

**Verbreitung und funktionelle Charakterisierung endophytischer
Pilze in *Phragmites australis* am Bodensee**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Universität Konstanz
Fachbereich Biologie

vorgelegt von

Michael Ernst

Konstanz, im November 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Mai 2006

Referent: Professor Dr. Kurt W. Mendgen

Referentin: Privatdozentin Dr. Christine Struck

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Mendgen danke ich für die Vergabe des interessanten Themas, die guten Arbeitsbedingungen und die Anfertigung von Fluoreszenzmikrofotografien.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Stefan Wirsal, jetzt Martin-Luther-Universität Halle, für die sehr gute Betreuung, für die jederzeit bestehende Diskussionsbereitschaft bei der Erstellung dieser Arbeit sowie für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Privatdozent Dr. Adrian Leuchtmann, Geobotanisches Institut der ETH Zürich, danke ich für Hilfe bei der Bestimmung der *Stagonospora*-Isolate. Frau Privatdozentin Dr. Bettina Tudzynski, Institut für Botanik der Westfälischen Wilhelmsuniversität in Münster, danke ich für die Durchführung der Gibberellinmessungen. Herrn Dr. Willi Nagl, Universität Konstanz, danke ich für Hilfe und Beratung bei der statistischen Auswertung. Frau Christine Giele, AG Mendgen, danke ich für die Anfertigung der Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie und die Durchführung mikroskopischer Arbeiten. Frau Dr. Ulrike Damm, jetzt Universität Stellenbosch, Südafrika, danke ich für Hilfe bei der Bestimmung von Pilzen und für die Anfertigung von Mikrofotografien von Sporen.

Den Mitgliedern der AG Mendgen – insbesondere Dr. Ralf Vögele, Karin Neubert, Uta Hempel, Heinz Vahlenkamp und Dr. Christiane Runge-Froböse – danke ich für die sehr freundliche, familiäre Atmosphäre, Tips und Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. Ralf Vögele danke ich zusätzlich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Ferner möchte ich auch den am Projekt beteiligten HiWi's und Vertiefungskursstudenten für ihre Mitarbeit danken.

Frau Privatdozentin Dr. Christine Struck, Universität Rostock, danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung der Arbeit im Rahmen des Teilprojektes B4 „Endophytische Pilze beim Schilf“ aus dem Sonderforschungsbereich 454 „Bodenseelitoral“.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung, ohne die dieses Studium nicht möglich gewesen wäre.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind oder werden veröffentlicht:

Stefan G. R. Wirsel, Wolfgang Leibinger, Michael Ernst & Kurt Mendgen (2001): Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytologist* **149** (3), 589-598.

Michael Ernst, Kurt W. Mendgen & Stefan G. R. Wirsel (2003): Endophytic fungal mutualists: Seed-borne *Stagonospora* spp. enhance biomass production in axenic microcosms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16** (7), 580-587.

Michael Ernst, Karin Neubert, Kurt W. Mendgen & Stefan G. R. Wirsel: *Microdochium* spp. colonising common reed exhibit differences in habitat preference, growth temperature optimum and substrate utilization pattern. Manuskript in Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung in das Ökosystem Schilf.....	1
1.1.1 Systematik, Morphologie, Standorte.....	1
1.1.2 Verbreitungsmechanismen	2
1.1.3 Ökologische und wirtschaftliche Bedeutung.....	2
1.2 Umweltsituation am Bodensee.....	3
1.3 Endophytische Pilze	4
1.3.1 Interaktionen zwischen Pilzen und Pflanzen.....	4
1.3.2 Ursprung des Begriffes „Endophyt“, Geschichtliches	4
1.3.3 Definitionen für Endophyten.....	5
1.3.4 Verbreitung endophytischer Pilze	6
1.3.5 Einfluss von Endophyten auf den Wirt	6
1.3.6 Wirkungsmechanismen	8
1.4 Bisherige Kenntnisse über schilfassozierte Pilze	10
1.5 Ziele der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Herkunft des pflanzlichen und pilzlichen Materials	13
2.1.1 Probenahme	13
2.1.2 Herkunft des Saatgutes für Mikrokosmos-Experimente	14
2.1.3 Pilzliches Material.....	15
2.1.4 Hinterlegung von Pilzisolaten bei Stammsammlungen	17
2.2 Isolierung und Kultivierung von Pilzen	17
2.2.1 Medien.....	17
2.2.2 Isolierung aus Samen	18
2.2.3 Dauerkulturen.....	19
2.3 Charakterisierung von Pilzisolaten.....	19
2.3.1 Wuchsgeschwindigkeit und Temperaturoptimum	19
2.3.2 Sporulationstests.....	19
2.3.3 Konkurrenztests	19
2.4 DNA-Präparationen.....	21
2.4.1 DNA-Präparation aus Pilzen	21
2.4.2 DNA-Präparation aus adulten Pflanzen	22
2.4.3 DNA-Präparation aus jungen Keimlingen	22
2.4.4 DNA-Präparation aus Schilfsamen-Pools	23
2.4.5 DNA-Präparation aus einzelnen Schilfsamen	23
2.5 PCR	23
2.5.1 Primer	24
2.5.1.1 Zielbereich der PCR	24
2.5.1.2 Ableitung spezifischer Primersequenzen	25
2.5.1.3 Primersequenzen	26
2.5.2 Nested PCR	26
2.5.3 Nachweisgrenzenbestimmung.....	27

