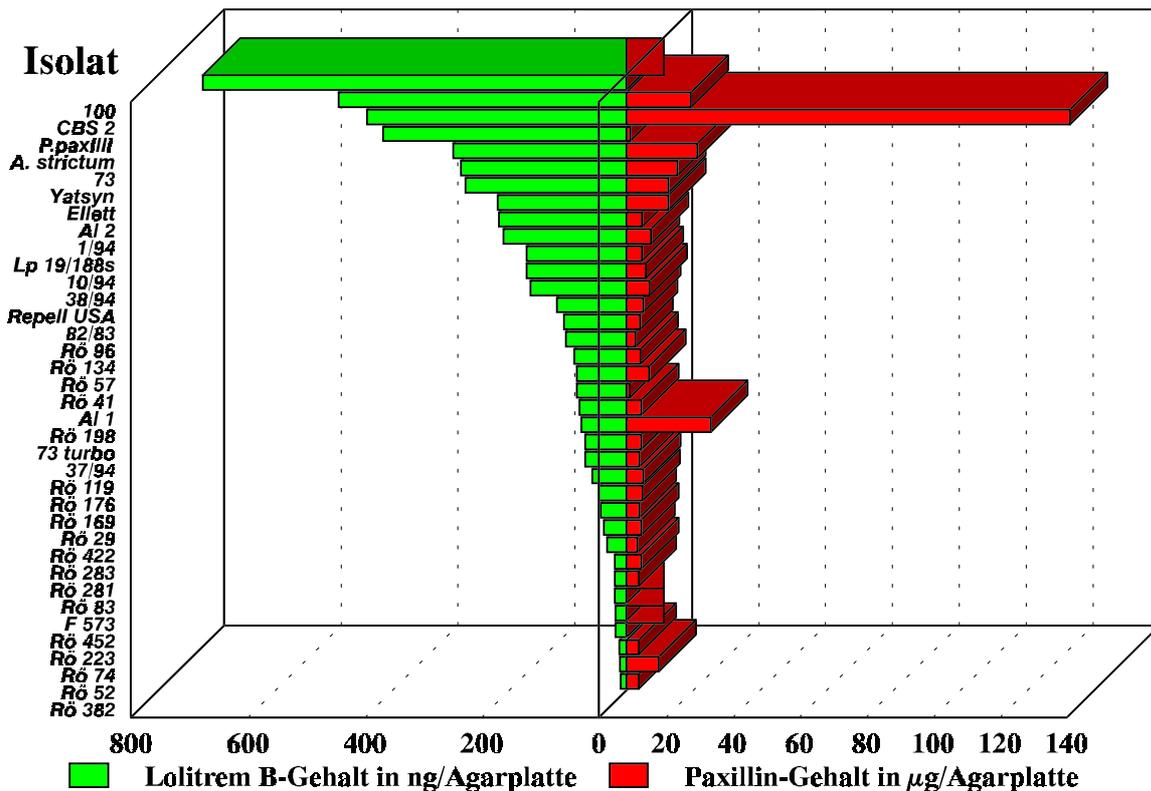


Abb. 45: Lolitrem B-Gehalte in ng/Agarplatte und Paxillin-Gehalte in µg/Agarplatte von verschiedenen *Neotyphodium lolii*- und weiteren Pilz-Isolaten nach achtwöchiger *in vitro*-Kultur auf GPYE-Agar

Der Vergleich der Lolitrem B- und Paxillin-Gehalte aller *N. lolii*-Pilze lässt keinen eindeutigen Zusammenhang erkennen. Das *Neotyphodium*-Isolat 100 hatte mit 725 ng/Agarplatte den höchsten Lolitrem B-Gehalt, jedoch ließ sich bei diesem Isolat kein Paxillin nachweisen. Dies würde bedeuten, dass bei diesem Isolat vorhandenes Paxillin sehr schnell metabolisiert wird. Dies erklärt den sehr hohen Lolitrem B-Gehalt. Daneben gibt es aber auch zwei Isolate, Isolat F 573 und das Isolat des Rö 452, bei denen der Lolitrem B-Gehalt mit ca. 20 ng/Agarplatte als gering einzustufen ist, und trotzdem kein Paxillin nachweisbar war. Diese Ergebnisse offenbaren die große Variabilität der *N. lolii*-Isolate. Obwohl es sich bei fast allen untersuchten Isolaten um *N. lolii*-Isolate handelt, ist die Lolitrem B- und Paxillin-Produktion sehr unterschiedlich.

Die Lolitrem B-Gehalte der untersuchten *N. lolii*-Isolate aus *L. perenne*-Sorten variierten zwischen 20 und 725 ng/Agarplatte. Der durchschnittliche Lolitrem B-Gehalt dieser Sorten betrug

225 ng/Agarplatte. Auch PENN et al. (1993) fanden bei ihren Arbeiten bei *N. lolii*-Isolaten vergleichbare Werte. Vier französische *N. lolii*-Isolate zeigten Lolitrem B-Gehalte zwischen 200 und 700 ng/Agarplatte. Auch die ermittelten Paxillin-Gehalte lagen in ähnlichen Bereichen wie bei PENN et al. (1993) beschrieben.

Im Vergleich zu den *L. perenne*-Sorten und den Arbeiten von PENN et al. (1993) zeigten die Isolate der Ökotypen aus Rumänien wesentlich geringere Lolitrem B-Gehalte. Die Lolitrem B-Gehalte variierten zwischen 11 und 108 ng/Agarplatte. Der Mittelwert des Lolitrem B-Gehaltes der rumänischen Ökotypen lag bei 48 ng/Agarplatte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Schaffung von *N. lolii*-Elitestämme zur Überwindung des toxischen Problems durchaus ein gangbarer Weg ist. Es ist durchaus denkbar, dass es *N. lolii*-Isolate gibt, die kein Lolitrem B bilden.

Interessant sind weiterhin die Ergebnisse des *A. strictum*- und *P. paxilli*-Isolates. Beide Isolate hatten mit 416 bzw. 444 ng/Agarplatte eine sehr hohe Lolitrem B-Produktion. Nicht überraschend war der hohe Paxillin-Gehalt des *P. paxilli*-Isolates. Mit 133 µg/Agarplatte hatte dieses Isolat den höchsten Wert. So gilt der Pilz *P. paxilli* als Hauptproduzent des Naturstoffes Paxillin (COLE et al., 1974).

5.5. Vergleich der *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen

Ein Ziel der aktuellen *Neotyphodium*-Forschung ist es, *Neotyphodium*-Isolate zu finden, die wenig oder gar kein Lolitrem B bilden. Nach erfolgreicher Inokulation dieser Stämme in *L. perenne*-Sorten könnten so neue, innovative *L. perenne*-Sorten mit spezifischen Eigenschaften (Lolitrem B-frei, Trockenstressresistenz, Schadinsektenresistenz etc.) entstehen. Ausgehend von diesem Gedanken wurden in der hier vorliegenden Arbeit zuerst *in vivo*-Untersuchungen zum Vorkommen des Alkaloids Lolitrem B in *L. perenne*-Wildpopulationen aus Rumänien durchgeführt (siehe Kapitel 4.4). In 18 der 22 untersuchten Proben der rumänischen Wildpopulationen wurde trotz einer 100 %igen *Neotyphodium lolii*-Besiedlung der Pflanze zu jeweils acht verschiedenen Terminen kein Lolitrem B nachgewiesen. Konsequenterweise wurden im nächsten Schritt die *Neotyphodium*-Pilze isoliert und die entsprechenden *in vitro*-Kulturen auf ihre Lolitrem B-Produktion untersucht. In der Tab. 33 sind die *in vitro*-Untersuchungen den *in vivo*-Untersuchungen gegenübergestellt.

Aus Tab. 33 wird deutlich, dass zwischen dem Lolitrem B-Gehalt in der *in vitro*-Kultur und dem Lolitrem B-Gehalt in der entsprechenden Wirtspflanze (*in vivo*-Untersuchung) keine direkte Korrelation besteht. So hatte z. B. der rumänische Ökotyp Rö 382 in der Wirtspflanze mit 2427 µg/kg TM einen sehr hohen Lolitrem B-Gehalt. In der *in vitro*-Kultur hatte das Isolat des rumänischen Ökotyps Rö 382 dagegen mit 11 ng/Agarplatte den niedrigsten Wert. Ein anderes Extrem ist das Isolat des rumänischen Ökotyps Rö 96. In der Wirtspflanze ließ sich kein Lolitrem B nachweisen, dagegen fand sich in der *in vitro*-Kultur mit 108 ng/Agarplatte ein verhältnismäßig hoher Lolitrem B-Gehalt. Diese Ergebnisse zeigen, dass vom *in vitro*-Test nicht auf den möglichen Lolitrem B-Gehalt in der Wirtspflanze geschlossen werden kann.

Tab. 33: Lolitrem B-Gehalte von *Neotyphodium lolii* in vitro-Kulturen in ng/Agarplatte und in ihrem Wirtsgras *Lolium perenne* in µg/kg TM

Sorte /Ökotyp	Lolitrem B-Gehalt ^a der <i>N. lolii</i> in vitro-Kultur in ng/Agarplatte	Lolitrem B-Gehalt der Wirtspflanze ^b in µg/kg TM
Sorte Yatsyn	283,5	3240
Sorte Repell USA	164,9	451
Sorte 82/83	119,0	1630
Rö 29	44,9	n. n.
Rö 41	85,1	n. n.
Rö 52	11,9	n. n.
Rö 57	89,4	n. n.
Rö 74	12,7	n. n.
Rö 83	20,6	n. n.
Rö 96	107,5	n. n.
Rö 119	70,4	1087
Rö 134	103,9	402
Rö 169	47,3	n. n.
Rö 176	58,6	n. n.
Rö 198	80,9	470
Rö 223	19,4	n. n.
Rö 281	20,7	n. n.
Rö 283	33,5	n. n.
Rö 382	10,5	2427
Rö 422	39,3	n. n.
Rö 452	19,4	n. n.

n. n. = nicht nachweisbar

^a = Mittelwert aus fünf Wiederholungen

^b = Mittelwert aus acht Schnitten, bei denen jeweils 10 *neotyphodium*-positive Pflanzen beerntet wurden (Gewächshauskultur)

Die Tatsache, dass bei 14 *N. lolii*-Isolaten in der Wirtspflanze keine nachweisbaren Mengen Lolitrem B produziert wurden, jedoch bei der *in vitro*-Kultur sowohl Lolitrem B als auch Paxillin nachweisbar waren, zeigt, dass die Interaktion in der Pflanze zwischen *N. lolii* und ihrem Wirt für die Lolitrem B-Produktion verantwortlich ist.

Offenbar ist nicht nur der Pilz allein für die Menge des produzierten Lolitrem B verantwortlich. Auch der Genotyp der Pflanze spielt hierbei eine Rolle. Deshalb ist es sinnvoll, bei der Entwicklung von *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Sorten sowohl die Wirtspflanze als auch *in vitro* die *N. lolii*-Stämme auf Lolitrem B zu untersuchen.

5.6. Mögliche neue innovative Verfahren zum Nachweis von *Neotyphodium* in Karyopsen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, neue Verfahren zum Nachweis des *Neotyphodium*-Pilzes in Karyopsen von *L. perenne* zu entwickeln.

5.6.1. Zusammenhang Lolitrem B-Gehalt und *Neotyphodium*-Besiedlung im Saatgut unterschiedlicher Sorten und Ökotypen von *L. perenne*

Beim ersten Verfahren war die Idee den Pilz indirekt über die Produktion des Mykotoxins Lolitrem B nachzuweisen. Sind die Karyopsen stark mit dem Pilz *Neotyphodium* besiedelt, sollte erwartungsgemäß viel Lolitrem B produziert worden sein. Ein hoher Lolitrem B-Gehalt würde somit eine hohe *Neotyphodium*-Besiedlung voraussetzen. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde bei insgesamt 75 verschiedenen Saatgutproben von *L. perenne* die *Neotyphodium*-Besiedlung und der Lolitrem B-Gehalt der Saatgutpartie bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass zwischen der *Neotyphodium*-Besiedlung und dem Lolitrem B-Gehalt keine Korrelation besteht. Die *N. lolii*-Besiedlungsrate gab keine Rückschlüsse auf den Lolitrem B-Gehalt. In 12 Saatgutproben wurde trotz einer *N. lolii*-Besiedlung von über 80 % kein Lolitrem B nachgewiesen. Lässt sich in den Karyopsen kein Lolitrem B nachweisen, so bedeutet dieses nicht, dass die Karyopsen *neotyphodium*-frei sind. Der Nachweis von Lolitrem B in den Karyopsen von *L. perenne* ist also kein notwendiger Nachweis für *N. lolii*.

Jedoch lässt sich feststellen, dass der Nachweis von Lolitrem B in den Karyopsen ein hinreichender Nachweis für *N. lolii* ist. Wird in den Karyopsen Lolitrem B nachgewiesen, so ist davon auszugehen, dass die Karyopsen mit *Neotyphodium* besiedelt sind. In keiner der *neotyphodium*-negativen Proben konnte Lolitrem B nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den zuvor diskutierten Ergebnissen zur Variabilität des Lolitrem B-Gehaltes in *L. perenne*-Sorten bzw. Wildpopulationen (siehe Kapitel 4.7) sowie der Witterungsabhängigkeit des Lolitrem B-Gehaltes. Abschließend ist somit festzustellen, dass der Lolitrem B-Gehalt in den Karyopsen von *L. perenne* nur ein erster Hinweis auf die *N. lolii*-Besiedlung in den Karyopsen sein kann.

