

1 EINLEITUNG	1
1.1 Bedeutung der Gräserendophyten	1
1.2 Gräserendophyten	6
1.1.1 Nachweis der Gräserendophyten	10
1.3 Alkaloide als Ursache für die endophytinduzierten Auswirkungen auf ihre Wirte	13
1.3.1 Peramin	13
1.3.2 Lolin-Alkaloide	14
1.3.3 Ergot-Alkaloide	16
1.3.4 Paxillin und Lolitrems	18
1.3.5 Perlolin	20
1.4 Problemstellung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Herkunft und Bezeichnung der <i>Acremonium</i>-Isolate	24
2.2 Herkunft und Bezeichnung der Versuchspflanzen der Gattungen <i>Lolium</i> und <i>Festuca</i>	25
2.2.1 Freilandproben von Dauergrünland aus dem Raum Duisburg (NRW)	26
2.2.2 <i>Lolium perenne</i> -Anteil auf den Gesamtflächen	26
2.2.3 Untersuchung des Probenmaterials	27
2.3 Nachweis von <i>Acremonium</i> in Karyopsen und Pflanzen von <i>Lolium</i> und <i>Festuca</i>	27
2.3.1 Mikroskopische Färbennachweise von <i>Acremonium</i>	27
2.3.1.1 Anilinblau-Färbung von Karyopsen	28
2.3.1.2 Fluoreszeindiacetat (FDA)-Färbung von Karyopsen	28
2.3.1.3 Nachweis von Endophyten in Blattscheiden von Gräsern mit Anilinblau	29
2.3.1.4 Nachweis vitaler Endophyten in Blattscheiden von Gräsern mit FDA	29
2.3.2 Nachweis durch direkte Isolierung der Endophyten aus Karyopsen und Pflanzenteilen	30
2.3.2.1 Isolierung aus Saatgut	30
2.3.2.2 Isolierung aus Pflanzen	30
2.3.2.3 Weiterentwicklung der Isolierungsmethode aus Pflanzen	30
2.3.3 Einfluß fester Nährmedien bei der Isolierung von Endophyten aus Pflanzen	31
2.4 <i>In vitro</i>-Kultur von <i>Acremonium</i> und <i>Epichloë typhina</i>	31
2.4.1 Agarkultur und Vermehrung	31
2.4.2 Kultur und Vermehrung in Flüssignährmedien	32
2.5 Identifizierung von endophytischen Pilzen der Gattung <i>Acremonium</i>	32
2.5.1 Untersuchungen zur Sporulation von <i>Acremonium</i> und <i>Epichloë typhina</i>	33
2.6 Sammlung von <i>Acremonium</i>-Isolaten unterschiedlicher Herkünfte	34
2.7 Erhaltung von <i>Acremonium</i> unterschiedlicher Herkunft <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	34
2.7.1 Erhaltung und Lebensdauer <i>in vitro</i>	34
2.7.2 Erhaltung von <i>Acremonium in vivo</i>	35
2.8 Besiedlung der Wirtspflanze in Abhängigkeit von der Temperatur	35

2.9 Erste Untersuchungen zum Verhalten von A(+) und A(-)-Klonen von <i>L. perenne</i> bei verschiedenen Umweltbedingungen im Gewächshaus	36
2.9.1 Beobachtungen zur Trockenstress-Toleranz von A(+)-Gräsern	36
2.9.2 Untersuchungen zum Biomasseertrag und Alkaloidgehalt bei unterschiedlicher Stickstoffversorgung	37
2.9.2.1 Versuchspflanzen	37
2.9.2.2 Versuchsanordnung	37
2.9.2.3 Versuchsdurchführung	38
2.10 Herstellung von endophytfreien Gräsern für vergleichende Untersuchungen	38
2.10.1 Wärmebehandlung von A(+)-Gräsern	38
2.10.2 Fungizidbehandlung	39
2.11 Versuche zur Inokulation von <i>L. perenne</i> mit <i>Acremonium</i>	40
2.11.1 Inokulation durch Insertion von Myzel unter sterilen Bedingungen	40
2.11.1.1 Anzucht der Versuchspflanzen	40
2.11.1.2 Myzelvermehrung	40
2.11.1.3 Inokulation	40
2.11.2 Inokulation durch nicht sterile Injektion von Myzel bzw. Sporensuspension	41
2.11.2.1 Pflanzenvorbereitung	41
2.11.2.2 Inokulum	41
2.11.2.3 Injektion des Endophytenmaterials	41
2.11.3 Inokulation durch nicht sterile Insertion von Myzel in adulte Pflanzen	42
2.11.4 Inokulation durch Cokultivation	42
2.11.4.1 Auf festem Nährmedium	42
2.11.4.2 Auf semi-festem Nährmedium	43
2.11.4.3 In Flüssigmedium	44
2.11.4.4 Immobilisierung in Alginat	44
2.12 Proteinanalysen	44
2.12.1 Pilzmyzel	44
2.12.2 Extrakterstellung	45
2.12.3 Proteinreinigung und -konzentration	45
2.12.3.1 Quantifizierung der Proteinextrakte	45
2.12.3.2 Optimierung der Proteinextraktion	45
2.12.4 Elektrophorese	46
2.12.5 Proteinnachweis	48
2.12.5.1 Gesamtnachweis der Proteine	48
2.12.5.2 Isoenzymfärbungen	49
2.12.6 Dokumentation der Gele	50
2.13 Erste Untersuchungen zum Nachweis spezifischer Alkaloide in der <i>Lolium / Acremonium-</i> bzw. <i>Festuca / Acremonium-Symbiose</i>	51
2.13.1 A(+) und A(-)-Gräser für die Alkaloidextraktion	51
2.13.2 Extraktionsverfahren	51
2.13.3 Nachweis spezifischer Alkaloide mit der TLC	53
2.13.3.1 Isolierung von Alkaloiden aus der TLC-Matrix	54
2.14 Nachweis spezifischer Alkaloide mit der HPLC	54