2.5.4 Reaktionsansätze	27
2.5.5 PCR-Programme	28
2.5.6 PCR-Geräte	29
2.5.7 Auswertung der PCR aus Umweltproben	30
2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese	30
2.7 DNA-Sequenzierung	30
2.7.1 Reinigung und Quantifizierung von PCR-Produkten.....	30
2.7.2 Sequenzierungsreaktion	31
2.7.3 Sequenzanalyse	32
2.7.4 Molekulare Phylogenie	32
2.7.5 Überprüfung von nested PCR-Ergebnissen	32
2.7.6 Einreichung von Sequenzen in Datenbanken.....	32
2.8 Pflanzenanzucht, Mikro- und Makrokosmen	33
2.8.1 Erzeugung steriler Keimlinge.....	33
2.8.2 Inkubationsbedingungen für die Keimlingsanzucht.....	33
2.8.3 Überprüfung der Sterilität	34
2.8.4 Mikrokosmen	34
2.8.4.1 Substrat.....	34
2.8.4.2 Sterilisation, Behälter	34
2.8.4.3 Pikieren.....	34
2.8.4.4 Inokulation	35
2.8.4.5 Inkubation.....	35
2.8.4.6 Auswertung der axenischen Mikrokosmen	35
2.8.5 Makrokosmen.....	36
2.8.5.1 Anzucht	36
2.8.5.2 Dämpfung des Substrates	36
2.8.5.3 Freilandanlage	36
2.8.6 Detektion von <i>Stagonospora</i> in Keimlingen mit natürlicher Pilzbefruchtung.....	37
2.9 Immunolokalisation von <i>Stagonospora</i>	38
2.9.1 Herstellung von Antikörpern gegen <i>Stagonospora</i>	38
2.9.2 Immunofluoreszenz-Mikroskopie	39
2.10 Nachweis von <i>in vitro</i> gebildeten Gibberellinen.....	40
2.10.1 Anzucht und Ernte von <i>Stagonospora</i>	40
2.10.2 Extraktion von Gibberellinen aus Kulturüberständen.....	40
2.10.3 Nachweisverfahren für Gibberelline	40
2.11 Statistische Verfahren	41
2.11.1 PCR-Testreihen	41
2.11.2 Mikrokosmen	41
2.11.3 Wuchsgeschwindigkeit und Temperaturoptimum	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Isolierung und Charakterisierung von samenbürtigen Pilzen	42
3.1.1 Isolierung samenbürtiger Pilze.....	42
3.1.2 Bestimmung der Isolate durch Sequenzierung und Mikroskopie	43
3.1.2.1 BLAST-Suche mit ITS-Sequenzen	43
3.1.2.2 Molekulare Phylogenie der <i>Stagonospora</i> -Isolate	44

3.1.2.3 Morphologische Bestimmung	46
3.2 PCR-Nachweis ausgewählter Pilzarten in Schilf	47
3.2.1 PCR-Nachweis von <i>Stagonospora</i> sp. 4/99-1	47
3.2.1.1 Spezifitätstests für <i>Stagonospora</i> -Primer	47
3.2.1.2 Nachweisgrenze der nested PCR	48
3.2.1.3 PCR-Nachweis von <i>Stagonospora</i> in Freiland-Proben	48
3.2.1.3.1 Vorkommen von <i>Stagonospora</i> an den verschiedenen Bodensee- Standorten und Verteilungsmuster in der Pflanze	49
3.2.1.3.2 Saisonaler Verlauf der Besiedlung	51
3.2.1.3.3 Untersuchung einzelner Samen	52
3.2.1.4 Nachweis von <i>Stagonospora</i> in Keimlingen mit natürlicher Pilzbefruchtung	54
3.2.2 PCR-Nachweise von <i>Microdochium</i> spp.	56
3.2.2.1 Spezifitätstests für <i>Microdochium</i> -Primer	58
3.2.2.2 PCR-Nachweis von <i>Microdochium</i> spp. in Freiland-Proben	59
3.2.2.2.1 Vorkommen an den verschiedenen Bodensee-Standorten und Verteilungsmuster in der Pflanze	59
3.2.2.2.2 Vorkommen von <i>Microdochium</i> spp. im saisonalen Verlauf	61
3.2.2.2.3 Habitatpräferenz	64
3.2.2.2.4 Gemeinsames Vorkommen beider <i>Microdochium</i> -Arten	66
3.2.2.2.5 Gemeinsames Auftreten der Gattungen <i>Stagonospora</i> und <i>Microdochium</i>	67
3.2.3 PCR-Nachweis von <i>Trichoderma</i>	68
3.3 Mikro- und Makrokosmen	70
3.3.1 Etablierung axenischer Mikrokosmen	70
3.3.2 Mikrokosmosexperimente	72
3.3.2.1 Einfluss von <i>Stagonospora</i> spp.	72
3.3.2.2 Einfluss von <i>Microdochium bolleyi</i> und <i>Trichoderma</i> sp.	76
3.3.3 Makrokosmosexperimente	78
3.4 <i>Stagonospora</i> -Hormontests an Reis	81
3.5 Immunolokalisation von <i>Stagonospora</i>	82
3.6 Wuchsverhalten von Endophyten <i>in vitro</i>	84
3.6.1 Temperaturoptimum	84
3.6.1.1 Vergleich der Gattungen	84
3.6.1.2 Vergleich verschiedener <i>Microdochium</i> -Isolate	86
3.6.2 Konkurrenztests <i>in vitro</i>	89
4. Diskussion	97
4.1 Isolierung und Charakterisierung von <i>Stagonospora</i> spp. als Endophyten im Schilf....	97
4.1.1 <i>Stagonospora</i> spp. als samenbürtige Endophyten	97
4.1.2 Besiedelte Pflanzenteile und Besiedlungsmuster	99
4.1.3 Lebenszyklus von <i>Stagonospora</i> im Schilf	103
4.1.4 Vertreter der Gattungen <i>Microdochium</i> und <i>Trichoderma</i> als Endophyten	106
4.2 Vorkommen von Endophyten in natürlichen Habitaten	107
4.2.1 Vergleich von klassischen und molekularen Nachweismethoden	107
4.2.2 Bevorzugung bestimmter Habitats durch Endophyten	109
4.3 Einfluss von Endophyten auf die Pflanze	113
4.3.1 Eigenschaften von Mikrokosmen	113