5.6.2. Einsatz der NIR-Spektroskopie zur Bestimmung der *Neotyphodium*-Besiedlung in *L. perenne*

Die Untersuchungen zur Machbarkeit des Einsatzes der NIR-Technologie zur Bestimmung der *Neotyphodium*-Besiedlung in Gräsern führten leider nicht zum gewünschten Erfolg. Zwar wurde bei der Probekalibrierung mit den 18 *L. perenne*-Proben mit Hilfe des Partial Least Square Verfahren (PLSR-Regression) eine zufriedenstellende Kalibrierung erreicht. Zur Vorhersage der *Neotyphodium*-Besiedlung in „unbekannten“ Proben war das Verfahren jedoch unbrauchbar. Eine zufriedenstellende Validierung des Messverfahren konnte nicht erreicht werden.

Auch die andere Vorgehensweise führte nicht zum gewünschten Erfolg. Der Vergleich der hoch *neotyphodium*-besiedelten und der *neotyphodium*-freien Variante der Sorte Yatsyn zeigte keinerlei signifikante Unterschiede. Selbst nach der zweiten Ableitung mit optimalen Parametern waren keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Varianten zu beobachten. Es wurden bei

der Messung in der diffusen Reflexion zwar gute Spektren erhalten, jedoch spiegelte sich in diesen Spektren nicht die Anwesenheit des *Neotyphodium*-Pilzes wieder. Der Pilz befindet sich im Innern der Karyopse. Da der NIR-Strahl nur wenige μm in die Probe eindringt, wird der Pilz von der Messung leider nicht erfasst. Auch führte das Vermahlen der Probe nicht zu einer Verbesserung.

6. Zusammenfassung

Das Zusammenleben der endophytischen Pilze der Gattung *Neotyphodium* spp. mit verschiedenen Grasarten ist als mutualistische Symbiose einzustufen. Sowohl das Wirtsgras als auch der Pilz profitieren von der eingegangenen Beziehung. Auf der einen Seite wird die Population der *Neotyphodium*-Pilze vom Wirtsgras ernährt und über die Karyopsen verbreitet. Durch die Produktion spezieller Alkaloide durch die *Neotyphodium*-Pilze in den Pflanzen, erhalten diese besondere Eigenschaften (Trockenstresstoleranz, Resistenz gegen Schadorganismen etc.). Durch diese Eigenschaften wird die Population der Gräser konkurrenzfähiger gegenüber äußeren biotischen und abiotischen Stressfaktoren. Neben diesen positiven Effekten der Symbiose kann es jedoch durch die vermehrte Bildung von Alkaloiden auch zu unerwünschten Tiererkrankungen („ryegrass staggers“ und „fescue toxicosis“) bei den weidenden Tieren kommen.

Die Ursprünge der Endophytenforschung liegen in den USA und Neuseeland, wo auch in den fünfziger Jahren die Tiererkrankungen zum ersten Mal beobachtet wurden. In der jüngsten Zeit fand die Thematik der *Neotyphodium*-Pilze durch Arbeiten in Großbritannien (LEWIS & CLEMENTS, 1986), Schweiz (SCHMIDT, 1986), Frankreich (GRAND-RAVEL, 1997) und in Deutschland (OLDENBURG, 1994, 1996; DAPPRICH, 1996; EGGESTEIN, 1997) auch in Europa immer mehr an Bedeutung.

Die hier vorliegende Dissertation beinhaltet detaillierte Untersuchungen zur Symbiose zwischen den endophytischen Pilz *N. lolii* und dem Wirtsgras *L. perenne* unter den in Deutschland herrschenden Klimabedingungen. Im einzelnen waren dies, die Erfassung des Vorkommens von *N. lolii* in Sorten und Ökotypen von *L. perenne*, sowie *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zum Auftreten des Alkaloids Lolitrem B in Gräsern und Pilzisolaten. Die durchgeführten Arbeiten und Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Zur Analyse des Vorkommens von *N. lolii* in *L. perenne*-Sorten wurden alle 84 Futtergras-Sorten der Beschreibenden Sortenliste Gräser, Klee, Luzerne 1995 mikroskopisch untersucht. Hier fand sich in 10 der 84 untersuchten *L. perenne*-Sorten der Pilz *N. lolii*. Die Besiedlungsraten lagen zwischen 2 und 15 %. Die Untersuchung von weiteren 36 holländischen *L. perenne*-Sorten ergab in 16 Proben (44 %) eine Besiedlung mit dem Pilz *N. lolii*. Die Besiedlungsraten lagen hier zwischen 1 und 93 %. Bei den Saatgutproben einer rumänischen Ökotypensammlung wurde in 24 der 53 untersuchten Proben (45 %) der Pilz *N. lolii* nachgewiesen. Die Besiedlungsraten lagen hier zwischen 1 und 100 %.

Verallgemeinert lässt sich feststellen, dass in europäischen *L. perenne*-Sorten der Pilz *N. lolii* nur selten vorhanden ist. Gleichzeitig wurden in den besiedelten Sorten nur geringe Besiedlungsraten gefunden. Ökotypen dagegen sind wesentlich häufiger vom Pilz *N. lolii* besiedelt, wobei auch wesentlich höhere Besiedlungsraten erreicht werden. Besiedlungsraten nahe 100 % sind keine Seltenheit.

Untersuchungen zur *Neotyphodium*-Besiedlungsrate verschiedener Saatgutpartien einer Sorte zeigten eine geringe Variabilität. Trotz unterschiedlicher Vermehrungsorte betragen die Standardabweichungen der *Neotyphodium*-Besiedlungen der untersuchten Sorten jeweils nur drei Prozent.

In Freilandversuchen wurde der Einfluss der *Neotyphodium*-Besiedlung auf die Ertragsbildung von *L. perenne* untersucht. Die Ergebnisse dieser Freilandversuche deuten auf eine Ertragsüberlegenheit der *neotyphodium*-besiedelten Sorten hin. Häufig zeigten die *neotyphodium*-besiedelten Varianten einen tendenziellen Mehrertrag. In sieben Fällen war der Trockenmasse-Ertrag signifikant höher als bei der *neotyphodium*-freien Vergleichsvarianten. Es wurde kein Fall registriert bei dem die *neotyphodium*-freie Variante einen signifikanten Mehrertrag lieferte.

Bei Verwendung von unterschiedlichen Düngungsvarianten zeigte sich keine Wechselwirkung zwischen der *Neotyphodium*-Besiedlung und der Stickstoffdüngung. Ungeachtet des

Endophytstatus zeigten die Düngungsversuche, dass eine erhöhte Düngung bis zu 450 kg N/ha Jahr zu einem erhöhten Trockenmasse-Ertrag führt. In 44 von 51 möglichen Fällen fand sich eine signifikante Ertragsüberlegenheit bei der höheren Düngungsstufe.

Ziel der am Versuchsstandort Merklingsen (Versuchsgut der Universität-GH Paderborn) durchgeführten Freilandversuche war es, zu klären, ob es unter den in Deutschland herrschenden Klimabedingungen zum Auftreten der vom Alkaloid Lolitrem B verursachten Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ kommen kann. Die bei diesen Versuchen ermittelten Lolitrem B-Gehalte variierten sehr stark. Im Freilandversuch mit der *L. perenne*-Sorte Ellett (1995-1996) wurden maximale Lolitrem B-Gehalte von 400 µg/kg TM erhalten. Für die Sorte Yatsyn wurden in den Jahren 1997 und 1998 Lolitrem B-Gehalte zwischen 18 und 1797 µg/kg TM ermittelt. Lolitrem B-Gehalte einzelner Parzellen lagen oberhalb der toxischen Dosis von 2000 µg/kg TM lagen. Der festgestellte Maximalwert war 2470 µg/kg TM. Diese Ergebnisse zeigen, dass es in Deutschland durchaus zum Auftreten der Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ kommen kann. Im Freilandversuch mit den Sorten Yatsyn, Embassy und Nui lagen die ermittelten Lolitrem B-Gehalte zwischen 16 und 1136 µg/kg TM.

Weiterhin wurde in zwei Freilandversuchen der Einfluss der Stickstoffdüngung auf den Lolitrem B-Gehalt untersucht. Im Freilandversuch mit einer geringen Schnitthäufigkeit (Sorte Yatsyn, 1996-1998) zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Stickstoffdüngung auf den Lolitrem B-Gehalt. Mit Zunahme der Düngung erhöhte sich auch der Lolitrem B-Gehalt. Bei drei der sechs durchgeführten Schnitte war der Lolitrem B-Gehalt bei der Düngungsstufe mit der höheren Intensität signifikant höher als bei der Düngungsstufe mit der niedrigeren Düngung. Der Freilandversuch mit den Sorten Yatsyn, Embassy und Nui bei einer höheren Schnitthäufigkeit zeigte ein uneinheitliches Bild. Nur im ersten Schnitt konnte bei der Sorte Embassy ein positiver Einfluss der Stickstoffdüngung auf den Lolitrem B-Gehalt festgestellt werden. Bei den weiteren Schnittterminen war der Trend eher umgekehrt. In drei Fällen wurde bei den Sorten Embassy und Yatsyn ein signifikant höherer Lolitrem B-Gehalt bei der düngungsärmeren Variante festgestellt.

Eine Auswertung der Witterungsdaten bei den Freilandversuchen verdeutlichte den Einfluss der Temperatur auf den Lolitrem B-Gehalt. Mit Zunahme der Temperatur nimmt auch der Lolitrem B-Gehalt in der Pflanze zu. Im allgemeinen fanden sich die höchsten Lolitrem B-Gehalte in den Sommermonaten Juli und August nach wärmeren Perioden. Zu Beginn, im Mai, sowie gegen Ende der Vegetationsperiode, im Oktober, waren die ermittelten Lolitrem B-Gehalte eher gering.

Weiter zeigten die Freilandversuche, dass der Lolitrem B-Gehalt auch von der Sorte abhängig ist. Die Sorten Yatsyn, Embassy und Nui zeigten trotz ihrer vergleichbaren *Neotyphodium*-Besiedlung einen stark variierenden Lolitrem B-Gehalt. Es zeigte sich, dass der Lolitrem B-Gehalt nicht allein von der Besiedlungsrate abhängig ist. Der Lolitrem B-Gehalt kann als sortenspezifische Eigenschaft angesehen werden. Sowohl der Genotyp der Wirtspflanze als auch die genetische Variabilität des Pilzes ist für die Lolitrem B-Produktion verantwortlich.

In Klimakammerversuchen wurde die Temperaturabhängigkeit des Lolitrem B-Gehaltes dokumentiert. Mit Zunahme der Umgebungstemperatur nimmt auch der Lolitrem B-Gehalt zu. In den Versuchen führte die Erhöhung der Umgebungstemperatur um 10 °C zu einer cirka siebenfachen Erhöhung des Lolitrem B-Gehaltes. Eine Erhöhung des Lolitrem B-Gehaltes war in allen Sektionen der Pflanze zu verzeichnen. Jedoch wurden auch Pflanzenpopulationen registriert, bei denen trotz einer 100 %igen Besiedlung mit dem Pilz *N. lolii* sowohl bei der kalten als auch bei der warmen Umgebungstemperatur kein Lolitrem B nachweisbar war.

Im vegetativen Stadium einer *neotyphodium*-besiedelten *L. perenne*-Pflanze sind die höchsten Lolitrem B-Gehalte in der Blattscheidensektion zu finden. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden im Durchschnitt gemittelt über alle Sorten und Temperaturvarianten 75 % des gebildeten Lolitrem B in den untersten fünf Zentimetern der besiedelten Pflanzen (Blattscheidensektion) nachgewiesen. In der Blattspreitensektion wurden durchschnittlich 18 %, in den Wurzeln 7 % des gebildeten Lolitrem B gefunden.

Bei der Untersuchung des Lolitrem B-Gehaltes einzelner Individuen innerhalb einer Sorte bzw. Population zeigte sich, dass der Lolitrem B-Gehalt bei den einzelnen Individuen stark schwankt.

In weiteren *in vivo*-Untersuchungen wurde die Hypothese, dass es *N. lolii*-Stämme gibt, die kein oder nur wenig Lolitrem B bilden, untersucht. Hierzu wurden in Gewächshausversuchen Frischmasseproben von *neotyphodium*-besiedelten Pflanzen verschiedener Ökotypen und Sorten auf das Alkaloid Lolitrem B untersucht. Es wurden 18 rumänische Ökotypen selektiert, die trotz einer *N. lolii*-Besiedlung, keine nachweisbaren Mengen Lolitrem B in der Pflanze bildeten.

Neben diesen *in vivo*-Untersuchungen wurden dann als weiterer konsequenter Schritt die Lolitrem B-Untersuchungen auf die *N. lolii in vitro*-Kulturen ausgeweitet. Bei 34 *N. lolii*-Isolaten und zwei weiteren Pilzen wurde die Lolitrem B- und Paxillin-Produktion analysiert. Der Paxillin-Gehalt der meisten *in vitro*-Kulturen lag im µg-Bereich. Die Paxillin-Gehalte variierten von nicht nachweisbar bis zu 25 µg/Agarplatte bei den *N. lolii*-Isolaten. Die ermittelten Lolitrem B-Gehalte lagen hingegen im ng-Bereich. Sie variierten von 11 ng/Agarplatte bis zu 725 ng/Agarplatte. In allen untersuchten *N. lolii*-Isolaten war Lolitrem B nachweisbar. Der Vergleich der *in vitro*-Ergebnisse (Lolitrem B-Gehalt in *N. lolii*-Isolaten) mit den *in vivo*-Ergebnissen (Lolitrem B-Gehalt in der entsprechenden Wirtspflanze) lässt keine Korrelation erkennen. Vom *in vitro*-Test konnte nicht auf den möglichen Lolitrem B-Gehalt in der Wirtspflanze geschlossen werden.

