

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Material und Methoden	7
2.1 Erreger	7
2.1.1 Taxonomie	7
2.1.2 Lebenszyklus	9
2.2 <i>Drechslera</i> -Isolate	9
2.2.1 <i>In vitro</i> -Kultivierung	10
2.2.1.1 Feste Nährmedien	10
2.2.1.2 Flüssige Nährmedien	10
2.3 Wachstum der Pilz-Isolate	11
2.3.1 Auf festem Nährmedium	11
2.3.1.1 Einfluß von Nährböden	11
2.3.1.2 Einfluß der Temperatur	11
2.3.1.3 Einfluß des pH-Wertes	12
2.3.2 In flüssigem Medium	12
2.3.2.1 Schüttelkultur	12
2.3.2.2 Standkultur	12
2.4 Sorten von <i>Lolium perenne</i>	13
2.5 Methodische Untersuchungen zur Infektion von <i>Drechslera</i> -Pathogenen	13
2.5.1 Bonitur des Befalls	13
2.5.1.1 Gewächshaustest	13
2.5.1.2 Detached Leaf Technik (DLT)	13
2.5.2 Stichprobenumfang	14
2.5.2.1 Gewächshaustest	14
2.5.2.2 DLT	14
2.5.3 Künstliche Infektionstechniken	14
2.5.3.1 Sporeninokulation	14
2.5.3.2 Myzelinokulation	15
2.5.3.3 Inokulation des DLT	15
2.5.3.4 Einfluß der relativen Feuchte	16
2.5.3.5 Sortenscreening in 5 Ländern	16
2.5.4 Untersuchung zur Inokulationsdichte von <i>Drechslera</i>	17
2.5.4.1 Gesamte Pflanze	17
2.5.4.2 Blattstücke	17
2.5.5 Untersuchung zur Prädisposition der Pflanze	18
2.5.5.1 Anfälligkeit verschiedener Blattetagen von <i>L. perenne</i>	18
2.5.5.2 Anfälligkeit in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen	18
2.5.6 Vergleich der künstlichen Infektion von ganzen Pflanzen und DLT	18
2.6 Wirtspflanzenkreisbestimmung von <i>D. siccans</i> und <i>D. andersenii</i>	18

2.7	Histologische Untersuchung zum Infektionsprozeß von <i>Drechslera</i>	19
2.7.1	Totalpräparate	19
2.7.2	Epidermisabzüge	19
2.7.3	Semidünnschnitte	20
2.8	Beeinträchtigung der Ertrags- und Qualitätsparameter von <i>L. perenne</i> nach <i>D. siccans</i>-Infektion	20
2.8.1	Einfluß unterschiedlicher N-Versorgung	20
2.8.2	Veränderung von Inhaltsstoffen	21
2.8.3	Freilandversuche zur Ertrags- und Qualitätsbeeinflussung	21
2.8.3.1	Filde	22
2.8.3.2	Hohe Rott	22
2.9	Untersuchung toxischer Metabolite von <i>D. siccans</i> und <i>D. andersenii</i>	22
2.9.1	Erreger und Testsorten	22
2.9.2	Biotests	23
2.9.3	Kulturfiltrat (Kf)	24
2.9.3.1	Erstellung	24
2.9.3.2	Wirkung des Kf	25
2.9.3.3	Dosis-Wirkung-Beziehung der Kf	26
2.9.3.3.1	An Blattstücken	26
2.9.3.3.2	An Samen	26
2.9.3.4	Wirtsspezifität des Kulturfiltrates	26
2.9.3.5	Sortentests mit Kf von <i>D. siccans</i> und <i>D. andersenii</i>	27
2.9.3.5.1	Blattuntersuchungen	27
2.9.3.5.2	Keimuntersuchungen	27
2.9.3.6	Untersuchung zur qualitativen Bestimmung der Kulturfiltratmetabolite	27
2.9.3.7	Dünnschichtchromatographische Trennung	27
2.9.3.8	Massenspektrometrische Untersuchungen	27
2.9.4	Extraktion toxischer Metabolite aus Myzel von <i>D. andersenii</i> und <i>D. siccans</i>	30
2.10	Genetische Charakterisierung vom <i>Drechslera</i>-Arten	30
2.10.1	Isolierung löslicher Proteine	30
2.10.2	Herstellung der Gele	31
2.10.2.1	Stammlösungen	32
2.10.2.2	SDS-PAGE-Gele	33
2.10.2.2.1	Gradientengele	33
2.10.2.3	IEF-Gele	34
2.10.2.4	Native Gele	34
2.10.2.5	Pufferstreifen	34
2.10.3	Aufbereitung der Porben für die SDS-Gelelektrophorese	35
2.10.4	Elektrophoretische Trennung der Gele	35
2.10.4.1	SDS-PAGE-Gele	35
2.10.4.2	IEF-Gele	36
2.10.4.3	Native Gele	36
2.10.5	Nachweis der Proteine im Gel	37
2.10.5.1	Coomassie-Färbung	37
2.10.5.2	Silberfärbung	37

