

# Einfluss des Endophyten *Neotyphodium lolii* auf den Samenertrag von *Lolium-perenne*-Genotypen

U. HESSE<sup>1</sup>, K. FÖRSTER<sup>1</sup>, W. SCHÖBERLEIN<sup>2</sup> und W. DIEPENBROCK<sup>1</sup>

## Einleitung

Endophytbesiedelte *Lolium perenne*- und *Festuca*-Ökotypen sind auf natürlichen Graslandstandorten Europas häufig zu finden (EGGESTEIN 1997, LEWIS et al. 1997, OLDENBURG 1997, OLIVEIRA et al. 1997, SAIKKONEN 2000). Endophytische Pilze der Gattung *Neotyphodium* leben mit ihren Wirtsgäsern in einer mutualistischen Symbiose (SIEGEL et al. 1987). Von außen unsichtbar, wachsen sie aus einer endophytbesiedelten Karyopse interzellulär in die Sproßteile der Pflanze bis in die Fruchtstände und wiederum in die Karyopsen. Die Pilze werden von der Pflanze mit Nährstoffen versorgt und vermögen ihrerseits die biotische und abiotische Streßtoleranz des Wirtes positiv zu beeinflussen (READ and CAMP 1986, SCHÖBERLEIN und PFANNMÖLLER 1996). Untersuchungen zeigten, daß die Endophytpräsenz u.a. die Ausdauer, die vegetative und generative Entwicklung sowie die Nachwuchsfähigkeit der Gräser verbessern kann (BOUTON et al. 1993, BUCK et al. 1994, WEST et al. 1994, RAVEL et al. 1995, EGGESTEIN 1997). Insofern ist eine erhöhte Konkurrenzfähigkeit endophytbesiedelter Pflanzen besonders unter ungünstigen Wachstumsbedingungen zu erwarten. Dem entsprechen die Befunde von LEWIS et al. (1997), welche in trockenen Gebieten Frankreichs ein signifikant häufigeres Vorkommen vorfanden als in Gebieten mit höheren Niederschlägen. Erhebungen in Tschechien und Deutschland (Sachsen-Anhalt) haben ergeben, daß der Anteil endophytbesiedelter Pflanzen auf trockenen Standorten höher als auf feuchten ist (CAGAŠ 2000, HESSE et al. 1999). Weiterhin zeigte sich, daß die Endophyteneffekte vom Wirtspflanzen- und Pilzgenotyp sowie von den Umweltbedingungen abhängig sind und nicht immer zu einem verbesserten Pflanzenwuchs führen

müssen. Die bisherigen Untersuchungen zu Endophyteneffekten im Freiland wurden in der Regel mit Sorten, also einem Genotypengemisch, durchgeführt. Unser Ziel war es, den Einfluß des Endophyten auf die Ertragsbildung an definierten *Lolium perenne*-Genotypen zu prüfen.

## Material und Methoden

Im Feldversuch wurden neun *Lolium perenne*-Genotypen getestet, die von trockenen Standorten (alte Weiden, Weinberge) Sachsen-Anhalts stammten und *Neotyphodium lolii* enthielten. Um von den endophytbesiedelten (EB) Pflanzen endophytfreie (EF) Klone zu erhalten, wurden einige Sprosse in Hydrokultur mit einer 0,4 %igen Propiconazolösung (DESMEL®) angezogen. Nach einer einjährigen Erholungs- und Nachwuchsphase der Pflanzen erfolgte am 26. April 1999 die Anlage des Feldversuches auf dem Versuchsfeld der Landwirtschaftlichen Fakultät in Halle. Dieser Standort ist im Oberboden durch eine Sandlößschicht (lehmgiger Sand) und im Unterboden durch Geschiebemergel charakterisiert. Die langjährigen Jahresmittel für Temperatur und Niederschlag (1965-1994) betragen 10,5 °C bzw. 475,4 mm. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß das Frühjahr und der Sommer des Versuchsjahres 1999 regenreich waren, während in den Spätsommer- und Herbstmonaten eine trockene Witterung vorherrschte.