Weiter wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit in insgesamt 75 Karyopsenproben neben der *Neotyphodium*-Besiedlung der Lolitrem B-Gehalt bestimmt. Ziel dieser Arbeiten war es festzustellen, ob zwischen der *Neotyphodium*-Besiedlung und dem Lolitrem B-Gehalt ein Zusammenhang besteht. Die durchgeführten Arbeiten zeigten, dass zwischen der *N. lolii*-Besiedlung und dem Lolitrem B-Gehalt keine Korrelation besteht. Die *N. lolii*-Besiedlung gibt keine Rückschlüsse auf den Lolitrem B-Gehalt. In 12 Karyopsenproben wurde trotz einer *N. lolii*-Besiedlung von über 80 % kein Lolitrem B nachgewiesen. Lässt sich in den Karyopsen kein Lolitrem B nachweisen, so bedeutet dieses nicht, dass die Karyopsen *neotyphodium*-frei sind. Jedoch ist der Nachweis von Lolitrem B in den Karyopsen ein hinreichender Nachweis für den Pilz *N. lolii*. Wird in den Karyopsen Lolitrem B nachgewiesen, so ist davon auszugehen, dass die Karyopsen mit *Neotyphodium* besiedelt sind. In keiner der 35 *neotyphodium*-freien Karyopsenproben konnte Lolitrem B nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass in 12 Karyopsenproben trotz einer *N. lolii*-Besiedlung oberhalb von 80 % kein Lolitrem B nachweisbar war, unterstützt die Hypothese, dass es *N. lolii*-Stämme gibt, die wenig oder gar kein Lolitrem B bilden.

Im Verlauf der Untersuchungen zur Erfassung des Vorkommens von *N. lolii* in *L. perenne*-Sorten und -Ökotypen wurde versucht, die NIR-Spektroskopie zur Bestimmung der *N. lolii*-Besiedlung einzusetzen. Die zu dieser Thematik unternommenen Untersuchungen zeigten jedoch, dass es mit Hilfe der NIR-Spektroskopie nicht möglich ist, die *Neotyphodium*-Besiedlung in *L. perenne*-Gräsern zu bestimmen. Zwar war es möglich von den Karyopsenproben aussagefähige NIR-Spektren in diffuser Reflexion aufzunehmen. Jedoch waren zwischen den Spektren der *neotyphodium*-besiedelten und *neotyphodium*-freien Proben keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

7. Ausblick

Die mit dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass es auch in Deutschland unter den hier herrschenden Klimabedingungen zu Auswirkungen der Symbiose zwischen *Neotyphodium*-Pilzen und deren Wirtsgräsern kommen kann.

Die Ergebnisse der Freilandversuche belegen, dass es in Deutschland zum Ausbruch der Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ kommen kann. Die gefundenen Lolitrem B-Gehalte reichen aus, um die neuromuskuläre Tiererkrankung auszulösen. Zudem ist davon auszugehen, dass auch geringere Alkaloidgehalte zu einer Beeinträchtigung der tierischen Leistung der Weidetiere führen.

Momentan ist in Deutschland nur selten mit dem Ausbruch der Weidetierkrankung „ryegrass staggers“ zu rechnen, da, wie die Untersuchungen zum Auftreten des Pilzes in *L. perenne*-Sorten zeigen, die europäischen Sorten nur selten und gering mit dem Pilz *N. lolii* besiedelt sind. Jedoch ist bei der zur Zeit vollzogenen Globalisierung der Märkte und Unternehmen damit zu rechnen, dass höher besiedelte *L. perenne*-Sorten auf den deutschen Markt gelangen und auch angebaut werden. Somit kann es auch in Deutschland zum toxikologischen Problem der *neotyphodium*-besiedelten Gräser kommen.

Auch einige der positiven Auswirkungen der Symbiose zwischen dem Pilz *N. lolii* und dem Wirtsgras *L. perenne* wurden in den Freilandversuchen nachgewiesen. Die *neotyphodium*-besiedelten Gräser hatten einen tendenziellen, in einigen Fällen einen signifikant höheren Trockenmasse-Mehrertrag als die *neotyphodium*-freien Vergleichsvarianten.

Ziel der *Neotyphodium*-Forschung muss es also sein, sich die positiven Auswirkungen der *Neotyphodium*/Gras-Symbiose (höherer Trockenmasse-Ertrag, Schadinsektenresistenz etc.) zu Nutze zu machen, und die negativen Begleiterscheinungen (Weidetierkrankungen) zu eliminieren.

Denkbar und auch schon in Übersee, in den USA und Neuseeland praktiziert, ist der Einsatz von *neotyphodium*-besiedelten Gräsern im Rasensektor. Der Einsatz von *neotyphodium*-besiedelten Rasen mit einem hohen Alkaloid-Gehalt auf Golf-, Fußballplätzen sowie auf öffentlichen und privaten Grünflächen im Bereich der Freizeitgestaltung birgt keinerlei Gefahren. In diesem Bereich werden die negativen Begleiterscheinungen durch den Verwendungszweck eliminiert. Auf der anderen Seite sind gerade in diesem Bereich widerstandsfähige Gräser von hohem Nutzen.

Um die Vorteile der *Neotyphodium*/Gras-Symbiose auch im landwirtschaftlichen Bereich nutzen so können, muss das toxikologische Problem der *neotyphodium*-besiedelten Gräser für die Weidetiere gelöst werden. Ein Lösungsansatz stellt hierbei die Schaffung von „*Neotyphodium*-Elitestämmen“ dar, die keine toxischen Alkaloide wie Lolitremer oder Ergotalkaloide bilden. Die Untersuchungen zum Lolitrem B-Gehalt in Pflanzenmaterial und in den *Neotyphodium*-Isolaten der rumänischen Ökotypen zeigen, dass die Verwendung von Elitestämmen eine mögliche Problemlösung darstellen könnte. Es wurden mehrere *Neotyphodium*/Gras Kombination selektiert, die auch bei höheren Temperaturen keine nachweisbaren Mengen Lolitrem B in der Pflanze gebildet haben. Zudem waren die Lolitrem B-Gehalte, die in den entsprechenden *in vitro*-Kulturen dieser *Neotyphodium*-Isolaten bestimmt wurden, im Vergleich zu den aus USA und Neuseeland stammenden *Neotyphodium*-Isolaten als gering einzustufen. Weiterführende Arbeiten sollten hier die Untersuchungen auf die Ergotalkaloide ausdehnen. Für die Inokulation dieser „*Neotyphodium*-Elitestämme“ in das Wirtsgras sind praktikierbare und erfolgreiche Methoden beschrieben (LATCH & CHRISTENSEN, 1985; RAVEL et al., 1994). Jedoch bleibt nach einer erfolgreichen Inokulation zu klären, inwieweit die erfolgte Besiedlung mit dem *Neotyphodium*-Pilz über mehrere Generationen hinweg stabil bleibt. Weiter ist denkbar, dass eine Eliminierung der toxischen Alkaloide in den Gräsern auch die positiven Eigenschaften der Gräser beeinflussen könnte.

Diese Überlegungen zeigen, dass im Bereich der *Neotyphodium*-Forschung noch viele Fragen ungeklärt sind und somit großer interdisziplinärer Forschungsbedarf besteht.

8. Literaturverzeichnis

- AASEN, A. J., CULVENOR, C. C. J., FINNIE, E. P., KELLOCK, A. W. and SMITH, L. W., **1969**: Alkaloids as a possible cause of ryegrass staggers in grazing livestock. *Aust. J. Agric. Res.*, 20: 71-86.
- AGURELL, S., **1966**: Biosynthetic studies of ergot alkaloids and related indoles. *Acta Pharm. Suecica*, 3: 71-100.
- AHMAD, S., JOHNSON-CICALESE, J. M., DICKSON, W. K. and FUNK, C. R., **1986**: Endophyte-enhanced resistance in perennial ryegrass to bluegrass billbug, *Spenophorus parvulus*. *Entomol. Exp. Appl.*, 41: 3-10.
- ARACHEVALETA, M., BACON, C. W., HOVELAND, C. S. and RADCLIFFE, D. E., **1989**: Effect of the tall fescue endophyte on plant response environmental stress. *Agron. J.*, 81: 83-90.
- ARACHEVALETA, M., BACON, C. W., PLATTNER, R. D., HOVELAND, C. S. and RADCLIFFE, D. E., **1992**: Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 857-861.
- BACON, C. W., **1989**: Isolation, culture, and maintenance of endophytic fungi of grasses. In: Labeda, D. P. (Ed.): *The isolation and screening of microorganisms from nature*. McGraw-Hill Publishing Co., New York. pp. 259-282.
- BACON, C. W., **1995**: Toxic endophyte-infected tall fescue and range grasses: Historic perspectives. *J. Anim. Sci.*, 73: 861-870.
- BACON, C. W. and SIEGEL, M. R., **1988**: Endophyte parasitism of tall fescue. *J. Prod. Agric.*, 1: 45-55.
- BACON, C. W., PORTER, J. K. and ROBBINS, J. D., **1975**: Toxicity and occurrence of *Balansia* on grasses from toxic fescue pastures. *Appl. Microbiol.*, 29: 553-556.
- BACON, C. W., PORTER, J. K., ROBBINS, J. D. and LUTTRELL, E. S., **1977**: *Epichloa typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34: 576-581.
- BACON, C. W., PORTER, J. K. and ROBBINS, J. D., **1979**: Laboratory production of ergot alkaloids by species of *Balansia*. *J. Gen. Microbiol.*, 113: 119-126.
- BACON, C. W., PORTER, J. K. and ROBBINS, J. D., **1981**: Ergot alkaloid biosynthesis by isolates of *Balansia epichloa* and *B. henningsiana*. *Can. J. Bot.*, 59: 2534-2538.
- BACON, C. W., LYONS, P. C., PORTER, J. K. and ROBBINS, J. D., **1986**: Ergot toxicities from endophyte-infected grasses: a review. *Agron. J.* 78: 106-116.
- BAERT, J., VERBRUGGEN, I. and CARLIER, L., **1994**: About the ryegrass endophyte (*Acremonium lolii*) in Belgium. In: Mannelje, L. and Frame, J. (Ed), *Grassland and Society*, Proc. of the 15th General Meeting of European Grassland Federation, 6-9 June 1994, Publisher, Wageningen Pers., Wageningen: 142-144.
- BALE, N. M. and CROUT, D. H. G., **1975**: Determination of the relative rates of incorporation of arginine and ornithine into retronecine during pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochem.*, 14: 2617-2622.
- BALFOURIER, F. and CHARMET, G., **1991**: Spaced plant evaluation of Mediterranean germplasm collection of perennial ryegrass. *Euphytica*. 57: 57-66.
- BALL O. J.-P., PRESTIDGE, R. A. and SPROSEN, J. M., **1995**: Interrelationships between *Acremonium lolii*, Peramine and Lolitrem B in Perennial Ryegrass. *Appl. Environ. Microbiol.*, Apr.: 1527-1533.
- BALL, O., J.-P., BARKER, G. M., PRESTIDGE, R. A. and SPROSEN, J. M., **1997**: Distribution and accumulation of the mycotoxin Lolitrem B in *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass. *J. Chem. Ecology*, 23 (5): 1435-1449.
- BARKER, G. M., POTTINGER, R. P., ADDISON, P. J. and PRESTIDGE, R. A., **1984**: Effect of *Lolium* endophyte fungus infections on behaviour of adult Argentine stem weevil. *N. Z. J. Agric. Res.*, 27: 271-277.
- BELESKY, D. P., STUEDEMANN, J. A., PLATTNER, R. D. and WILKINSON, S. R., **1988**: Ergopeptide alkaloids in grazed tall fescue. *Agron. J.*, 80: 209-212.
- BELESKY, D. P., STRINGER, W. C. and PLATTNER, R. D., **1989**: Influence of endophyte and water regime upon tall fescue accessions. II. Pyrrolizidine and ergopeptide alkaloids. *Ann. Bot.* 64: 343-349.