4.3.2 Wuchseffekte durch symbiontische Pilze	113
4.3.3 Mögliche Ursachen der durch Endophyten ausgelösten Wuchseffekte	115
4.4 Gegenseitige Beeinflussung endophytischer Pilze	117
4.4.1 Gemeinsames Auftreten verschiedener Arten	117
4.4.2 Konkurrenz	118
4.5 Ausblick	121
5. Zusammenfassung	124
6. Anhang	125
6.1 Herkunft der Chemikalien	125
6.2 Abkürzungen	125
7. Literatur	127

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie der Schilfpflanze.	1
Abbildung 2: Lage der Probenahmestandorte im Bodensee.	13
Abbildung 3: Inokulationsschema für die Konkurrenztests.	20
Abbildung 4: Primer-Karte.	24
Abbildung 5: Aufbereitung der Keimlinge mit natürlicher Pilzbefruchtung.	37
Abbildung 6: Molekulare Phylogenie von <i>Stagonospora</i> - und <i>Phaeosphaeria</i> -Arten.	45
Abbildung 7: Sporen der <i>Stagonospora</i> -Isolate.	46
Abbildung 8: Spezifitätstest für die Primer für <i>Stagonospora</i> 4/99-1.	47
Abbildung 9: Sensitivitätstest.	48
Abbildung 10: Saisonale Sukzession von <i>Stagonospora</i> 4/99-1.	51
Abbildung 11: Einwuchs von <i>Stagonospora</i> 4/99-1 in Keimlinge ohne Inokulation.	55
Abbildung 12: Molekulare Phylogenie von <i>Microdochium</i> spp.	57
Abbildung 13: Spezifitätstests für die Primer für <i>Microdochium</i> spp.	58
Abbildung 14: Saisonale Sukzession von <i>Microdochium</i> spp.	63
Abbildung 15: Saisonale Sukzession von <i>Microdochium</i> spp. im Vergleich mit <i>Stagonospora</i> sp. 4/99-1.	64
Abbildung 16: Habitatspräferenz von <i>Microdochium</i> spp.	65
Abbildung 17: Gemeinsames Vorkommen der <i>Microdochium</i> -Arten.	66
Abbildung 18: PCR-Nachweis von <i>Trichoderma</i> sp. A11.	69
Abbildung 19: Nachweis der Sterilität von Schilfkeimlingen.	71
Abbildung 20: Reisolierung von <i>Stagonospora</i> -Arten aus Schilf-Mikrokosmen.	73
Abbildung 21: Wirkung von <i>Stagonospora</i> spp. auf Schilf in axenischen Mikrokosmen.	74
Abbildung 22: Wachstumsparameter von Schilfpflanzen in axenischen Mikrokosmen.	75
Abbildung 23: Reisolierung von <i>Microdochium</i> und <i>Trichoderma</i> aus Schilf-Mikrokosmen.	76
Abbildung 24: Wachstumsparameter von Schilfpflanzen in axenischen Mikrokosmen mit <i>Microdochium</i> und <i>Trichoderma</i>	77
Abbildung 25: Schilfpflanzen für den Makrokosmos vier Monate nach der Inokulation, einen Monat vor der Ausbringung ins Freiland.	78
Abbildung 26: Freilandversuch am Ende der ersten Vegetationsperiode, Oktober 2002.	79
Abbildung 27: Freilandversuch am Ende der zweiten Vegetationsperiode, Oktober 2003.	81
Abbildung 28: Hormontest von <i>Stagonospora</i> -Flüssigkulturextrakten an Reiskeimlingen.	82
Abbildung 29: Immunofluoreszenzmikroskopie mit einem primären Antikörper gegen <i>Stagonospora</i> 4/99-1.	83
Abbildung 30: Temperaturoptimum verschiedener Pilzgattungen.	84
Abbildung 31: Temperaturoptimum von <i>Microdochium</i> spp.	87
Abbildung 32: Mittlere Wachstumsgeschwindigkeiten der <i>Microdochium</i> -Arten.	88
Abbildung 33: Interaktionstypen im Konkurrenztest.	90
Abbildung 34: Konkurrenzindex von <i>Stagonospora</i> -Isolaten gegen andere Schilfpilze <i>in vitro</i>	92
Abbildung 35: Einfluss der Konkurrenten auf <i>Stagonospora</i> auf Malzagar.	93
Abbildung 36: Einfluss der Konkurrenten auf <i>Stagonospora</i> auf SNA.	94
Abbildung 37: Einfluss der Konkurrenten auf <i>Stagonospora</i> auf Schilfblättern.	95
Abbildung 38: Potentieller Lebenszyklus, Verbreitungsmechanismus und Infektionswege von <i>Stagonospora</i> sp. 4/99-1 im Schilf.	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: GPS-Werte der Probenahmestandorte.....	14
Tabelle 2: Herkunft des pilzlichen Materials.....	15
Tabelle 3: Punktesystem zur Erstellung des Antagonismusindex.....	21
Tabelle 4: Verwendete Primer.....	26
Tabelle 5: Komponenten für die PCR.....	27
Tabelle 6: PCR mit spezifischen Primern für <i>Phragmites australis</i> bzw. mit Standard-Pilzprimern aus genomischer Pilz-DNA und aus Umweltproben.....	28
Tabelle 7: Nested PCR mit spezifischen Primern für <i>Stagonospora</i> sp. 4/99-1 bzw. für <i>Trichoderma</i> sp. A11.....	29
Tabelle 8: Nested PCR mit spezifischen Primern für <i>Microdochium</i> spp.	29
Tabelle 9: Reaktionsansätze für die Sequenzierung.....	31
Tabelle 10: Sequenzier-Programme.....	31
Tabelle 11: Sterilisation von Schilfsamen.....	42
Tabelle 12: Relative Häufigkeiten und BLAST-Suchergebnisse der Pilzisolat aus Schilfsamen nach Behandlung mit EtOH/ NaOCl/ EtOH 1/2/1 min.	43
Tabelle 13: Accession-Nummern der in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzen.	46
Tabelle 14: Vorkommen von <i>Stagonospora</i> 4/99-1 am Bodensee über mehrere Jahre.....	49
Tabelle 15: Verteilungsmuster von <i>Stagonospora</i> 4/99-1 in den verschiedenen Teilen der Schilf-Pflanze.....	50
Tabelle 16: Vorkommen von <i>Stagonospora</i> 4/99-1 in Samen.....	53
Tabelle 17: Vorkommen von <i>Microdochium</i> spp. am Bodensee über mehrere Jahre.	59
Tabelle 18: Verteilungsmuster der <i>Microdochium</i> -Arten in den verschiedenen Teilen der Schilf-Pflanze.....	61
Tabelle 19: Rest-Pilzvorkommen im Erdsubstrat nach dem Dämpfen.....	79
Tabelle 20: Isolierung von Pilzen aus unterirdischen Abschnitten der Schilfpflanzen aus dem Freilandversuch.....	80
Tabelle 21: Wuchsgeschwindigkeiten der <i>Stagonospora</i> -Isolate vom Bodensee.....	85
Tabelle 22: Herkunft der im Temperaturoptimumstest eingesetzten <i>Microdochium</i> -Isolate..	86