2.10.6 Nachweis der Enzyme im Gel	39
2.10.6.1 Enzymfärbungen	39
2.10.6.2 Co-Elektrophorese	42
2.10.7 Auswertung und Photographie der Gele	42
2.11 Numerische Taxonomie von <i>Drechslera</i>-Arten	42
2.12 Statistische Verrechnung	42
3. Ergebnisse	44
3.1 Auftreten von <i>Drechslera</i>-Blattfleckenerregern an <i>Lolium</i> spp.	44
3.2. Wachstum und Sporulation <i>in vitro</i>	44
3.2.1 Feste Nährmedien	44
3.2.1.1 Vergleich von 6 Nährböden.	45
3.2.1.2 Temperaturbedingungen	47
3.2.1.3 PH-Wert.....	47
3.2.1.4 Wachstumsverlauf von <i>D. siccans</i> , <i>D. andersenii</i> , <i>D. dictyoides</i> ..	49
3.2.2 Flüssigmedium	51
3.2.2.1 Schüttelkultur	51
3.2.2.1.1 Veränderung der Biomasse.....	52
3.2.2.1.2 PH-Wert-Änderung des Mediums	52
3.2.2.1.3 Proteingehalt des Myzels	54
3.2.2.2 Standkultur.....	54
3.2.2.2.1 Veränderung der Biomasse.....	55
3.2.2.2.2 PH-Wert Änderung des Mediums während der Kulturdauer.....	56
3.3 Inokulation mit <i>Drechslera</i>-Pathogenen	57
3.3.1 Einfluß der relativen Luftfeuchte	57
3.3.2 Anfälligkeit verschiedener Blättertagen von <i>L. perenne</i>	57
3.3.3 Alter der Pflanzen	58
3.3.4 Optimierung des Stichprobenumfanges	59
3.3.4.1 Ganzpflanzentest	59
3.3.4.2 Detached leaf Test	60
3.3.5 Optimierung der Inokulumdichte von <i>Drechslera</i> im DLT	60
3.4 Infektion und Besiedelung der <i>Drechslera</i>-Erreger	62
3.4.1 Keimung und Penetration	62
3.4.2 Ausbreitung im Gewebe	64
3.5 Untersuchungen zur Krankheitsresistenz	65
3.5.1 <i>in vivo</i> -Versuche	65
3.5.1.1 Sortenexperimente mit zwei <i>D. siccans</i> -Isolaten	65
3.5.1.2 Sortenexperimente mit <i>D. siccans</i> und <i>D. andersenii</i>	68
3.5.2 semi <i>in vitro</i> -Versuche	72
3.5.2.1 Sortenexperimente mit <i>D. siccans</i> und <i>D. andersenii</i>	72
3.5.3 Vergleich von Ganzpflanzeninfektion und DLT	76