- BERDE, B. and SCHILD, H. O., **1978**: Ergot alkaloids and related compounds. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 49, Springer Verlag, New York
- BERNY, P., JAUSSAUD, P., DURIX, A., RAVEL, C. and BONY, S., **1997**: Rapid determination of the mycotoxin lolitrem B in endophyte-infected ryegrass by high-performance thin-layer chromatography - A validated assay. J. Chromatogr. A, 769: 343-348.
- BETHKE, H., DELZ, B. and STICH, K., **1976**: Determination of the content and purity of ergotamine preparations by means of high-pressure liquid chromatography. J. Chromatogr., 123: 193-203.
- BOTTOMLEY, W. and GEISSMAN, T. A., **1964**: The biosynthesis of retronecine. Phytochem., 3: 357-360.
- BOUTON, J. H., **1989**: Georgia report. Proc. Tall Fescue Toxicosis Workshop, Southern Region Information Exchange Group 37, 13-14 November 1989, Atlanta, GA
- BRIMBLE, M. A. and ROWAN, D. D., **1990**: Synthesis of the Insect Feeding Deterrent Peramine via Michael Addition of a Pyrrole Anion to a Nitroalkene. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, No. 2: 311-314.
- BUCKNER, R. C., TODD, J. R., BURRUS, P. B. II. and BARNES, R. F., **1967**: Chemical composition, palatability and digestibility of ryegrass-tall fescue hybrids, 'Kenwell', and 'Kentucky 31' tall fescue varieties. Agron. J., 59: 345-349.
- BUNDESSORTENAMT, **1995**: Beschreibende Sortenliste für Gräser, Klee, Luzerne 1995, Landbuch Verlagsgesellschaft mbH, Hannover
- BUNDESSORTENAMT, **1997**: Beschreibende Sortenliste für Gräser, Klee Luzerne 1997, Landbuch Verlagsgesellschaft mbH, Hannover
- BUSH, L. P. and JEFFREYS, J. A. D., **1975**: Isolation and separation of tall fescue and ryegrass alkaloids. J. Chromatogr., 111: 165-170.
- BUSH, L. P., CORNELIUS, P. L., BUCKNER, R. C., VARNEY, D. R., CHAPMAN, R. A., BURRUS, P. B., II, KENNEDY, C. W., JONES, T. A. and SAUNDERS, M. J., **1982**: Association of N-acetyllooline derivatives and N-formyllooline derivatives with *Epichloa typhina* in tall fescue. Crop. Sci., 22: 941-943.
- BUSH, L. P., FANNIN, F. F., SIEGEL, M. R., DAHLMANN, D. L. and BURTON, H. R., **1993**: Chemistry, occurrence and biological effects of saturated pyrrolizidine alkaloids associated with endophyte-grass interactions. Agric. Ecosystems and Environ., 44: 81-102.
- CAGAS, B., **1991**: Genetic resources of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and *Acremonium coenophialum*. Report of a working group on forages, 4th meeting, Budapest, October, 28-30: 76-81.
- CAROLL, G. C., **1990**: Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan, 31: 103-116.
- CHARMET, G., BALFOUIER, F. and BION, A., **1990**: Agronomic evaluation of a collection of French perennial ryegrass populations: multivariate classification using genotype x environment interactions. Agronomie, 10: 807-823.
- CHEEKE, P. R., **1995**: Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effect on livestock. J. Anim. Sci., 73: 909-918.
- CHEPLICK, G. P., CLAY, K. and MARKS, S., **1989**: Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. New Phytol., 111: 89-97.
- CHESTNUT, A. B., FRIBOURG, H. A., MCLAREN, J. B., KELTNER, D. G., REDDICK, B. B., CARLISLE, R. J. and SMITH, M. C., **1991**: Effects of *Acremonium coenophialum* infestation, bermudagrass and nitrogen or clover on steers grazing tall fescue pastures. J. Prod. Agric., 4, 208-213.
- CHESTNUT, A. B., ANDERSON, P. D., COCHRAN, M. A., FRIBOURG, H. A. and GWINN, K. D., **1992**: Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on fescue toxicosis and mineral absorption. J. Anim. Sci. 70: 2838-2846.
- CHORLTON, K. H. and RHODES, I., **1983**: Extending and maintaining genetic resources. Annual Report for Welsh Plant Breeding Station for 1982: 33-34.

- COLE, R. J., KIRKSEY, J. W. and WELLS, J. M., **1974**: A new tremorgenic metabolite from *Penicillium pauxilli*. Can. J. Microbiol., 20: 1159-1162.
- CORNELIUS, P. L., BUCKNER, R. C., BUSH, L. P., BURRUS, P. B. II and BYARS, J., **1974**: Inheritance of perloine content in annual ryegrass x tall fescue hybrids. Crop. Sci., 14: 896-898.
- CORNELL, C. N., LUEKER, J. V., GARNER, G. B. and ELLIS, J. L., **1990**: Stablising ergovaline levels for fescue toxicosis, with and without endoparasites, under controlled climatic conditions. In: Quisenberry, S. S. and Joost, R. E. (Ed.), Proc. Int. Symp. on *Acremonium*/Grass Interaction, Nov. 3, 1990, New Orleans, LA., Louisiana Agricultural Experiment Station, Baton Rouge, p. 75.
- CRAIG, A. M., BILICH, D., HOVERMALE, J. T. and WELTY, R. E., **1994**: Improved extraction and HPLC method for ergovaline from plant material and rumen fluid. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 348-352.
- CRAWFORD, R. J., FORWOOD, J. R., BELYEA, R. L. and GARNER, G. B., **1989**: Relationship between level of endophyte infection and cattle gains on tall fescue. J. Prod. Agric., 2: 147-151.
- CROSS, D. L., REDMOND, L. M. and STRICKLAND, J. R., **1995**: Equine fescue toxicosis: Signs and solutions. J. Animal Sci., Vol. 73: 899-908.
- CUNNINGHAM, I. J., **1948**: Tall fescue grass is poison for cattle. N. Z. J. Agric. 77: 519-524.
- CUNNINGHAM, I. J., **1949**: A note on the cause of tall fescue lameness in cattle. Aus. Vet. J., 25: 27-28.
- CUNNINGHAM, I. J., **1958**: Non-toxicity to animals of ryegrass endophyte and other endophytic fungi of New Zealand grasses, 20: 1159-1162.
- CUNNINGHAM, I. J. and HARTLEY, W. J., **1959**: Ryegrass staggers. N. Z. Vet. J., 7: 1-7.
- CUNNINGHAM, P. J., FOOT, J. Z. and REED, K. F. M., **1993**: Perennial ryegrass (*Lolium perenne*) endophyte (*Acremonium lolii*) relationship: the Australian experience. Agric. Ecosystems and Environ., 44: 157-168.
- DANILSON, D. A., SCHMIDT, S. P., KING, C. C., SMITH, L. A. and WEBSTER, W. B., **1986**: Fescue toxicity and reproduction in beef heifers. J. Anim. Sci. 63 (Suppl. 1): 296.
- DAPPRICH, P. D., **1996**: Untersuchungen zur morphologischen und molekularbiologischen Charakterisierung der Gräserendophyten *Acremonium lolii* und *A. uncinatum* und deren Auswirkungen auf ihren Wirt. Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an der Universität-Gesamthochschule Paderborn, Fachbereich Chemie und Chemietechnik.
- DAPPRICH, P., KLOSE, A. and PAUL, V. H., **1994**: A survey on the occurrence of endophytic fungi in European seed lots of *Lolium perenne*. In: Int. Conf. Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pastures and Turf. Krohn, K.; Paul, V. H. and Thomas, J. (Ed.), IOBC Bulletin, 17 (1): 131-137.
- DI MENNA, M. E. and WALLER, J. E., **1986**: Visual assessment of seasonal changes in the amount of mycelium of *Acremonium loliae* in leaf sheaths of perennial ryegrass. N. Z. J. Agric. Res., 29: 111-116.
- DI MENNA, M. E., MORTIMER, P. H., PRESTIDGE, R. A., HAWKES, A. D. and SPROSEN, J. M., **1992**: Lolitrem concentrations of *Acremonium lolii* hyphae, and incidence of ryegrass staggers in lambs on plots of *A. lolii*-infected perennial ryegrass. N. Z. J. Agric. Res., 5: 211-217.
- DO VALLE RIBEIRO, M. A. M., **1993**: Transmission and survival of *Acremonium* and the implications for grass breeding. Agric. Ecosystems and Environ., 44: 195-213.
- DOSS, R. P. and WELTY, R. E., **1995**: A Polymerase Chain Reaction - Based Procedure for Detection of *Acremonium coenophialum* in Tall Fescue. Phytopath., 85 (8): 913-917.
- DUMAS, D. J., **1988**: Total Synthesis of Peramine. J. Org. Chem. 53: 4650-4653.
- EEREN, J. P. J., VISKER, M. H. P. W., LUCAS, R. J., EASTON, H. S. and WHITE, J. G. H., **1997a**: Influence of the ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) on phyto-nematodes. International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium. Athens, Georgia, USA, Book of Abstracts, 19.
- EEREN, J. P. J., EASTON, H. S., LUCAS, R. J., WHITE, J. G. H. and MILLER, K. B., **1997b**: Influence of endophyte (*Neotyphodium lolii*) on sheep production in a cool-moist environment. International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium. Athens, Georgia, USA, Book of Abstracts, 33.

- EGGESTEIN, S., **1997**: Untersuchungen zum Vorkommen von Endophyten der Gattung *Acremonium* in Festuca-Arten Europas sowie zu Symbioseeffekten bei *Festuca pratensis*. Dissertation der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg zur Erlangung des akademischen Grades doctor agriculturarum.
- EIERDANZ, S., **1996**: Interaktionen zwischen *Poaceae* und endophytischen Pilzen, Abschlussarbeit zur Erlangung des Titels Dipl. Ing. (FH) an der Universität-GH Paderborn, Abteilung Soest, Fachbereich Agrarwirtschaft.
- ELLIS, J. L., MORROW, R. E., GARNER, G. B., STRICKER, J. A. and ELLERSIECK, M. R., **1983**: Supplemental feeding of spring-calving cows on tall fescue or tall fescue-red clover pastures. *J. Anim. Sci.*, 57: 535-541.
- FANNIN, F. F., BUSH, L. P., SIEGEL, M. R. and ROWAN, D. D., **1990**: Analysis of Peramine in fungal endophyte-infected grasses by reversed-phase thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 503: 289-292.
- FARRAR, J. F. and LEWIS, D. H., **1987**: Nutrient relations in biotrophic infections. In: Pegg, G. F., Ayres, P. G. (Ed.). *Fungal infections of Plants*. Cambridge University Press. Cambridge. UK. pp. 97-132.
- FERGUS, E. N. and BUCKNER, R. C., **1972**: Registration of Kentucky 31 tall fescue (Reg. No. 7). *Crop. Sci.*, 12: 714.
- FINK-GREMMELS, J. and BLOM, M., **1993**: Neurotoxische Mykotoxine in Weidegras. *Berichtsband 15. Mykotoxin-Workshop*, 17.-19.5.1993, Jena.
- FLETCHER, L. R., **1986**: *Lolium* endophyte and sheep performance on perennial ryegrass cultivars. *Proc. NZ Grassl. Assoc.*, 47: 99-105.
- FLETCHER, L. R. and HARVEY, I. C., **1981**: An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. *Nz Vet. J.*, 29: 185-186.
- FLETCHER, L. R., GARTHWAITE, I. and TOWERS, N. R., **1993**: Ryegrass staggers in the absence of lolitrem B. In: Hume, D. E., Latch, G. C. M. and Easton, H. S. (Ed.), *Proc. 2nd Int. Symp. on Acremonium/Grass Interactions*. Feb. 4-6, 1993, Massey University, AgResearch, Palmerston, New Zealand, p. 119.
- FLOSS, H. G., **1976**: Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. *Tetrahedron*, 32: 873-912.
- FORD, V. L. and KIRKPATRICK, T. L., **1989**: Effects of *Acremonium coenophialum* in tall fescue on host disease and insect resistance and allelopathy to *Pinus taeda* seedlings. *Proc. Arkansas Fescue Toxicosis Conf.*, C.P. West (Ed.), Arkansas Agric. Exp. Stn. Spec. Rep. 140: 29-34.
- FREEMAN, E. M., **1902**: The seed fungus of *Lolium temulentum* L., the darnel. *Phil. Trans. R. Soc. London. Ser. B*. 196: 1-27.
- FREHSE, H. und THIER, H. P., **1991**: Die Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze bei Rückstandsanalysen nach dem neuen DFG-Konzept. *GIT Fachz. Lab.* 4: 285-291.
- FUNK, C. R., HALISKY, P. M., JOHNSON, M. C., STEWART, A. V., AHMAD, S., HURLEY, R. H. and HARVEY, I. C., **1983**: An endophyte fungus and resistance to sod webworms: Association in *Lolium perenne* L. *Biotechnology*, 1: 189-191.
- GALLAGHER, R. T., WHITE, E. P. and MORTIMER, P. H., **1981**: Ryegrass staggers: Isolation of potent Neurotoxins Lolitrem A and Lolitrem B from staggers-producing pastures. *N. Z. Vet. J.*, 29: 189-190.
- GALLAGHER, R. T., HAWKES, A. D., STEYN, P. S. and VLEGGAR, R., **1984**: Tremorgenic Neurotoxins from perennial ryegrass causing ryegrass staggers disorder of livestock: Structure and elucidation of lolitrem B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 614-616.
- GALLAGHER, R. T., HAWKES, A. D. and STEWART, J. M., **1985**: Rapid determination of the Neurotoxin Lolitrem B in perennial ryegrass by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, 321: 217-226.
- GALLAGHER, R. T., SMITH, G. S. and SPROSEN, J. M., **1987**: The distribution and accumulation of lolitrem B neurotoxin in developing perennial ryegrass plants. *Proc. 4th AAAP Animal Science Cong.*, Hamilton, New Zealand, pp. 404.
- GAMS, W., PETRINI, O. and SCHMIDT, D., **1990**: *Acremonium uncinatum*, a new endophyte in *Festuca pratensis*. *Mycotaxon*, 37: 67-71.