1. Einleitung

1.1 Einführung in das Ökosystem Schilf

1.1.1 Systematik, Morphologie, Standorte

Das Schilfrohr *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel gehört zur Klasse Monokotyledoneae (Einkeimblättrige Pflanzen), Ordnung Poales (Grasartige), Familie Poaceae (Süßgräser). Es ist weltweit verbreitet und kommt an den Ufern vieler Binnengewässer, in Sümpfen und auch in Salzmarschen der Küstengebiete (Apinis et al., 1972b; Mauchamp & Mésleard, 2001; Bertness et al., 2002; Minchinton, 2002) als bestandsbildende Pflanze vor. Morphologisch lässt sich diese Pflanze in die Abschnitte Rhizom mit Seitenwurzel, sowie den Halm mit Blättern und Blütenstand gliedern (Abbildung 1).

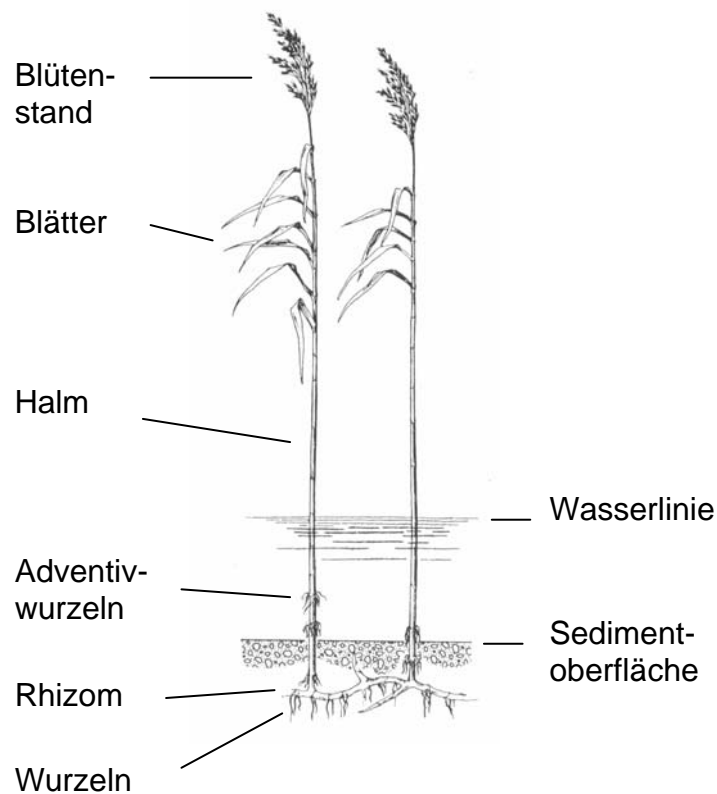


Abbildung 1: Morphologie der Schilfpflanze, verändert nach Bursche (1980) und Ostendorp (1993).