3.6	Pathogenität verschiedener <i>Drechslera</i>-Herkünfte	78
3.6.1	Aggressivität	78
3.6.2	Virulenz	79
3.7	Numerische Taxonomie von <i>Drechslera</i>-Arten	83
3.7.1	Clusteranalyse	83
3.7.1.1	Mit morphologischen Merkmalen	83
3.7.1.2	Mit Merkmalen des Kultivierungshabitus	83
3.7.1.3	Mit allen Merkmale	83
3.8	Wirtspflanzenkreis von <i>D. siccans</i> und <i>D. andersenii</i>	85
3.9	Ertrags- und Qualitätsverluste nach Befall mit <i>D. siccans</i>	88
3.9.1	Auswirkung unterschiedlicher N-Versorgung auf den Befall von <i>L. perenne</i>	88
3.9.2	Veränderung der Inhaltsstoffe von <i>L. perenne</i>	90
3.9.3	Beeinflussung von Ertrag und Qualität	93
3.9.3.1	Freilandversuche	93
3.9.3.1.1	Versuch Filde	93
3.9.3.1.2	Versuch Hohe Rott	97
3.10	Wirkung von toxischen <i>Drechslera</i>-Stoffwechselprodukten	101
3.10.1	Biomasseproduktion von <i>Drechslera</i> -Isolaten	101
3.10.2	Einfluß des Kulturfiltrates	103
3.10.2.1	Eigenschaften bei unterschiedlichem Alter	103
3.10.2.2	Toxizität bei unterschiedlichem Alter	104
3.10.2.2.1	An Keimlingen	104
3.10.2.2.2	An Blättern	104
3.10.2.2.3	An Samen	106
3.10.3	Dosis-Wirkung-Beziehung	107
3.10.3.1	An Blattstücken	107
3.10.3.2	An Samen	108
3.10.4	Wirtsspezifität der isolierten Toxine	109
3.10.5	Sortenreaktionen auf das Kulturfiltrat	110
3.10.5.1	An Blattstücken	110
3.10.5.2	An Samen	110
3.10.6	Isolation toxischer Metabolite verschiedener <i>Drechslera</i> -Isolate	111
3.10.6.1	Aus Kulturfiltrat	111
3.10.6.2	Aus Myzel	112
3.10.7	Qualitative Bestimmung der Metabolite des Kulturfiltrates	113
3.10.7.1	Fraktionierung des Kulturfiltrates	113
3.10.7.2	Dünnschichtchromatographische Trennung	116
3.10.7.2.1	Kulturfiltrate	116
3.10.7.2.2	Fraktionierte Kulturfiltrate	118
3.10.7.3	Analyse im Massenspektrometer	121
3.10.7.3.1	Einfache Massenspektrometrie	121
3.10.7.3.2	MS/MS-Kopplung	124
3.10.7.4	Charakterisierung der toxisch aktiven Metabolite	125

3.11 Genetische Charakterisierung der Proteine von <i>Drechslera</i> spp.	126
3.11.1 SDS-Elektrophorese	126
3.11.1.1 Gradientengele	126
3.11.1.2 12,5% Homogene Gele	128
3.11.2 Native Elektrophorese	128
3.11.3 Isoelektrische Fokussierung	130
3.11.3.1 Unspezifische Proteinfärbung	130
3.11.3.2 Isoenzymfärbung	130
3.11.3.2.1 Malatdehydrogenase (MDH)	132
3.11.3.2.2 6-Phospho-Gluconsäuredehydrogenase (PGD)	132
3.11.3.2.3 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GD)	133
3.11.3.2.4 NADH-Diaphorase (DIA)	134
3.11.3.2.5 Phosphoglucomutase (PGM)	135
3.11.3.2.6 α -Esterasen	136
3.11.3.2.7 Saure Phosphatase (ACP)	137
3.11.3.2.8 Glucosephosphat-Isomerase (GPI)	137
3.11.4 Untersuchung zur genetischen Verwandtschaft der <i>Drechslera</i> -Isolate	138
4. Diskussion	140
4.1 Auftreten von <i>Drechslera</i> -Erregern an <i>L. perenne</i>	140
4.2 Wachstum und Sporulation <i>in vitro</i>	141
4.3 Inokulation mit <i>Drechslera</i> -Pathogenen	144
4.4 Infektion und Besiedlung der <i>Drechslera</i> spp.	147
4.5 Untersuchungen zur Krankheitsresistenz	148
4.6 Pathogenität verschiedener <i>Drechslera</i> -Herkünfte	149
4.7 Ertrags- und Qualitätsverluste nach Befall mit <i>D. siccans</i>	151
4.8 Taxonomie von <i>Drechslera</i> -Arten	154
4.9 Wirkung von toxischen <i>Drechslera</i> -Stoffwechselprodukten	156
4.10 Genetische Charakterisierung der <i>Drechslera</i> -Isolate	164
5. Zusammenfassung und Ausblick	168
6. Literatur	171
Anhang	181