- GARNER, G. B., MORROW, R., FAIRBROTHER, T., GERRISH, J., NELSON, C., JACOBS, V. and HIRES, W., **1984**: Nursing cows, calves, and steers response to simultaneously grazed tall fescue pastures with varying levels of endophyte *E. typhina*. In: Proc. Am. Forage and Grassl. Conf. Jan. 23-26, Houston, TX. Am. Forage and Grassland Council, Lexington, KY.
- GARNER, G. B., ROTTINGHAUS, G. E., CORNELL, C. N. and TESTERECI, H., **1993**: Chemistry of compounds associated with endophyte/grass interaction: Ergovaline and ergopeptine-related alkaloids. Agric. Ecosystems and Environ. 44: 65-80.
- GAY, N., BOLING, J. A., DEW, R. and MIKSCH, D. E., **1988**: Effects of endophyte-infected tall fescue on beef cow-calf performance. Appl. Agric. Res. 3: 182-186.
- GEIBLER, G., **1980**: Pflanzenbau. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. p. 91.
- GLENN, A. E., BACON, C. W., PRICE, R. and HANLIN, R. T., **1996**: Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. Mycologia, 88 (3): 369-383.
- GOODMAN, A. A., **1952**: Fescue foot in cattle in Colorado. J. Am. Vet. Med. Assoc., 121: 289-290.
- GOULD, F. W. and SHAW, R. B., **1983**: Grass Systematics, 2nd ed. Texas A & M University Press, College Station
- GRAND-RAVEL, C., **1997**: Les champignons endophytes des Graminées: Distribution et coévolution avec leurs espèces hôtes. Dissertation zur Erlangung des Grades Docteur d'Université Spécialité Génétique Végétale. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
- GWINN, K. D., COLLINS-SHEPARD, M. H. and REDDIK, B. B., **1991**: Tissue print-immunoblot, an accurate method for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. Phytopath., 81 (7): 747-748.
- HARTMANN, T., **1985**: Prinzipien des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Plant Systematics and Evolution, 150: 15-34.
- HEMKEN, R. W., BULL, L. A., BOLING, J. A., KANE, E., BUSH, L. P. and BUCKNER, R. C., **1979**: Summer fescue toxicosis in lactating dairy cows and sheep fed experimental strains of ryegrass-tall fescue hybrids. J. Anim. Sci., 49: 641-646.
- HEMKEN, R. W., BOLING, J. A., BULL, L. S., HATTON, R. H., BUCKNER, R. C. and BUSH, L. P., **1981**: Interaction of environmental temperature and anti-quality factors on the severity of summer fescue toxicosis. J. Anim. Sci., 52: 710-714.
- HERD, S., CHRISTENSEN, M. J., SAUNDERS, K., SCOTT, D. B. and SCHMID, J., **1997**: Quantitative assessment of in planta distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus. Mikrobiol., 143: 267-275.
- HEWITT, R. L., **1983**: Breeding for resistance to ryegrass staggers, the infation-proof long-term solution? Proc. NZ Grassl. Assoc. 44: 244-247.
- HIGNIGHT, K. W., MULENBERG, G. A. and VAN WIJK, A. J. P., **1993**: Detecting the Fungal Endophyte *Acremonium* spp. in Grasses. Biotech. and Histochem., 68 (2): 87-90.
- HILL, G. M., BRADLEY, N. W. and BOLING, J. A., **1979**: Cow and calf performance on tall fescue- or Kentucky bluegrass-ladino clover forages. J. Anim. Sci. 49: 44-49.
- HILL, N. S., STRINGER, W. C., ROTTINGHAUS, G. E., BELESKY, D. P., PARROTT, W. A. and POPE, D. D., **1990**: Growth, morphological, and chemical component responses of tall fescue to *Acremonium coenophialum*. Crop Sci., 30: 156-161.
- HILL, N. S., BELESKY, D. P. and STRINGER, W. C., **1991**: Competitiveness of tall fescue as influenced by *Acremonium coenophialum*. Crop Sci., 31: 185-190.
- HOVELAND, C. S., **1993**: Importance and economic significance of the *Acremonium* endophytes to performance of animals and grass plant. Agric. Ecosystems and Environ. 44: 3-12.
- HOVELAND, C. S., SCHMIDT, S. P., KING, C. C. JR., ODOM, J. W., CLARK, E. M., MCGIURE, J. A., SMITH, L. A., GRIMES, H. W. and HOLLIMAN, J. L., **1983**: Steer performance and association of *Acremonium coenophialum* fungal endophyte on tall fescue pastures. Agron. J., 75: 821-824.

- HOVELAND, C. S., SCHMIDT, S. P., KING, C. C. JR., and CLARK, E. M., **1984**: Association of fungal endophyte with seasonal gains of beef steer grazing tall fescue pasture. In: Riley, H. and Skelvag, A. D. (Ed.), Proc. Eur. Grassl. Fed. p 382.
- HUMES, D. E., **1993**: Agronomic performances of New-Zealand pastures implications of *Acremonium* species. Proc. Second Proc. Int. Symp. *Acremonium*/grass interactions: plenary papers. Eds Humes, Latch & Easton, 31-38.
- HURLEY, W. L., CONVEY, E. M., LEUNG, K., EDGERTON, L. A. and HEMKEN, R. W., **1981**: Bovine prolactin, TSH, T4 and T3 concentrations as affected by tall fescue summer toxicosis and temperature. J. Anim. Sci., 51: 374-379.
- JACOBSON, D. R., MILLER, W. M., SEATH, D. M. and YATES, S. G., **1963**: Nature of fescue toxicity and progress toward identification of the toxic entity. J. Dairy Sci., 46: 416-418.
- JOHNSON, M. C., PIRONE, T. P., SIEGEL, M. R. and VARNEY, D. R., **1982**: Detection of *Epichloa typhina* in tall fescue by means of ELISA. Phytopath., 72 (6): 647-650.
- JOHNSON, M. C., ANDERSON, R. L., KRYSIO, R. J. and SIEGEL, M. R., **1983**: Sampling procedures for determining endophyte content in tall fescue seed lots by ELISA. Phytopath., 73 (10): 1406-1409.
- JOHNSON, M. C., DAHLMANN, D. L., SIEGEL, M. R., BUSH, L. P., LATCH, G. C. M., POTTER, D. A. and VARNEY, D. R., **1985**: Insect feeding deterrents in endophyte-infected tall fescue. Appl. Environ. Microbiol. 49: 568-571.
- JOOST, R. E. and BATES, G. E., **1989**: Louisiana report. Proc. Tall Fescue Toxicosis Workshop, Atlanta
- JUSTUS, M., WITTE, L. and HARTMANN, T., **1997**: Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte-infected *Festuca pratensis*. Phytochem., 44 (1): 51-57.
- KELLY, H. A. and ROBINS, D. J., **1987**: Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis: Incorporation of carbon-13 labelled precursors into rosmarinine. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 177-180.
- KENNEDY, C. W. and BUSH, L. P., **1983**: Effect of Environmental and Management Factors on the Accumulation of N-acetyl and N-formyl Loline Alkaloids in Tall Fescue. Crop Sci., 23: 547-552.
- KEOGH, R. G., **1973**: Induction and prevention of ryegrass staggers in grazing sheep. N. Z. J. Exp. Agric., 1: 55-57.
- KEOGH, R. G. and TAPPER, B. A., **1993**: *Acremonium lolii*, Lolitrem B, and Peramine concentrations within vegetative tillers of perennial ryegrass. In: Hume, D. E., Latch, G. C. M. and Easton, H. S. (Ed). Proceedings of the Second International Symposium on *Acremonium*/Grass Interactions. AgResearch, Palmerston North, New Zealand, 81-84.
- KIMMONS, C. A., GWINN, K. D. and BERNARD, E. C., **1989**: Reproduction of selected nematode species on endophyte infected tall fescue. (Abstr.), Phytopath., 79: 374.
- KLAPP, E. und OPITZ VON BOBERFELD, W., **1990**: Taschenbuch der Gräser. 12. Auflage. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- KLEY, G., **1994**: Breeding and use of forage plants in Europe. In: Int. Conf. Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pastures and Turf. Krohn, K.; Paul, V. H. and Thomas, J. (Ed.), IOBC Bulletin, 17 (1): 9-12.
- KLEY, G., **1997**: Aktuelles aus der Wirtschaft, Ernte und Markt 1996/1997. Tagungsband zur 38. Fachtagung des DLG-Ausschusses Gräser, Klee und Zwischenfrüchte. Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e. V., Frankfurt, 63-64.
- KOSHINO, H., TOGIYA, S., YOSHIHARA, T., SAKAMURA, S., SHIMANUKI, T., SATO, T. and TAJIMI, A., **1987**: Four fungitoxic C-18 hydroxy unsaturated fatty acids from stromata of *Epichloa typhina*. Tetra. Lett., 28: 73-76.
- LATCH, G. C. M. and CHRISTENSEN, M. J., **1982**: Ryegrass endophyte, incidence and control. N. Z. J. Agric. Res., 25: 443-448.
- LATCH, G. C. M. and CHRISTENSEN, M. J., **1985**: Artificial infection of grasses with endophytes. Ann. Appl. Biol., Vol. 107: 17-24.
- LATCH, G. C. M., CHRISTENSEN, M. J. and SAMUELS, G. J., **1984**: Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. Mycotaxon, XX (2): 535-550.

- LATCH, G. C. M., HUNT, W. F. and MUSGRAVE, D. R., **1985**: Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *N. Z. J. Agric. Res.*, 28: 165-168.
- LATCH, G. C. M., POTTER, L. R. and TYLER, B. F., **1987**: Incidence of endophytes in seeds from collections of *Lolium* and *Festuca* species. *Ann. Appl. Biol.*, 111: 59-64.
- LEUCHTMANN, A., **1992**: Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Natural toxins*, 1: 150-162.
- LEUCHTMANN, A. and CLAY, K., **1990**: Isozyme variation in the *Acremonium/Epichloa* fungal endophyte complex. *Phytopath.*, 80: 1133-1139.
- LEUCHTMANN, A. and CLAY, K., **1993**: Non reciprocal compatibility between *Epichloa typhina* and four host grasses. *Mycologia*, 85: 157-163.
- LEWIS, D. H., **1985**: Symbiosis and mutualism: crisp concepts and soggy semantics. In: Boucher, D. H. (Ed), *The Biology of Mutualism: Ecology and Evolution*, Croom Helm, London, 9.
- LEWIS, G. C. and CLEMENTS, R. O., **1986**: A survey of ryegrass endophyte (*Acremonium loliae*) in the U. K. and its apparent ineffectuality on a seedling pest. *J. Agric. Sci.* 107: 633-638.
- LEWIS, G. C. and CLEMENTS, R. O., **1990**: Effect of *Acremonium lolii* on herbage yield of *Lolium perenne* at three sites in the United Kingdom. In: S. S. Quisenberry and R. E. Joost (Ed.), *Proceedings of the International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*. Louisiana Agricultural Experiment Station, pp 289.
- LEWIS, G. C., RAVEL, C., NAFFAA, W., ASTIER, A. and CHARMET, G., **1997**: Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* spp. in European countries and a relationship between level of infection and climate in France. *Ann. appl. Biol.*, 130: 227-238.
- LYONS, P. C., PLATTNER, R. D. and BACON, C. W., **1986**: Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. *Scie.*, 232: 487-489.
- LYONS, P. C., EVANS, J. J. and BACON, C. W., **1990**: Effects of fungal endophyte *Acremonium coenophialum* on nitrogen accumulation and metabolism in tall fescue. *Plant Physiol. (Rockv)*, 92: 726-732.
- MAAG, D. D. and TOBISKA, M. S., **1956**: Fescue lameness in cattle II. Ergot alkaloids in tall fescue grass. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 17: 202-204.
- MAHMOOD, T., GERGERICH, R. C., MILUS, E. A., WEST, C. P. and D'ARCY, C. J., **1993**: Barley yellow dwarf viruses in wheat, endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Plant Disease*, 77: 225-229.
- MALINOWSKI, D., LEUCHTMANN, A., SCHMIDT, D. and NÖSBERGER, J., **1997**: Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* endophyte may increase the competitive ability of meadow fescue. *Agron. J.*, 89: 833-839.
- MANTLE, P. G. and PENN, J., **1989**: A role for paxilline in the biosynthesis of indole-diterpenoid penitremine mycotoxins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 1539-1540.
- MANTLE, P. G. and WEEDON, C. M., **1994**: Biosynthesis and transformation of tremorgenic indole-diterpenoids by *Penicillium paxilli* and *Acremonium lolii*. *Phytochem.*, 36: 1209-1217.
- MCCANN, J. S., CAUDLE, A. B., THOMPSON, F. N., STUEDEMANN, J. A., HEUSNER, G. L. and THOMPSON, D. L. JR., **1992**: Influence of endophyte-infected tall fescue on serum prolactin and progesterone in gravid mares. *J. Anim. Sci.*, 70: 217-223.
- MCMURPHY, W. E., LUSBY, K. S., SMITH, S. C., MUNTZ, S. H. and STRASIA, C. A., **1990**: Steer performance on tall fescue pasture. *J. Prod. Agric.*, 3: 100-102.
- MERRIMAN, G. M., **1955**: Fescue poisoning. *Tenn. Farm Home Sci.*, 16: 8.
- MIKA, V., **1990**: Endophytenprobleme bei Futtergräsern. 32. Fachtagung des Ausschusses für Gräser, Klee und Zwischenfrüchte am 5./6.12.1990 in Fulda. *Tagungsbericht der DLG*. pp. 123-129.
- MILES, C. O., WILKINS, A. L., GALLAGHER R. T., HAWKES, A. D., MUNDAY S. C. and TOWERS, N. R., **1992**: Synthesis and Tremorgenicity of Paxitrols and Lolitriol: Possible Biosynthetic Precursors of Lolitrem B. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 234-238.