Die Pflanze erreicht am Bodensee je nach Standort meist eine Größe von 2-4 m. In anderen Gebieten können auch 6-8 m Höhe erreicht werden (Rodewald-Rudescu, 1974). Ihre oberirdischen Teile sterben im Winter ab und werden im Frühjahr aus Schösslingen der Rhizome neu gebildet. Die Pflanze weist prinzipiell Landpflanzenmorphologie auf (Ostendorp, 1993) und kann nicht längere Zeit unter Wasser wachsen, da sie submers kaum Photosynthese betreiben kann (Mauchamp et al., 2001). Sie verfügt jedoch über ein Belüftungssystem (Aerenchym),

über das die Rhizome der Pflanze von den Halmen aus mit Sauerstoff versorgt werden (Armstrong & Armstrong, 1988; Brix, 1988; Brix, 1989; Armstrong & Armstrong, 1990; Ostendorp, 1993; Jackson & Armstrong, 1999). Deshalb können infolge von Überstauung anoxisch gewordene Böden und Standorte bis etwa 1,5 m Wassertiefe (Ostendorp, 1993) vom Ufer aus besiedelt werden (Rodewald-Rudescu, 1974; Koppitz et al., 1997). Im Frühjahr aus dem Rhizomsystem austreibende Schößlinge können infolge der Versorgung mit Speicherstoffen und durch Sauerstoffzufuhr aus dem mit noch stehenden, abgestorbenen alten Halmen verbundenen Rhizomsystem eine Überstauung begrenzter Höhe bzw. begrenzter zeitlicher Dauer überstehen (Rodewald-Rudescu, 1974). Das im Gegensatz zu den oberirdischen Teilen ausdauernde Rhizomteil einer Pflanze kann 3-10 Jahre und älter werden. Durch Weiterwachsen der Rhizom-Enden kann der Klon jedoch als von unbegrenzter Lebensdauer angesehen werden (Rodewald-Rudescu, 1974). Die Wurzeltiefe hängt von der Höhe des Wasserstandes ab. Auf ständig überschwemmten Standorten beträgt die Dicke der Rhizomschicht nur 40-60 cm. Dagegen kann auf Standorten mit stark schwankendem Grundwasserspiegel das Rhizomsystem bis etwa 4 m tief in den Boden reichen (Rodewald-Rudescu, 1974). Über die im überstauten Bereich an den Halmen wachsenden Adventivwurzeln kann die Pflanze dem Wasser direkt Nährstoffe entziehen (Rodewald-Rudescu, 1974; Ostendorp, 1990).

1.1.2 Verbreitungsmechanismen

Bereits etablierte Schilf-Bestände breiten sich durch klonales, vegetatives Wachstum aus. Generative Vermehrung und Verbreitung durch Samen ist in solchen Beständen von untergeordneter Bedeutung (Rodewald-Rudescu, 1974). Von Bedeutung für die Verbreitung des Schilfes sind Samen v.a. bei der Besiedlung neuer Standorte (Luther, 1950; Koppitz et al., 1997).

Der Same besteht aus einer ca. 1 mm langen Karyopse, die von der Fruchthülle fest umschlossen und mit langen Härchen versehen ist. Infolge des geringen Gewichtes und der Härchen kann der Same durch Wind oder auf der Wasseroberfläche schwimmend über weite Strecken verbreitet werden (Hürlimann, 1951; Rodewald-Rudescu, 1974). Entlang von Wasserläufen kann eine vegetative Verbreitung über längere Distanz auch durch abgebrochene Rhizom- und Halmstücke erfolgen, die angeschwemmt werden und neu austreiben (Rodewald-Rudescu, 1974). Durch die Verbreitung über den Luftweg können auch Standorte erreicht werden, die nicht auf dem Wasserweg zugänglich sind. Die jungen Keimlinge brauchen einen stabilen Bodenfeuchtegehalt, d.h. der Wasserstand darf nicht stark schwanken. Sie sind empfindlich gegen Austrocknen und können bei längerer Überschwemmung ebenfalls absterben (Rodewald-Rudescu, 1974; Mauchamp et al., 2001). Die Aussaat von Schilfsamen wird bisweilen auch zur Renaturierung verwendet, so z.B. im Isselmeergebiet, Niederlande (Rodewald-Rudescu, 1974).

1.1.3 Ökologische und wirtschaftliche Bedeutung

Das Schilfröhricht ist Nahrungs- und Lebensraum für zahlreiche Organismen, z.B. Insekten (Schilf-Gallmücke, Schilfkäfer u.a.), Spinnen (Schilf-Sackspinne, Schilf-Radspinne u.a.), Vögel (Schilfrohrsänger, Teichrohrsänger, Drosselrohrsänger, Bartmeise u.a.), verschiedene

Fischarten (Rotfeder, Aal u.a.) und auch Säugetiere (Zwergmaus u.a.) (Ostendorp, 1993). Die Versorgung des Wurzelsystems mit Luft aus den oberirdischen Abschnitten führt im anoxischen Gewässersediment infolge von Verlusten zur Ausbildung eines Sauerstoffgradienten an den Wurzeln (Armstrong & Armstrong, 1988; Armstrong & Armstrong, 1990; Armstrong et al., 1992; Armstrong et al., 2000). Somit entstehen kleinräumige ökologische Nischen für aerobe und mikroaerophile Mikroorganismen, welche die Wurzel und die Rhizosphäre besiedeln können. In der von hohem Stoffumsatz gekennzeichneten Uferzone eines Gewässers kann das Schilf daher durch Förderung des mikrobiellen Umsatzes einen Beitrag zur Wasserreinigung leisten (Armstrong & Armstrong, 1988; Ostendorp, 1993; Grosser et al., 1997). Dieser Effekt wird in Naturkläranlagen zur Abwasserreinigung genutzt (Mönninghoff, 1987; Grosser et al., 1997).