Die Versuchsanlage erfolgte in Parzellen mit 30 Pflanzen pro Genotyp, d.h.

15 Klonen pro Endophytstatus. Zum Pflanztermin und nach der Samenernte erfolgte eine Stickstoffdüngung in Höhe von jeweils 70 kg N/ha bzw. 40 kg N/ha. Die Ernte der generativen Triebe der Einzelpflanzen fand zum Stadium der späten Teigreife der Spelzfrüchte statt. Pro Pflanze erfolgte die Erfassung der Anzahl der generativen Triebe und der ertragswirksamen Fruchtstände, des Samenertrages sowie der Pflanzentrockenmasse. Pro Genotyp und Endophytstatus wurden von den geernteten Spelzfrüchten die Tausendkorntmasse (TKM) und die Keimfähigkeit der Samen (ISTA-Vorschriften 1993) ermittelt. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung von jeweils 10 Karyopsen pro Pflanze (150 Karyopsen/Variante) auf Endophytpräsenz. Nach einer 1,5monatigen Nachwuchsphase wurden die Pflanzen am 18. Oktober 1999 auf jeweils 5 cm zurückgeschnitten und der Trockenmasseertrag ermittelt.

Zur biostatistischen Prüfung der Unterschiede zwischen den Endophytvarianten erfolgte getrennt für jeden Genotyp eine Varianzanalyse. Der Endophyteneffekt ( $E^e$ ), nach der Formel  $E^e = (EB - EF) \times 100 / EF$  berechnet, beinhaltet die Differenz zwischen der Produktivität von EB- und EF-Pflanzen.

## Ergebnisse

Die für die Untersuchungen ausgewählten Genotypen stammten aus einer Sammlung aus Trockengebieten. Aufgrund der günstigen Witterungsbedingungen im Frühjahr und Sommer 1999

**Tabelle 1: Monatliche Durchschnittswerte für Temperatur (T) und Niederschläge (Nd) im Jahr 1999 im Vergleich zum langjährigen Mittel ( $\bar{x}$  1965-1994)**

		Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	Aug.	Sept.	Okt.	Nov.	Dez.
T (°C)	1999	3,5	1,1	5,9	9,9	14,5	16,2	20,2	18,2	18,1	9,7	3,9	3,2
	$\bar{x}$	0,3	0,5	4,5	8,1	13,2	16,3	18,3	18,1	14,3	9,7	4,5	1,8
Nd (mm)	1999	16,0	51,4	27,7	61,2	54,2	64,1	89,8	41,0	23,0	17,9	38,2	37,6
	$\bar{x}$	25,8	22,3	32,3	38,8	50,0	59,8	51,7	53,8	40,4	33,1	32,6	34,7

**Autoren:** <sup>1</sup> Dipl.-Ing. Uljana HESSE, Dr. Karin FÖRSTER und W. DIEPENBROCK, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, D-06108 HALLE, <sup>2</sup> W. SCHÖBERLEIN, Heiterblickstraße 20, D-04347 LEIPZIG



hatten sich die Pflanzen bis zur Samen-  
ernte gut entwickelt.

Die Ergebnisse der Samenernte sind in  
der *Tabelle 2* dargestellt.

Die endophytbesiedelten Pflanzen der  
fünf Genotypen A-E hatten höhere Samen-  
und Trockenmasseerträge als ihre  
endophytfreien Pendanten. Vier dieser Ge-

notypen entwickelten auch eine höhere  
Anzahl generativer Triebe. Das Gegenteil  
traf für die Genotypen H und I zu.

Die Pflanzen der Genotypen F und G  
zeigten keine signifikanten endophytbe-  
dingten Wachstumsunterschiede. Der  
geringe Samenertrag bei den Pflanzen  
des Genotypes G ist möglicherweise auf

eine Braunrostinfektion während der  
Blüte zurückzuführen.