- MILES, C. O., MUNDAY, S. C., WILKINS, A. L., EDE, R. M., HAWKES, A. D., EMBLING, P. P. and TOWERS, N. R., **1993**: Large scale isolation of lolitrem B, structure determination of some minor lolitrems, and tremorgenic activities of lolitrem B and paxilline in sheep. In: Hume, D. E., Latch, G. C. M. and Easton, H. S. (Ed.), Proc. 2nd Int. Symp. *Acremonium*/Grass Interactions, AgResearch, Grasslands Research Centre, Palmerston North, New Zealand, 85.
- MILES, C. O., MUNDAY, S. C., WILKINS, A. L., EDE, R. M. and TOWERS, N. R., **1994**: Large-Scale Isolation of Lolitrem B and Structure Determination of Lolitrem E. J. Agric. Food Chem. 42: 1488-1492.
- MONROE, J. L., CROSS, D. L., HUDSON, L. W., HENDRICKS, D. M., KENNEDY, S. W. and BRIDGES W. C., **1988**: Effects of selenium and endophyte-contaminated fescue on the performance and reproduction in mares. Equine Vet. Sci., 8: 148.
- MORGAN-JONES, G. and GAMS, W., **1982**: Notes on Hyphomycetes XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloa typhina*, new taxa in one of two sections of *Acremonium*. Mycotaxon, 15: 311-318.
- MORGAN-JONES, G., GAMS, W. and PIONTELLI, E. L., **1990**: Endophyte-host associations in forage grasses. XII. *Acremonium chilense*, an undescribed endophyte occurring in *Dactylis glomerata* in Chile. Mycotaxon, 39: 441-454.
- MORRIS, C. A., TOWERS, N. R., WHEELER, M. and AMYCES, N. C., **1995**: A note on the genetics of resistance or susceptibility to ryegrass staggers in sheep. N. Z. J. Agric. Res., 38: 367-371.
- MORTIMER, P. H. and DI MENNA, M. E., **1983**: Ryegrass staggers: further substantiation of a *Lolium* endophyte aetiology and the discovery of weevil resistance of ryegrass pastures infected with *Lolium* endophyte. Proc. NZ Grassl. Assoc., 44: 240-243.
- MORTIMER, P. H., YOUNG, P. W. and DI MENNA, M. E., **1984**: Perennial ryegrass staggers research - an overview. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod., 44: 181-184.
- MUMPTON, F. A. and FISHMAN, P. H., **1977**: The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. J. Anim. Sci., 45: 1188-1203.
- MUNDAY-FINCH, S. C., MILES, C. O., WILKINS, A. L. and HAWKES, A. D., **1995**: Isolation and Structure Elucidation of Lolitrem A, a Tremorgenic Mycotoxin from Perennial Ryegrass Infected with *Acremonium lolii*. J. Agric. Food Chem., 43: 1283-1288.
- MUNDAY-FINCH, S. C., WILKINS, A. L., MILES, C. O., EDE, R. M. and THOMSON, R. A., **1996**: Structure Elucidation of Lolitrem F, a Naturally Occurring Stereoisomer of the Tremorgenic Mycotoxin Lolitrem B, Isolated from *Lolium perenne* Infected with *Acremonium lolii*. J. Agric. Food Chem., 44: 2782-2788.
- MUNDAY-FINCH, S. C., WILKINS, A. L., MILES, C. O., TOMADA, H. and OMURA, S., **1997**: Isolation and Structure Elucidation of Lolilline, a Possible Biosynthetic Precursor of the Lolitrem Family of Tremorgenic Mycotoxins. J. Agric. Food Chem., 45: 199-204.
- MUNDAY-FINCH, S. C., WILKINS, A. L. and MILES, C. O., **1998**: Isolation of Lolicine A, Lolicine B, Lolitriol and Lolitrem N from *Lolium perenne* infected with *Neotyphodium lolii* and Evidence for the Natural Occurrence of 31-Epilolitrems N and 31-Epilolitrems F. J. Agric. Food Chem., 46: 590-598.
- NEIL, J. C., **1940**: The endophyte of ryegrass (*Lolium perenne*). N. Z. J. Sci. Technol. (Ser A), 21: 280-289.
- NEIL, J. C., **1941**: The endophytes of *Lolium* and *Festuca*. N. Z. J. Sci. Technol. (Ser. A), 23: 185-193.
- NOWACKI, E. K. and BYERRUM, R. U., **1962**: A study in the biosynthesis of the *Crotalaria* alkaloids. Life Sci., 1: 157-161.
- OLDENBURG, E., **1994**: Occurrence of fungal endophytes in *Lolium perenne*. In: Int. Conf. Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pastures and Turf. Krohn, K.; Paul, V. H. and Thomas, J. (Ed.), IOBC Bulletin, 17 (1): 99-104.
- OLDENBURG, E., **1996**: Occurrence of the alkaloid lolitrem B in endophyte-infected *Lolium perenne*. In: 2nd Int. Conf. Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pastures and Turf. Krohn, K. and Paul, V. H. (Ed.), IOBC Bulletin, 19 (7): 95-101.

- OSTBOMKE, H., **1998**: Untersuchungen zur Dynamik der Besiedlung von Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne* L.) mit dem endophytischen Pilz *Neotyphodium lolii* (Latch, Christensen & Samuels) Glenn, Bacon & Hanlin comb. nov.) (syn. *Acremonium lolii* (Latch, Christensen & Samuels)) in der praktischen Gräserzüchtung. Abschlussarbeit zur Erlangung des Titels Diplom-Agraringenieur (FH), Universität-Gesamthochschule Paderborn, Fachbereich Agrarwirtschaft
- OVERMAN, A. R. and WILKINSON, S. R., **1993**: Modelling tall fescue cultivar response to applied nitrogen. *Agron. J.*, 85: 1156-1158.
- PENN, J. and MANTLE, P. G., **1994**: Biosynthetic intermediates of indole-diterpenoid mycotoxins from selected transformations at C-10 of paxilline. *Phytochem.*, 35: 921-926.
- PENN, J., GARTHWAITE, I., CHRISTENSEN, M. J., JOHNSON C. M. and TOWERS, N. R., **1993**: The importance of paxilline in screening for potentially tremorgenic *Acremonium* isolates. In: Hume, D. E., Latch, G. C. M. and Easton, H. S. (Ed.), *Proc. 2nd Int. Symp. on Acremonium/Grass Interactions*. Feb. 4-6, 1993, Massey University, AgResearch, Palmerston, New Zealand, p. 88.
- PERELLINO, N. C., MALYSZKO, J., BALLABIO, M., GIOIA, B. and MINGHETTI, A., **1993**: Identification of ergobine, a new natural peptide ergot alkaloid. *J. Nat. Prod. (Lloydia)*, 56: 489-493.
- PETERS, C. W., GRIGSBY, K. N., ALDRICH, C. G., PATERSON, J. A., LIPSEY, R. J., KERLEY, M. S. and GARNER, G. B., **1992**: Performance, forage utilization, and ergovaline consumption by cow-calf pairs grazing endophyte fungus-infected tall fescue or endophyte fungus-free tall fescue, or orchardgrass pastures. *J. Anim. Sci.*, 70: 1550-1561.
- PETROSKI, R. J. and POWELL, R. G., **1991**: Preparative Separation of Complex Alkaloid Mixture by High-Speed Countercurrent Chromatography. *ACS Symp. Ser. (Nat. Occurring Pest Bioregul.)* 449: 426-434.
- PETROSKI, R. J., YATES, S. G., WEISLEDER, D. and POWELL, R. G., **1989**: Isolation, Semi-Synthesis, and NMR Spectral studies of Loline alkaloids. *J. Nat. Prod.*, 52: 810-817.
- PLATTNER, R. D., YATES, S. G. and PORTER, J. K., **1983**: Quadropole mass spectrometry/mass spectrometry of the ergot cyclol alkaloids. *J. Agric. Food Chem.* 31: 785-789.
- PORTER, J. K., **1994**: Chemical constituents of grass endophytes. In: C. W. Bacon and J. F. White, Jr. (Ed.), *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. Chap. 8 CRC Press, Boca Raton, FL.
- PORTER, J. K. and BETOWSKI, D., **1981**: Chemical ionization mass spectrometry of the ergot cyclol alkaloids. *J. Agric. Food Chem.* 29: 650-653.
- PORTER, J. K., BACON, C. W. and ROBBINS, J. D., **1979**: Lysergic acid amide derivatives from *Balansia epichloa* and *Balansia claviceps* (*Clavicipitaceae*). *J. Nat. Prod.*, 42: 309-314.
- PORTER, J. K., BACON, C. W., ROBBINS, J. D. and BETOWSKI, D., **1981**: Ergot alkaloid identification in *Clavicipitaceae* systemic fungi of pasture grasses. *J. Agric. Food Chem.* 29: 653-657.
- PORTER, J. K., BACON, C. W., PLATTNER, R. D. and ARRENDALE, R. F., **1987**: Ergot peptide alkaloid spectra of *Claviceps*-infected tall fescue, wheat, and barley. *J. Agric. Food Chem.* 35: 359-361.
- POWELL, R. G. and PETROSKI, R. G., **1992**: The loline group of pyrrolizidine alkaloids. In: Pelletier, S. W. (Ed) *The Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Springer Verlag, New York, Vol. 8: p 320.
- PRATT, A. D. and HAYNES, J. L., **1950**: Herd performance on Kentucky-31 fescue. *Ohio Farm Home Res.*, 35: 10-11.
- PRESTIDGE, R. A., **1993**: Causes and Control of perennial ryegrass staggers in New Zealand. *Agric. Ecosystems and Environ.*, 44: 283-300.
- PRESTIDGE, R. A. and GALLAGHER, R. T., **1989**: *Acremonium* endophyte in perennial ryegrass, ryegrass staggers in lambs, and growth of Argentine stem weevil larvae. *Proc. 5th Australian Conference on Grassland Invertebrate Ecology*, 15-16 August 1988, Melbourne, Stahle, P. P. (Ed), Vic. D&D Printing Pty., Victoria, Australia, 229-235.
- PRESTIDGE, R. A., POTTINGER, R. P. and BARKER, G. M., **1982**: An association of *Lolium* endophyte with ryegrass resistance to Argentine stem weevil. *Proceedings of the 35th New Zealand Weed and Pest Control Conference*, pp. 119-122.

- PULSFORD, M. F., **1950**: A note on lameness in cattle grazing on tall meadow fescue (*Festuca arundinacea*) in South Australia. *Aus. Vet. J.*, 26: 87-88.
- PUTMAN, M. R., BRANSBY, D. I., SCHUMACHER, J., BOOSINGER, T. R., BUSH, L. P., SHELBY, R. A., VAUGHAN, J. T. and BALL, D., **1991**: The effects of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in fescue on pregnant mares and foal viability. *Am. J. Vet. Res.*, 52: 2071-2074.
- RAVEL, C., WARTELLE, D. and CHARMET, G., **1994**: Artificial infection of tillers from perennial ryegrass mature plants with *Acremonium* endophytes. In: *Int. Conf. Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pastures and Turf*. Krohn, K.; Paul, V. H. and Thomas, J. (Ed.), IOBC Bulletin, 17 (1): 123-125.
- RAYNAL, G., **1991**: Observations francaises sur les *Acremonium*, champignons endophytes des graminées fourragères. *Fourrages*, 126: 225-237.
- RHODES, M. T., **1991**: Fescue toxicosis affects blood flow and prolactin. Ph.D. Dissertation. Univ. of Missouri, Columbia
- RIEDEL, W. E., KIECKHEFER, R. E., PETROSKI, R. J. and POWELL, R. G., **1991**: Naturally-occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: Insect feeding behavior modification and toxicity. *J. Entomol. Sci.* 26 (1): 122-129.
- ROLSTON, M. P., **1993**: Use of endophyte in plant breeding and the commercial release of new endophyte-grass associations. *Proc. of the Second International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*, New Zealand, February 1993, pp. 171-174.
- ROSSI, C., **1959**: An episode of intoxication by *Festuca arundinacea* in cows of Val d'Aosta. *Vet. Ital.*, 10: 853-864.
- ROTTINGHAUS, G. E., GARNER, G. B., CORNELL, C. N. and ELLIS, J. L., **1991**: An HPLC method for quantitating ergovaline in endophyte-infected tall fescue: seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades and seed heads. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 112-115.
- ROWAN, D. D., **1993**: Lolitrems, peramine and paxilline: Mycotoxins of ryegrass/endophyte interaction. *Agric. Ecosystems and Environ.*, 44, 103-122.
- ROWAN, D. D. and SHAW, G. J., **1987**: Detection of ergopeptine alkaloids in endophyte-infected perennial ryegrass by tandem mass spectrometry. *N. Z. Vet.* 35: 197-198.
- ROWAN, D. D., DYMOCK, J. J. and BRIMBLE, M. A., **1990**: Effect of fungal metabolite peramine and analogs on feeding and development of Argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). *J. Chem. Ecol.* 16: 1683-1695.
- ROWAN, D. D., HUNT, M. B. and GAYNOR, D. L., **1986**: Peramine, a novel insect feeding deterrent from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium loliae*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 935-936.
- ROYLANCE, J. T., HILL, N. S. and AGEE, C. S., **1994**: Ergovaline and Peramine production in endophyte-infected Tall Fescue: independent Regulation and effects of plant and endophyte genotype. *J. Chem. Ecol.*, Vol. 20, No. 9: 2171-2183.
- SACKVILLE-HAMILTON, R., CHORLTON, K. and THOMAS, I., **1993**: Forage genetic resources research. Institute of Grassland and Environmental Research Report 1992: 26-27.
- SAHA, D. C., JACKSON, M. A. and JOHNSON-CICALESE, J. M., **1988**: A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopath.*, 78 (2): 237-239.
- SAMFORD, M. D., BACHMANN, S. E., FORCHERIO, J. C., KERLEY, M. S., MARTZ, F., PATERSON, J. A. and HALLFORD, D. M., **1993**: Use of zeolite supplementation as a possible treatment for cattle grazing endophyte-infected tall fescue. *J. Anim. Sci.* 71(Suppl. 1): 78 (Abstr.).
- SAMPSON, K., **1933**: The systemic infection of grasses by *Epichloa typhina* (Pers.) Tul. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 18: 30-47.
- SCHARDL, C., WILKINSON, H. H., BUSH, L. P., BURTON, H. R. and SIEGEL, M. R., **1997**: Lolines are fungal metabolites. *International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium*. Athens, Georgia, USA, Book of Abstracts, 27.
- SCHMIDT, D., **1986**: La quenouille rend-elle le fourrage toxique ? *Revue suisse Agric.*, 18 (6): 329-332.