3	ERGEBNISSE	56
3.1	Nachweis von <i>Acremonium</i> in Saatgut und Gräsern	56
3.1.1	Unspezifischer Nachweis von Gräserendophyten in der Karyopse und in Pflanzen	56
3.1.2	Unspezifischer Nachweis von vitalem <i>Acremonium</i> in Pflanzen	59
3.1.3	Unspezifischer Nachweis von vitalem <i>Acremonium</i> in der Karyopse	61
3.1.4	Vitalitätsnachweis durch Isolierung von <i>Acremonium</i> aus der Karyopse	61
3.2	Weiterentwicklung der Isolierungsmethode von <i>Acremonium</i> aus Pflanzen	63
3.3	Bestimmung von <i>Acremonium</i>	65
3.3.1	Morphologie <i>in vitro</i>	65
3.3.2	Sporulation von <i>Acremonium</i>	68
3.4	Sammlung von <i>Acremonium</i> unterschiedlicher Herkünfte und Gräserspezies	71
3.5	Kulturbedingungen von <i>Acremonium</i> auf festen Nährmedien	73
3.6	Besiedlung und Ausbreitung von <i>Acremonium</i> in Gräsern	74
3.7	Beobachtungen zur Biologie von A(+) und A(-)-Klonen im Gewächshaus	74
3.7.1	Einfluß von Trockenstress auf die <i>Acremonium</i> / Wirtsgas-Symbiose	74
3.7.2	Untersuchungen zum Biomasseertrag bei unterschiedlichen Stickstoffdüngungen	75
3.8	Herstellung von A(-)-Pflanzen für vergleichende Untersuchungen	76
3.8.1	Wärmebehandlung	76
3.8.2	Fungizidbehandlung	77
3.9	Versuche zur Inokulation von Gräsern mit <i>Acremonium</i>	77
3.9.1	Inokulation durch direktes Einbringen von <i>Acremonium</i> in die Pflanze	77
3.9.1.1	Insertion von Myzel	77
3.9.1.1.1	Myzelinsertion in Sämlinge <i>in vitro</i>	77
3.9.1.1.2	Myzelinsertion in Jungpflanzenklone <i>in vivo</i>	78
3.9.1.2	Injektion von Myzel- bzw. Sporensuspension	78
3.9.2	Inokulation durch Cokultivation	79
3.9.2.1	Auf festen Nährmedien	79
3.9.2.2	Auf semi-solid Agar	80
3.9.2.3	In flüssigen Nährmedien	80
3.9.2.4	Durch Alginateimmobilisierung	80
3.10	Bestimmung von <i>Acremonium</i> mit molekularbiologischen Methoden	82
3.10.1	Quantifizierung von Protein-Rohextrakten	82
3.10.2	Identifizierung von <i>Acremonium</i> durch Proteinanalysen	84
3.10.2.1	α -Esterasen (syn. Pektinesterasen)	86
3.10.2.2	Saure Phosphatase (ACP)	88
3.10.2.3	Cytochrom b ₅ -Reduktase (syn. NAD-Diaphorase) (DIA)	88
3.10.3	Untersuchung der Sekundärmetabolite der Gras/ <i>Acremonium</i> -Symbiose	92
3.10.3.1	Identifizierung spezifischer Alkaloide der Gras/ <i>Acremonium</i> -Symbiose mit Hilfe der TLC	92
3.10.4	Einfluß der Stickstoffdüngung auf den Gehalt an Lolitrem B in der Trockensubstanz von <i>L. perenne</i> A(+) und A(-)-Pflanzen unter Gewächshausbedingungen	97
3.11	Untersuchung von <i>L. perenne</i> Freilandproben auf das Vorhandensein des Nerotoxins Lolitrem B	99

4 DISKUSSION	101
4.1 Nachweis und Biologie von <i>Acremonium</i>	101
4.2 Bestimmung von <i>Acremonium in vitro</i>	105
4.2.1 <i>In vitro</i> Morphologie zur Artunterscheidung von <i>Acremonium</i>	106
4.2.2 Sporulation als Artbestimmungsmerkmal	107
4.3 Beobachtungen zu Auswirkungen von <i>Acremonium</i> auf das Wirtsgras	108
4.4 Herstellung von <i>Acremonium</i>-freien Pflanzen	111
4.5 Inokulationsversuche	112
4.6 Molekularbiologische Untersuchungen von <i>Acremonium</i>	114
4.7 Alkaloid-Nachweis mit TLC und HPLC	119
4.7.1 Freilandproben	122
5 ZUSAMMENFASSUNG	124
6 AUSBLICK	127
7 LITERATURVERZEICHNIS	129
8 ANHANG	146