Für die Parameter Anzahl der generati-  
ven Triebe und Samenertrag wurde eine  
negative Beziehung zwischen dem Endo-  
phyteffekt und der Produktivität der  
endophytfreien Pflanzen festgestellt (sie-  
he *Abbildung 1* und *2*).

Während bei den Genotypen mit den ge-  
ringsten Erträgen (A, B und C) ein si-  
gnifikant positiver Endophyteffekt auf-  
trat, verringerte er sich mit steigender  
Produktivität der endophytfreien Pflan-  
zen und war bei den Genotypen H und I  
signifikant negativ.

Zur Untersuchung der Samenqualität  
wurden die Beschaffenheit und der Endo-  
phytstatus des Erntegutes ermittelt.  
Die Ergebnisse zeigt *Tabelle 3*.

Endophytpresenz erhöhte die Tausend-  
kornmasse bei den Genotypen D und E,  
während bei den Genotypen F und I kein  
Einfluß auf dieses Merkmal festzustel-  
len war. Die anderen Genotypen zeigten  
dagegen eine signifikant höhere TKM  
bei den EF-Varianten. Unabhängig da-  
von war die Keimfähigkeit der EB-Spelz-  
früchte gleich bzw. bei den Genotypen  
A, E und F signifikant erhöht.

Die mikroskopische Untersuchung der  
Karyopsen ergab, daß das endophytische  
Myzel in nahezu allen vorhanden war.  
Bei den EB-Varianten von sechs Geno-  
typen enthielten alle Samen und bei den  
Genotypen E und F jeweils 97 % bzw.  
93 % der Karyopsen *Neotyphodium lo-  
lii*. Selbst die Karyopsen der durch Rost  
stark befallenen Pflanzen des Genotypes  
G waren vollständig endophytbesiedelt.  
Dagegen waren alle untersuchten Karyo-  
psen der EF-Pflanzen endophytfrei.

Zur Erfassung der Nachwuchsfähigkeit  
erfolgte Ende Oktober ein Grünschnitt.  
Die meisten Genotypen vertrugen die  
Trockenheit während des Spätsommers  
schlecht, so daß große Unterschiede im  
Wachstum und damit auch in den Trok-  
kenmasseerträgen auftraten (siehe *Tabel-  
le 4*). Sie variierten zwischen 2,92 (Geno-  
typ G:EB) und 39,57 g/Pflanze (Geno-  
typ A:EB). Die EF-Pflanzen hatten da-  
bei in fast allen Genotypen die höheren  
Erträge. Bei den Genotypen C, E, G und  
I waren die Differenzen signifikant. Eine  
Ausnahme bildeten die Genotypen A und  
B, bei denen die EB-Varianten den EF-  
Varianten im Trockenmasseertrag um

**Tabelle 2: Ergebnisse der Samenernte von 1999 *Lolium perenne*-Genotypen, jeweils mit (EB) und ohne (EF) den Endophyten *Neotyphodium lolii***