- SCHMIDT, D., **1994**: Du nouveau sur les endophytes de la fétuque des prés. *Revue Suisse Agric.* 26 (1): 57-63.
- SCHMIDT, S. P., HOVELAND, C. S., CLARK, E. M., DAVIS, N. D., SMITH, L. A., GRIMES, H. W. and HOLLIMAN, J. L., **1982**: Association of an endophytic fungus with fescue toxicity in steers fed Kentucky 31 tall fescue seed or hay. *J. Anim. Sci.*, 55: 1259-1263.
- SCHÖBERLEIN, W. und PFANNMÖLLER, M., **1996**: Endophytische Pilze in mehrjährigen Nutzgräsern - Problem oder Vorteile? 47. Arbeitstagung 1996 der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtler im Rahmen der "Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter", BAL Gumpenstein, 26-28. November 1996, 185-195.
- SHELBY, R. A., **1992**: Improved HPLC method for the detection of ergot alkaloids. In: Proc. Tall Fescue Workshop, Southern Extension and Research Activity Information Exchange, Memphis, 3.
- SIEGEL, M. R., **1993**: *Acremonium* endophytes: our current state of knowledge and future directions for research. *Agric. Ecosystems and Environ.*, 44: 301-321.
- SIEGEL, M. R., LATCH, G. C. M. and JOHNSON, M. C., **1985**: *Acremonium* Fungal Endophytes of Tall Fescue and Perennial Ryegrass: Significance and Control. *Plant Disease*, 69 (2): 179-183.
- SIEGEL, M. R., LATCH, G. C. M. and JOHNSON, M. C., **1987**: Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Phytopath.*, 25: 293-315.
- SIEGEL, M. R., LATCH, G. C. M., BUSH, L. B., FANNIN, F. F., ROWAN, D. D., TAPPER, B. A., BACON, C. W. and JOHNSON, M. C., **1990**: Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *J. Chem. Ecol.* 16: 3301-3315.
- SLEPER, D. A., GARNER, G. B., ASAY, K. H., BOLAND, R. and PICKETT, E. E., **1977**: Breeding for Mg, Ca, K, and P content in Tall fescue. *Crop Sci.*, 17: 433-438.
- SOCIC, H. and GABERC-POREKAR, V., **1992**: Biosynthesis and physiology of ergot alkaloids. In: Arora, D. K., Elander, R. P. and Mukerji, K. G. (Ed), *Handbook of Applied Mycology, Fungal Biotechnology*, Vol. 4, Marcel Dekker, New York, 475.
- STEARNS, T. J., **1953**: Fescue foot or ergot-like disease in cattle in Kentucky. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 122: 388-389.
- STEWART, A. and DEACON, J. W., **1995**: Vital Fluorochromes as Tracers for Fungal Growth Studies. *Biotech. and Histochem.* 70 (2): 57-65.
- STRICKER, J. A., MATCHES, A. G., THOMPSON, G. B., JACOBS, V. E., MARTZ, F. A., WHEATON, H. N., CURRENCE, H. D. and KRAUSE, G. F., **1979**: Cow-calf production on tall fescue-ladino clover pastures with and without nitrogen fertilization or creep feeding: spring calves. *J. Anim. Sci.*, 48: 13-25.
- STILHAM, W. D., BROWN, C. J., DANIELS, L. B., PIPER, E. L., and FETHERSTONE, H. E., **1982**: Toxic fescue linked to reduced milk output in ewes. *Arkansa Farm Res.* 31: 9-.
- STUEDEMANN, J. A. and THOMPSON, F. N., **1993**: Management strategies and potential opportunities to reduce the effects of endophyte-infected tall fescue on animal performance. *Proc. of the Second International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*, New Zealand, February 1993, pp. 103-114.
- TACKHOLM, V. and TACKHOLM, G., **1941**: *Flora of Egypt*. Cairo University, Egyptian University Press, Cairo, Egypt.
- TAPPER, B. A., ROWAN, D. D. and LATCH, G. C. M., **1989**: Detection and measurement of the alkaloid Peramine in Endophyte-infected grasses. *J. Chromatogr.*, 463: 133-138.
- TEPASKE, M. R., POWELL, R. G. and PETROSKI, R. J., **1993**: Quantitative analysis of bovine urine and blood plasma for loline alkaloids. *J. Agric. Food Chem.* 41: 231-234.
- THOMPSON, F. N. and GARNER, G. B., **1994**: Vaccines and pharmacological agents to alleviate fescue toxicosis. In: Bacon, C. W. and White, J. F. Jr., *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. CRC Press. pp. 125-131.
- THORNTON, R. H., **1964**: An examination of ergot in relation to ryegrass staggers. *N. Z. Vet. J.*, 12: 13-16.
- TRETHERWIE, E. R., GAFFNEY, F. M. and GLADWELL, P. J., **1954**: Pharmacological studies of grasses obtained from a property where fescue lameness in cattle occurs. *Aust. J. Exp. Biol.*, 32: 203-211.

- TUFARIELLO, J. J., MECKLER, H. and WINZENBERG, K., **1986**: Synthesis of the Lolium Alkaloids. *J. Org. Chem.*, 51: 3356-3357.
- TYLER, B. F., CHORLTON, K. H. and THOMAS, I. D., **1981**: Extending genetic resources. Annual Report for Welsh Plant Breeding Station for 1980: 44-46.
- TYLER, B. F., CHORLTON, K. H. and THOMAS, I. D., **1982**: Extending and maintaining genetic resources. Annual Report for Welsh Plant Breeding Station for 1981: 183-191.
- VAN HEESWIJCK, R. and McDONALD, G, **1992**: *Acremonium* endophytes in perennial ryegrass and other pasture grasses in Australia and New Zealand. *Aus. J. Agric. Res.*, 43: 1683-1709.
- WALLER, J. C., McLAREN, J. B., FRIBOURG, H. A., CHESTNUT, A. B. and KELTNER, D. G., **1989**: Effect of *Acremonium coenophialum* infected *Festuca arundinacea* on cow-calf production. In: Proc. 16th Int. Grassl. Congr., Oct. 4-11, Nice, France. p 1193.
- WEBER, H. (Hrsg.), **1993**: Allgemeine Mykologie, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 451 S.
- WEEDON, C. M. and MANTLE, P. G., **1987**: Paxilline biosynthesis by *Acremonium loliae*; a step towards defining the origin of Lolitrem neurotoxins. *Phytochem.*, 26 (4): 969-971.
- WELTY, R. E., MILBRATH, G. M., FAULKENBERRY, D., AZEVEDO, M. D., MEEK, L. and HALL, K., **1986**: Endophyte detection in tall fescue by staining and ELISA. *Seed Sci. Technol.* 14: 105-116.
- WEST, C. P., **1994**: Physiology and drought tolerance of endophyte-infected grasses. In: C. W. Bacon, C. W. and White, J. F. Jr. (Ed.), *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. CRC Press, pp. 87-99.
- WEST, C. P., IZEKOR, E., OOSTERHUIS, D. M. and ROBBINS, R. T., **1988**: The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant Soil*, 112: 3-6.
- WEST, C. P., IZEKOR, E., ELMI, E., ROBBINS, R. T. and TURNER, K. E., **1989**: Endophyte effects on drought tolerance, nematodes infestation and persistence of tall fescue. In: C. P. West (Ed.), *PROC: Arkansas Fescue Toxicosis Conf.*, 10 July, Boone, No. 140 Arkansas Agric. Exp. Stn., Univ. of Arkansas, Fayetteville, Ak, 23-27.
- WHITE, J. F. JR., **1994**: Taxonomic relationships among the members of the *Balansieae* (*Clavicipitales*). In: Bacon, C. W. and White, J. F., *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 214 S.
- WHITE, J. F. JR. and COLE, G. T., **1986**: Endophyte-host associations in forage grasses. IV. The endophyte of *Festuca versuta*. *Mycologia*, 78: 102-107.
- WHITE, J. F. JR. and MORGAN-JONES, G., **1987a**: Endophyte-host associations in forage grasses. VII. *Acremonium chisosum*, a new species isolated from *Stipa eminens* in Texas. *Mycotaxon*, 28: 179-189.
- WHITE, J. F. JR. and MORGAN-JONES, G., **1987b**: Endophyte-host associations in forage grasses. X. Cultural studies of some species of *Acremonium* sect. *Albo lanosa*, including a new species, *A. starrii*. *Mycotaxon*, 30: 87-95.
- WHITE, J. F. JR., COLE, G. T. and MORGAN-JONES, G., **1987**: Endophyte-host associations in forage grasses. VI. A new species of *Acremonium* isolated from *Festuca arizonica*. *Mycologia*, 79: 148-152.
- WHITE, R. H., ENGELKE, M. C., MORTON, S. J., HOHNSON-CICALESE, J. M. and RUEMMELE, B. A., **1992**: *Acremonium* endophyte effects on tall fescue drought tolerance. *Crop Sci.*, 32: 1392-1396.
- WHITE, J. F. JR., MORGAN-JONES, G. and MORROW, A. C., **1993**: Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agric. Ecosystems and Environ.*, 44: 13-37.
- WURST, M., FLIEGER, M. and REHACEK, Z., **1978**: Analysis of ergot alkaloids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 150: 477-483.
- YATES, S. G. and POWELL, R. G., **1988**: Analysis of ergopeptine alkaloids in endophyte-infected tall fescue. *J. Agric. Food Chem.* 36: 337-340.
- YATES, S. G. and TOOKEY, H. L., **1965**: Festucine, an alkaloid from tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.): Chemistry of the functional groups. *Aust. J. Chem.*, 18: 53-60.

- YATES, S. G., PLATTNER, R. D. and GARNER, G. B., **1985**: Detection of ergopeptine alkaloids in endophyte-infected, toxic K-31 fescue by mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 33: 719-722.
- YATES, S. G., FENSTER, J. C. and BARTELT, R. S., **1989**: Assay of tall fescue seed extracts, fractions and alkaloids using the large milkweed bug. *J. Agric. Food Chem.* 37: 354-357.
- YATES, S. G., PETROSKI, R. J. and POWELL, R. G., **1990**: Analysis of Loline Alkaloids in Endophyte-Infected Tall Fescue by Capillary Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 38: 182-185.

9. Anhang

Tab. 34: *Neotyphodium lolii*-Besiedlung in % und Lolitrem B-Gehalte in µg/kg TM in Karyopsen verschiedener *Lolium perenne*-Sorten und rumänischen *Lolium perenne*-Ökotypen in 1997

Sorte bzw. Ökotyp	<i>Neotyphodium</i> -Besiedlung in %	Lolitrem B-Gehalt in µg/kg TM
Sorte A ⁺	83	6595
Sorte A ⁻	0	n. n.
Sorte B ⁺	72	4697
Sorte B ⁻	2	n. n.
Sorte C ⁺	78	6390
Sorte C ⁻	0	n. n.
Sorte D	36	2722
Sorte E	92	6374
Sorte F	0	n. n.
Sorte G	12	982
Sorte H	3	398
Sorte I	34	2003
Sorte J	0	n. n.
Sorte K	43	4246
Sorte L	31	1269
Sorte M	15	1724
Sorte N	75	2485
Sorte O	0	n. n.
Sorte P	0	n. n.
Sorte Q	8	704
Sorte Q	11	416
Sorte R	12	784
Rö 29	83	n. n.
Rö 35	0	n. n.
Rö 40	0	n. n.
Rö 41	100	n. n.
Rö 47	16	n. n.
Rö 52	100	n. n.
Rö 57	98	n. n.
Rö 58	0	n. n.
Rö 61	3	n. n.
Rö 74	97	n. n.
Rö 83	97	n. n.
Rö 84	0	n. n.
Rö 96	100	n. n.
Rö 101	0	n. n.
Rö 109	0	n. n.
Rö 119	100	2129
Rö 125	0	n. n.
Rö 126	0	n. n.