Schilf wird als natürliche Sicherung erosionsgefährdeter Ufer gepflanzt. In Gebieten mit großen Schilfbeständen wird es handwerklich bzw. industriell als Baustoff (Dacheindeckungen, Putzträger), für Sichtschutzwände, zur Papierherstellung und für zahlreiche weitere Zwecke verwendet (Rodewald-Rudescu, 1974). Am Bodensee spielt der Aspekt der Nutzung heute keine Rolle mehr.

1.2 Umweltsituation am Bodensee

Ein als „Schilfsterben“ bezeichneter Rückgang der Schilfgürtel wurde in den vergangenen Jahrzehnten am Bodensee, wie auch bei zahlreichen anderen mitteleuropäischen Seen beobachtet (Ostendorp, 1989; Ostendorp, 1991; Grosser et al., 1997). Die möglichen Ursachen hierfür sind multifaktoriell und lassen sich in abiotische und biotische unterscheiden. Ursachen für mechanische Schädigung sind z.B. Treibholz und Algenmatten, welche angeschwemmt werden und die Schilfhalme niederdrücken sowie Wellenschlag durch Wind und Schiffe (Ostendorp, 1990; Ostendorp, 1991; Grosser et al., 1997). Längere vollständige Überstauung der Schilfhalme bei Hochwasserereignissen führt zum Absterben der Pflanzen (Honsell, 1879; Konold, 2000). In der Folge können größere Schilfflächen verschwinden (Rodewald-Rudescu, 1974; Böcker et al., 2002; Böcker et al., 2003). Durch die Anreicherung organischer Säuren als Folge anoxischer Bedingungen bzw. mikrobieller Abbauprozesse im Sediment wird das Wurzelwachstum beeinträchtigt (Armstrong et al., 1996a; Armstrong & Armstrong, 1999). Parasitierende Insekten, Milben und Mikroorganismen beeinträchtigen die Sauerstoffversorgung der Wurzeln (Armstrong et al., 1996b), sowie die Halmentwicklung und Samenbildung. Ferner könnte auch geringe klonale Diversität infolge der in aquatischen Bereichen ausschließlich vegetativen Ausbreitung eine Rolle spielen (Grosser et al., 1997; Koppitz et al., 1997; Koppitz & Kühl, 2000). Diese kann sich in einer verminderten Anpassungsfähigkeit des Bestandes auf veränderte Umweltbedingungen auswirken.

Der Bodensee weist jahreszeitliche Wasserstandsschwankungen von etwa 1,5 m zwischen Niedrigwasser im Winter und Hochwasser im Sommer auf, welche die Wuchsbedingungen für Pflanzen und die Sauerstoffversorgung des Uferbodens stark beeinflussen.

Welche der oben aufgeführten Einflussfaktoren am Bodensee für den Schilfrückgang ursächlich sind, ist nicht vollständig geklärt. Hochwasserereignisse scheinen jedoch der stärkste Einflussfaktor zu sein. Hierbei wird der über mehrere Jahre erfolgte Flächenzuwachs durch während der Wachstumsphase auftretende Hochwasserereignisse wieder zunichte gemacht

(Ostendorp, 1990; Böcker et al., 2002; Böcker et al., 2003). Prognosen gehen davon aus, dass infolge rasch aufeinanderfolgender Hochwässer der Bestand insgesamt zurückgeht (M. Dienst, Konstanz, pers. Mitteilung). Über den Einfluss sekundärer Faktoren, wie z.B. die Anwesenheit von endophytischen Mikroorganismen, auf Gleichgewichte und somit auf die Erholungsfähigkeit geschädigter Schilfbestände liegen keine Publikationen vor.

1.3 Endophytische Pilze

1.3.1 Interaktionen zwischen Pilzen und Pflanzen

Pilze, die in enger Assoziation mit Pflanzen leben, können eine beträchtliche Bandbreite von Wirkungen auf diese haben. Sie können in Abhängigkeit der betreffenden Interaktionspartner und zusätzlicher biotischer und abiotischer Faktoren von schädlich bis nützlich reichen (Schlösser, 1997; Saikkonen et al., 1998): Peritrophe und biotrophe parasitische Pilze ernähren sich auf Kosten ihrer Wirte und verursachen offensichtliche Krankheitssymptome auf ihnen (Schlösser, 1997). Die verschiedenen Mykorrhiza-Typen sind gut untersuchte Beispiele symbiontischer Wechselwirkungen. Bei dieser an den Wurzeln der meisten höheren Pflanzen vorkommenden Symbiose sind die Pilze von Bedeutung für den Aufschluss von Nährstoffen aus dem Boden und deren Bereitstellung für die Wirtspflanze. Dies erfolgt mittels der in die Umgebung der Pflanze übergreifenden Pilzhyphen, die wesentlich feiner als Wurzelhaare sind und daher eine größere Oberfläche besitzen (Sharma et al., 1997; Hodge et al., 2001; Landeweert et al., 2001). Im Gegenzug bezieht der Pilz Kohlenhydrate von der Pflanze (Hampp & Schaeffer, 1999; Jakobsen, 1999). Endophytische Pilze sind ein weiteres Beispiel einer potentiell symbiontischen Interaktion. Hierbei leben die Pilze ohne offenkundige Symptome zu verursachen vollständig im Inneren des Pflanzengewebes (Wilson, 1995; ausführliche Definitionen siehe Abschnitt 1.3.3). Sie vermitteln ihrer Wirtspflanze u.U. erhöhte Vitalität und erhalten von dieser im Gegenzug Nährstoffe und einen sicheren Lebensraum (siehe Abschnitt 1.3.5).