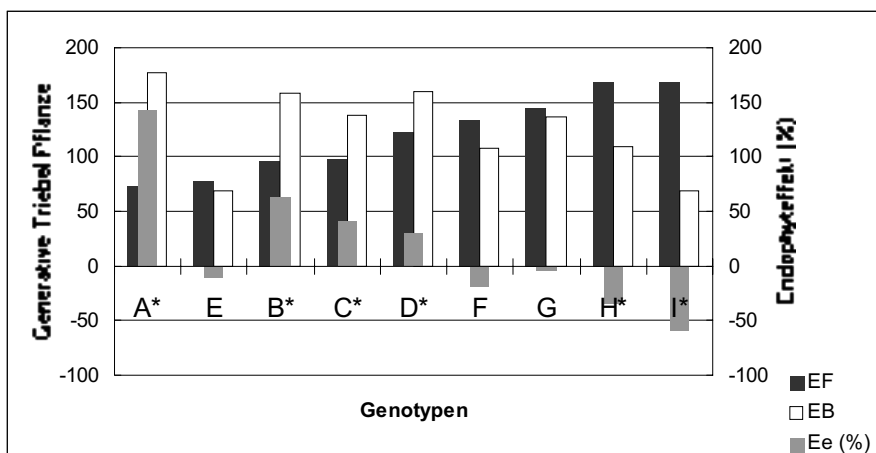
Genotypen	Generative Triebe pro Pflanze		Reife Fruchstände pro Pflanze		Samenertrag (g/Pflanze)		Trockenmasse (g/Pflanze)	
	EB	EF	EB	EF	EB	EF	EB	EF
A	176,93	73,13	130,00	52,00	9,43	6,25	88,77	61,96
B	157,67	96,47	88,33	57,13	10,28	6,92	64,19	39,20
C	138,53	98,00	66,53	41,33	4,06	1,87	36,11	25,41
D	159,53	122,60	75,13	57,80	8,54	6,32	60,32	47,58
E	69,40	77,53	34,47	39,67	5,52	4,37	37,90	31,53
F	107,50	134,00	63,50	72,93	8,83	9,86	45,53	63,76
G	137,00	144,93	34,07	33,57	0,51	0,62	64,69	59,68
H	108,93	167,73	74,87	116,07	8,11	12,93	41,44	70,82
I	69,07	168,93	35,07	94,53	3,94	13,72	21,07	57,30

■ EB signifikant besser    ▒ EF signifikant besser    □ Keine signifikanten Unterschiede

**Tabelle 3: Qualität der Spelzfrüchte von *Lolium perenne*-Genotypen, jeweils mit (EB) und ohne (EF) *Neotyphodium lolii* (Erntejahr 1999)**

Genotypen	Tausendkornmasse (g)		Keimfähigkeit (%)		EB-Karyopsen (%)	
	EB	EF	EB	EF	EB	EF
A	1,57	1,67	85,0	76,0	100	0
B	1,43	1,50	97,3	96,5	100	0
C	1,47	1,71	89,8	93,0	100	0
D	1,30	1,20	89,3	92,3	100	0
E	1,61	1,42	96,3	86,8	97	0
F	1,66	1,61	96,0	87,3	93	0
G	1,05	1,16	65,0	64,5	100	0
H	1,44	1,51	93,3	90,5	100	0
I	1,52	1,46	95,3	96,0	79	0

■ EB signifikant besser    ▒ EF signifikant besser    □ Keine signifikanten Unterschiede



**Abbildung 1: Anzahl der generativen Triebe und Endophyteffekt (Ee) von endophytbesiedelten (EB) und endophytfreien (EF) *Lolium perenne*-Pflanzen, sortiert nach der Produktivität der EF-Klone. (\* signifikanter Endophyteffekt)**

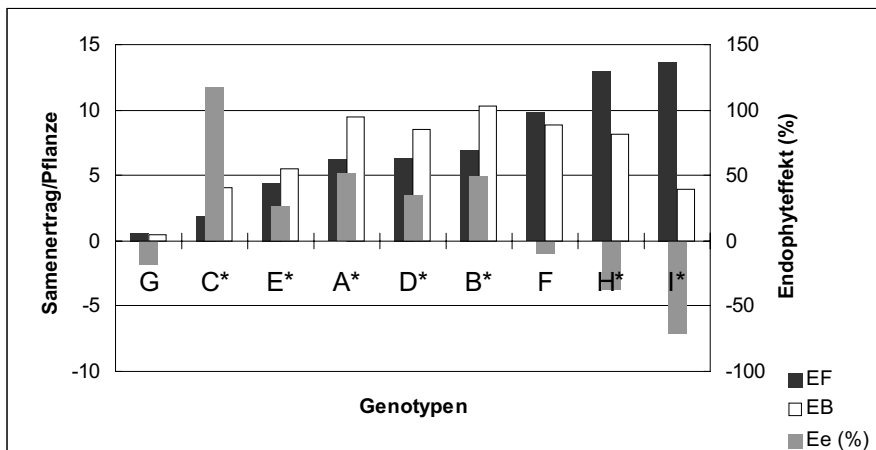


Abbildung 2: Samenertrag und Endophyteneffekt (Ee) von endophytbesiedelten (EB) und endophytfreien (EF) *Lolium perenne*-Pflanzen, sortiert nach der Produktivität der EF-Klone (\* signifikanter Endophyteneffekt)