Rö 134	90	1941
Rö 143	0	n. n.
Rö 147	0	n. n.
Rö 169	56	n. n.
Rö 170	85	n. n.
Rö 176	73	n. n.
Rö 188	0	n. n.
Rö 189	0	n. n.
Rö 191	15	n. n.
Rö 192	0	n. n.
Rö 193	0	n. n.
Rö 198	94	2251
Rö 203	89	n. n.
Rö 212	0	n. n.
Rö 223	98	86
Rö 264	0	n. n.
Rö 267	0	n. n.
Rö 281	100	n. n.
Rö 283	5	n. n.
Rö 294	0	n. n.
Rö 298	0	n. n.
Rö 305	0	n. n.
Rö 323	0	n. n.
Rö 332	0	n. n.
Rö 345	0	n. n.
Rö 348	0	n. n.
Rö 351	0	n. n.
Rö 358	0	n. n.
Rö 365	0	n. n.
Rö 382	100	3789
Rö 410	12	n. b.
Rö 421	0	n. n.
Rö 422	95	n. n.
Rö 435	0	n. n.
Rö 452	100	n. n.

n. n. = nicht nachweisbar; n. b. = nicht bestimmbar

Jahressumme Niederschlag 1996: 559,3 mm
Jahresmittel Temperatur 1996: 7,8 °C

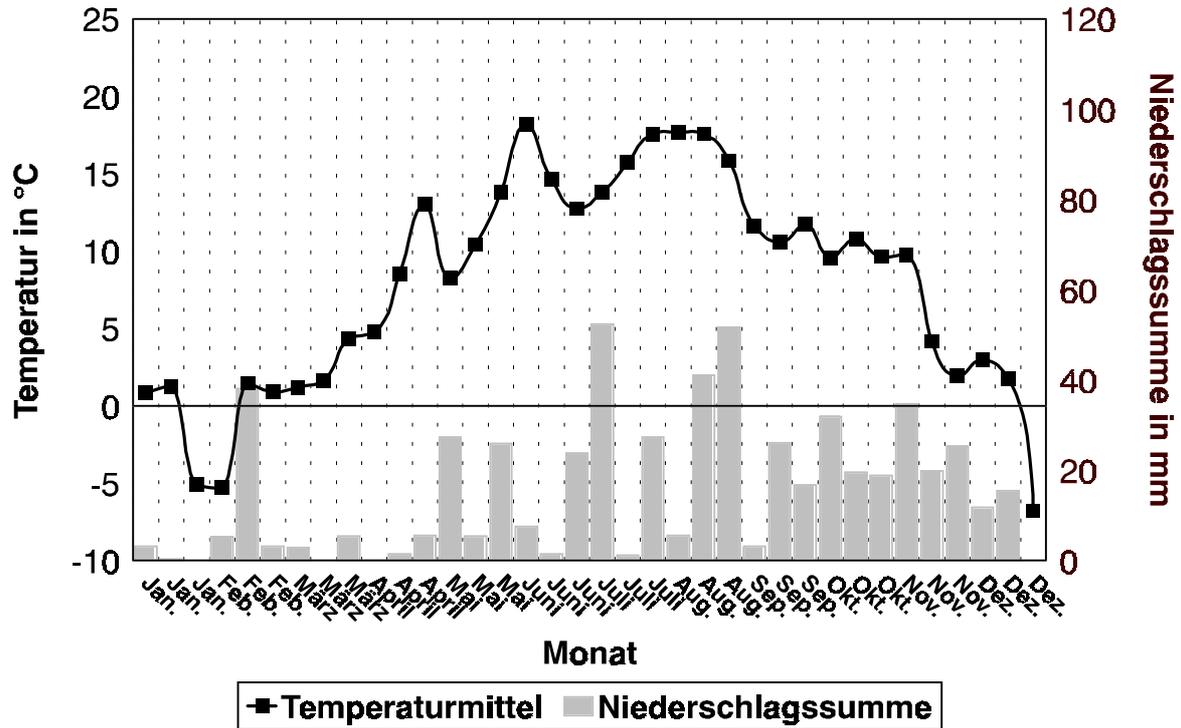


Abb. 48: Temperaturverlauf und Niederschlagssumme im Versuchsjahr 1996, gemessen am Versuchsstandort Merklingsen (Versuchsgut der Uni-GH Paderborn)

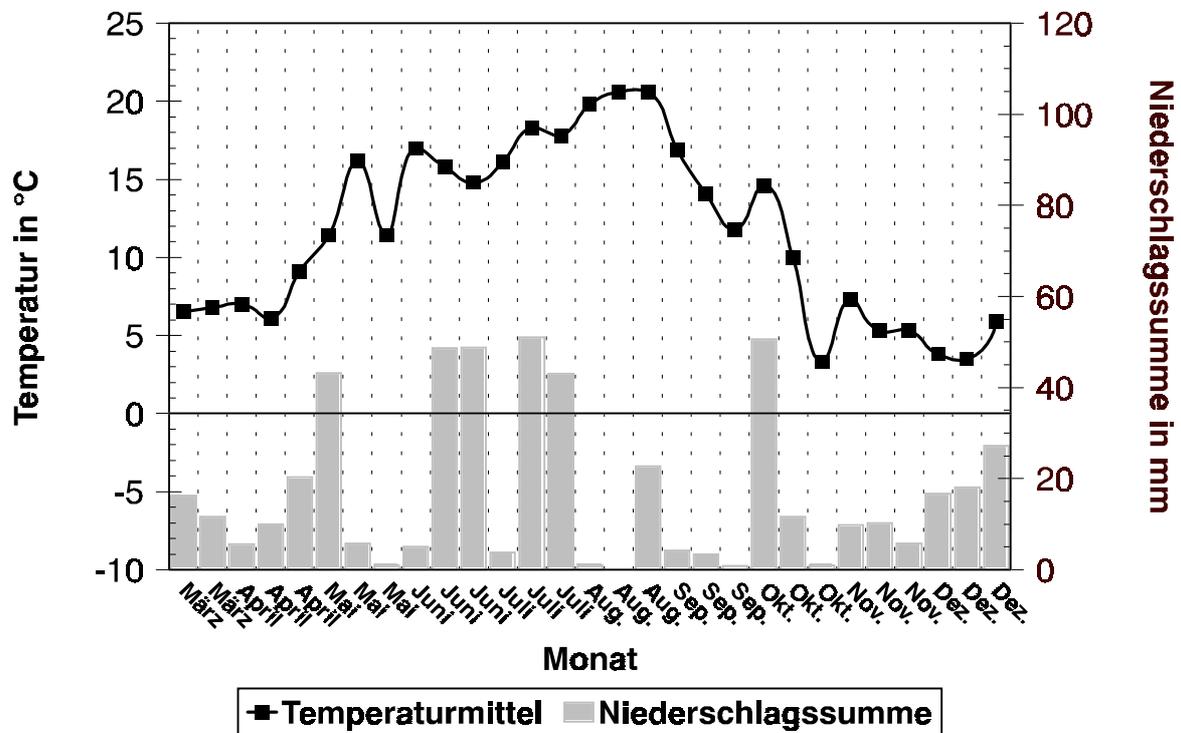


Abb. 49: Temperaturverlauf und Niederschlagssumme im Versuchsjahr 1997, gemessen am Versuchsstandort Merklingsen (Versuchsgut der Uni-GH Paderborn)

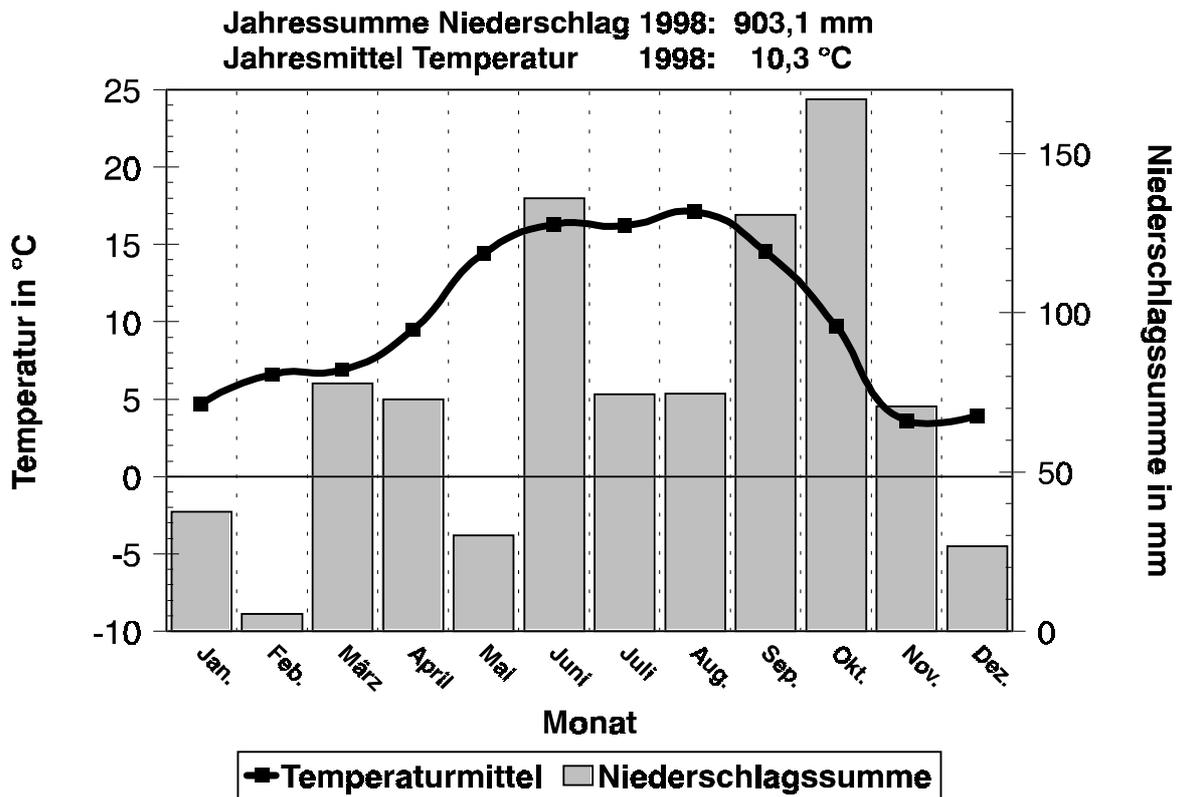


Abb. 50: Temperaturverlauf und Niederschlagssumme im Versuchsjahr 1998, gemessen am Versuchsstandort Merklingsen (Versuchsgut der Uni-GH Paderborn)

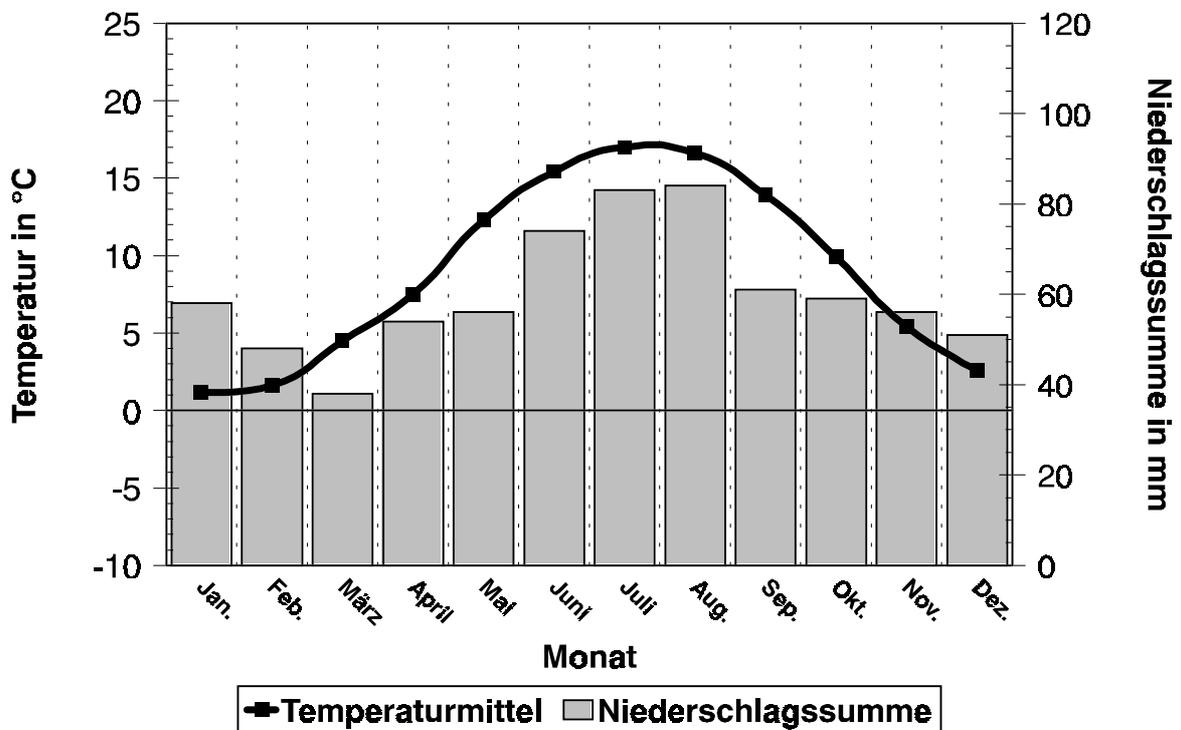


Abb. 51: Witterungsdaten (Temperaturverlauf und Niederschlagssumme), langjähriges Mittel (Monatsmittel der Jahre 1952-1982) am Standort Bad Sassendorf

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Krohn gilt mein Dank für die Möglichkeit, im Fachbereich Chemie und Chemietechnik der Universität-Gesamthochschule Paderborn promovieren zu können.

Herrn Prof. Dr. V. H. Paul danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Den Mitarbeitern des Labores für Biotechnologie und Qualitätssicherung und den Mitarbeitern des Fachbereiches Agrarwirtschaft danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Für die Anlage und Durchführung der Freilandversuche gilt mein besonderer Dank den Mitarbeitern des Versuchsgutes Merklingsen des Fachbereiches Agrarwirtschaft der Universität-Gesamthochschule Paderborn.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Pflanzenzuchtunternehmen, insbesondere bei Herrn Dr. U. Feuerstein (DSV) und bei Herrn E. Ganzeboom (Cebeco), für die Überlassung von Saatgutproben.

Für die Durchführung analytischer Arbeiten auf dem Gebiet der NIR-Spektroskopie danke ich Frau Dipl. Ing. D. Timm (Fa. Bran+Luebbe) und Herrn R. Winzen des NIR/IR-Supports der Universität Essen.

Dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten sowie der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung (GFP) danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