1.3.2 Ursprung des Begriffes „Endophyt“, Geschichtliches

Der Begriff „Endophyt“ bzw. „endophytische Pilze“ wurde bereits im 19. Jahrhundert verwendet, zunächst allerdings im Zusammenhang mit phytopathogenen Pilzen. A. de Bary grenzte 1866 diese Gruppe von den Epiphyten ab, welche nur die Oberfläche von Pflanzen besiedeln (de Bary, 1866; Petrini, 1986; Isaac, 1992). Für Pilze, die im Gegensatz zu Pathogenen keine direkt erkennbaren Auswirkungen auf die Wirtspflanze zeigen, wurde der Begriff erst viel später verwendet. Eine Weiterentwicklung des Begriffes zu heute gebräuchlichen Definitionen (siehe 1.3.3) gab es erst seit den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts (Wilson, 1995; Bills, 1996).

Die Existenz von Pilzen bzw. deren Interaktionen mit Gräsern, die auch noch im Sinne der heutigen Definition (siehe Abschnitt 1.3.3) als Endophyten gelten, ist seit ca. 100 Jahren bekannt (Guérin, 1898; Nestler, 1898; Freeman, 1903; Lewis et al., 1997; Hesse, 2002). Es handelt sich gleichzeitig um die erste Entdeckung samenbürtiger, d.h. über die Samen der Wirts-

pflanze übertragener Endophyten. Sie wurde bei dem Gras *Lolium temulentum* (Tausend-Lolch) gemacht. Seit ca. 80 Jahren kennt man Endophyten auch in anderen Pflanzen außer Gräsern (Lewis, 1924; Petrini, 1996). Diese Symbiosen wurden aber zunächst wenig beachtet. Erst seit ca. 20 Jahren wird verstärkt über dieses Thema gearbeitet (Petrini, 1986; Lewis et al., 1997; Hesse, 2002).

1.3.3 Definitionen für Endophyten

Der Begriff „Endophyten“ umfasst prinzipiell nicht nur Pilze, sondern auch endophytische, d.h. in einer Pflanze lebende, Bakterien und Algen (Wilson, 1995; Stone et al., 2000). Er wird jedoch im Rahmen dieser Arbeit nur auf Pilze bezogen.

Beim Versuch der Definition des Begriffes „endophytische Pilze“ wird rasch erkennbar, dass dieser nicht ohne weiteres präzise fassbar und von Pathogenen abgrenzbar ist. In der Literatur werden die Definitionen nicht einheitlich gehandhabt und zum Teil kontrovers diskutiert (Wennström, 1994; Wilson, 1995).

In einem überwiegend akzeptierten theoretischen Definitionsansatz werden Pilze, die in gesundem Pflanzengewebe etabliert sind, ohne im Wirt offenkundige Symptome oder erkennbare Schäden zu verursachen, als Endophyten bezeichnet (Carroll, 1986; Petrini, 1991; Hirsch & Braun, 1992; Wilson, 1995; Stone et al., 2000; Sieber, 2002). Dieser Ansatz beinhaltet die Einbeziehung von latenten Pathogenen und erfasst infolge der fließenden Übergänge somit ein breites Spektrum zwischen den Extremen Symbiose und Parasitismus (Wilson, 1995; Bills, 1996; Saikkonen et al., 1998).

Ergänzend zu der obigen Definition ist zu berücksichtigen, dass manche Autoren die Einbeziehung von vesikulär-arbuskulären Mykorrhizapilzen ablehnen (Carroll, 1986; Wilson, 1995), andere dagegen sie im Begriff „Endophyten“ mit einschließen (Clay, 1990b). In dieser Arbeit werden die klassischen Ekto- und Endo-Mykorrhizapilze nicht in den Begriff „Endophyten“ einbezogen.

Bei der oben gegebenen Einbeziehung latenter Pathogene in die Endophytendefinition ist zu berücksichtigen, dass je nach äußeren Bedingungen, wie Alter der Wirtspflanze, Mikroklima-Schwankungen usw., scheinbar manche Pilze zwischen endophytischer und parasitischer Lebensweise wechseln können. Bei Weizen (*Triticum vulgare*) gibt es z.B. den Spelzenbräune-Erreger *Phaeosphaeria nodorum* (Anamorph *Stagonospora nodorum*, Synonym *Septoria nodorum*) als Pathogen (Brönnimann, 1968), der auch als endophytisch, d.h. symptomlos vorkommend beschrieben wurde (Leuchtmann, 1984; Sieber, 1985; Sieber, 2002). Ursache hierfür dürfte ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen pilzlicher Virulenz und pflanzlicher Abwehr sein, das bei Verschiebung in Richtung erhöhter Virulenz bzw. geringerer Abwehr zum Krankheitsausbruch führen kann (Schulz et al., 2002). Die genetischen Unterschiede zwischen pathogenen und endophytisch-mutualistischen Stämmen der gleichen Art können gering sein. Beispielsweise bedingen eine Punktmutation bzw. die Disruption eines Genes bei *Colletotrichum magna* den Unterschied zwischen Pathogenität und symptomfreien endophytschem Wachstum mit mutualistischem Einfluss (Freeman & Rodriguez, 1993; Wilson, 1995; Redman et al., 1999; Sieber, 2002).