Tabelle 4: Ergebnisse des Nachwuchses 1999 nach der Samenernte von *Lolium perenne* Genotypen, jeweils mit (EB) und ohne (EF) Endophytbesiedlung

Genotypen	Trockenmasse (g/Pflanze)		Generative Triebe / Pflanze	
	EB	EF	EB	EF
A	39,57	22,82	0,67	0,60
B	23,14	14,18	0,60	0,60
C	5,80	9,93	5,50	1,07
D	10,80	16,28	10,60	4,36
E	6,67	10,45	0,13	0,47
F	4,93	5,74	1,00	1,09
G	2,92	6,00	5,36	3,40
H	8,17	9,59	1,92	3,31
I	10,68	16,61	2,67	1,27

■ EB signifikant besser    □ EF signifikant besser    □ Keine signifikanten Unterschiede

16,75 bzw. 8,96 g/Pflanze signifikant überlegen waren.

Während des Nachwuchses bildeten die Pflanzen eine geringe Anzahl von Nachschössern. Signifikante Unterschiede konnten in den Genotypen C, D und I festgestellt werden, wobei die Endophytenpräsenz die Anzahl deutlich erhöhte.

## Diskussion

Der Einfluß von *Neotyphodium*-Endophyten auf den Samenertrag ihrer Wirtsgräser wurde bisher an Genotypen mit und ohne Endophyten kaum untersucht. Feldversuche mit Wiesenschwingelsorten zeigten, daß die endophythaligen Varianten einer Sorte höhere Samenerträge bringen können als die endophytfreien (EGGESTEIN 1997), doch variierten die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Sorte, vom Standort und Versuchsjahr. In Gewächshausversuchen mit mehreren *Lolium perenne*-Klonen, jeweils mit und ohne endophytische Pilze, wurden je

nach Wirtsgenotyp unterschiedliche Effekte auf das Pflanzenwachstum sowie die abiotische Streßtoleranz der Pflanze festgestellt. So beobachtete CHEPLICK (1998) einen genotypspezifischen Endophyteneffekt auf die Nachwuchsfähigkeit der Pflanzen nach einem Grünschnitt. LEWIS (2000) berichtete, das sich in einem Trockenstreßversuch mit 21 *Lolium perenne*-Genotypen die Endophytenpräsenz nur zwei mal positiv auf die Überlebensfähigkeit auswirkte.

Unter Berücksichtigung dieser Befunde war in dem hier vorgestellten Versuch mit verschiedenen Genotypen nicht zu erwarten, daß bei allen gleichgerichtete Symbioseeffekte bezüglich der geprüften Merkmale auftreten. Die Ergebnisse erhärten vielmehr die Hypothese, das in Abhängigkeit vom Pflanzengenotyp sowohl positive als auch negative Endophyteneffekte in Erscheinung treten können. Die nachgewiesenen Unterschiede deuten auf die Existenz einer spezifi-

schon Kompatibilität zwischen dem jeweiligen Pilz- und Wirtsgenotyp hin. Weitere Arbeiten zur Klärung von Endophyteneffekten sollten deshalb mit definierten Gräser- und Pilzgenotypen durchgeführt werden.

Da die Endophytenpräsenz die Ausprägung von Ertragsmerkmalen signifikant beeinflussen kann, sollten für die Züchtung vorgesehene Grasgenotypen grundsätzlich auf ihren Endophytenstatus geprüft werden.

## Danksagung

Die Autoren danken Fr. Habelt, Fr. Helfinger, Fr. Ott, Fr. Kozłowski, sowie Fr. und Hr. Richter und Hr. Elgalli für ihre Mithilfe während der Materialsammlung und Aufbereitung der Proben.

## Literatur

- BOUTON, J.H., R.N. GATES, D.P. BELESKY and M. OWSLEY, 1993: Yield and persistence of tall fescue in the southeastern coastal plain after removal of its endophyte. *Agron. J.* 85, 52-55.
- BUCK, G.W., H.W. ELBERSEN, P. WEST and D.A. SLEPER, 1994: Endophyte enhances drought survival of moroccan fescue. *Arkansas Farm Res.* 43, 6-7.
- CAGAŠ, B., 2000: The endophytes *Neotyphodium* spp., their incidence in the Czech Republic, problems, questions, work with E+ plants. Arbeitstagung COST 828, 6.-7. April in Halle.
- CHEPLICK, G.P., 2000: Genotypic variation of the regrowth of *Lolium perenne* following clipping: effects of nutrients and endophytic fungi. *Functional Ecology* 12, 176-184.
- EGGESTEIN, S., 1997: Untersuchungen z. Vorkommen von Endophyten der Gattung *Acremonium* in *Festuca*-Arten Europas sow. zu Symbioseeffekten bei *Festuca pratensis*. Diss. Halle, 115 S.
- HESSE, U., W. SCHÖBERLEIN, K. FÖRSTER, 1999: Sammlungsmaterial von *Lolium perenne* und *Festuca*-Arten zur Erstellung von endophythaligen und -freien Pflanzen des gleichen Genotypes. 41. Fachtagung des DLG-Ausschusses „Gräser, Klee und Zwischenfrüchte“ am 30.11.1999 in Fulda, 89-93.
- LEWIS, G.C., C. Ravel, W. NAFFAA, C. ASTIER and G. CHARMET, 1997: Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* spp. in European countries and a relationship between the level of infection and climate in France. *Annals of Applied Biology* 130, 227-238.
- LEWIS, G.C., 2000: Effects of endophytes on stress tolerance in glasshouse studies. Arbeitstagung COST 828, 6.-7. April in Halle, Deutschland.
- OLDENBURG, E. 1997: Endophytic fungi and alkaloid production in perennial ryegrass in Germany. *Grass and Forage Science* 52,425-431.
- OLIVEIRA, J.A., G.E. ROTTINGHAUS, J. COLLAR and P. CASTRO, 1997: Perennial ryegrass endophyte in Galicia, Northwest Spain. *Journal of Agricultural Science* 129, 73-177.

- READ, J.C. and B. J. CAMP 1986: The effect of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in tall fescue on animal performance, toxicity, and stand maintenance. *Agron. J.* 78, 848-850.
- RAVEL, C., G. CHARMET and F. BALFOURIER, 1995: Influence of the fungal endophyte *Acremonium lolii* on agronomic traits of perennial ryegrass in France. *Grass and Forage Sci.* 50, 75-80.
- SAIKKONEN, K., J. AHLHOLM, M. HELANDER, S. LEHTIMAKI, O. NIEMELAINEN, 2000: Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. *Ecography* 23, 360-366.
- SCHÖBERLEIN, W. und M. PFANNMÖLLER, 1996: Endophytische Pilze in mehrjährigen Nutzgräsern - Probleme oder Vorteile. In: Bericht über die 47. Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter vom 26.-28. 11. 1996 in Gumpenstein, 185-191.
- SIEGEL, M.R., G.C.M. LATCH and M.C. JOHNSON, 1987: Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25, 293-315.
- WEST, C.P., E. IZEKOR, A. ELMI, R.T. ROBBINS and K.E. TURNER, 1989: Endophyte effects on drought tolerance, nematode infestation and persistence of tall fescue. *Proceedings of the 1989 Arkansas Fescue Toxicosis Conference*, C. P. West (Ed.). USA, Arkansas, Fayetteville, 140.