Ein praktischer Definitionsansatz verwendet ein beobachtetes Hyphenwachstum aus inneren Geweben oberflächensterilisierter Pflanzenteile allgemein als Beweis dafür, dass die entsprechenden Pilze endophytisch leben (Bills, 1996; Sieber, 2002). Bei der Isolierung aus der Wirtspflanze können jedoch irrtümlich auch Pilze erfasst werden, welche sehr widerstandsfähige Sporen bilden, die auf der Pflanzenoberfläche anhaften und durch die Behandlung nicht abgetötet wurden (Carroll, 1986; Petrini, 1986). Arten, die auf den zur Isolierung ausgewählten Medien nicht kultivierbar sind, werden – wie bei anderen kultivierungsabhängigen Ansätzen auch (vgl. z.B. Borneman & Hartin, 2000; Viaud et al., 2000) – hierbei nicht erfasst.

1.3.4 Verbreitung endophytischer Pilze

Endophytische Pilze können – im Gegensatz zu den an die Wurzel gebundenen Mykorrhizapilzen – in allen Pflanzenteilen einschließlich der oberirdischen Abschnitte vorkommen (Carroll, 1988; Petrini et al., 1992). Sie wurden in einer Vielfalt von Pflanzenarten mit Herkünften von tropischen bis zu alpinen Habitaten gefunden. Dies zeigt, dass diese Assoziationen in der Natur weit verbreitet sind. Endophyten liegen in einer breiten taxonomischen Vielfalt vor. Sie finden sich jedoch überwiegend innerhalb der Ascomycota, seltener bei den Basidiomycota (Saikkonen et al., 1998). Die pilzlichen Partner der unter der Bezeichnung Mykorrhiza bekannten Symbiosen von Pilzen mit höheren Pflanzen stammen teilweise aus anderen taxonomischen Gruppen als die Endophyten. Die arbuskulären Mykorrhizapilze gehören zu den Glomeromycota (Schüßler et al., 2001), die Ektomykorrhiza-bildenden Arten meist zu den Basidiomycota und seltener zu den Ascomycota (Cairney, 2000). Ericoide Mykorrhiza als dritter Haupttyp wird lediglich im Bereich einer einzigen Ordnung (Leotiales und deren nahe Verwandtschaft) der Ascomycota gefunden (Cairney, 2000).

Die Lebensweise vieler endophytischer Pilze scheint in der Natur biotroph zu sein, jedoch können fast alle Stämme auch in Reinkultur auf Standardpilzmedien gehalten werden (An et al., 1993; Chung & Schardl, 1997; Christensen et al., 2002). Sie können also prinzipiell auch saprophytisch ohne Wirtspflanze leben und sind somit als fakultativ biotroph anzusehen. Die Endophytenpopulation einer Pflanzenart kann in Abhängigkeit vom geografischen Standort variieren (Taylor et al., 1999).

1.3.5 Einfluss von Endophyten auf den Wirt

Es können grundsätzlich zwei Typen von endophytem Mutualismus unterschieden werden (Carroll, 1988):

Der erste Typ ist ein induzierbarer Mutualismus der durch eine lockere Assoziation zwischen einem Pilz und einem Wirt charakterisiert ist (Carroll, 1988). Hierbei wird Wirtsgewebe durch lokale Infektionen der Blätter über Sporenflug („horizontale Übertragung“) besiedelt, die von mehreren verschiedenen Pilzen stammen können. Dadurch steigt die Anzahl und Vielfalt der Endophyten mit zunehmenden Alter der Blätter an. Dieser Typ ist in der Natur weit verbreitet und ist besonders häufig bei Holzpflanzen der Angiospermae (Bedecktsamer) anzutreffen. Die Wirkungen solcher Endophyten auf die Vitalität ihrer Wirtspflanzen sind häufig noch unklar; allgemein wurde bisher vermutet, dass sie nur wenig zur Abwehr des Wirtes ge-

gen Schädlinge beitragen. Neuerdings wurde jedoch beim Kakaobaum (*Theobroma cacao*) eine deutliche Schutzwirkung gegen blattpathogene Pilze infolge lokaler Endophytenbesiedlung nachgewiesen (Arnold et al., 2003; Clay, 2004). Die Schutzwirkung durch die Endophyten ist hierbei nicht systemisch, sondern lokal auf die endophytenbesiedelten Gewebe beschränkt. Der dieser Wirkung zugrunde liegende Mechanismus basiert vermutlich auf einer direkten Wechselwirkung zwischen Endophyt und Pathogen.

Der zweite Typ stellt eine konstitutive Form des Mutualismus dar. Konstitutiver endophytischer Mutualismus ist durch eine systemische Infektion gekennzeichnet. Bisher kennt man diesen Typ v.a. von den Gattungen *Festuca* (Schwingel), *Lolium* (Lolch) und wenigen weiteren Gattungen innerhalb der Familie Poaceae (Süßgräser) in Verbindung mit Pilzen der Anamorph-Gattung *Neotyphodium* und der entsprechenden Teleomorph-Gattung *Epichloë* (Familie Clavicipitaceae, Stamm Ascomycota) (Schardl, 2001). Diese Pilze breiten sich in infizierten Pflanzen aus und werden oft durch die Samen auf die nächste Wirtsgeneration übertragen („vertikale Transmission“). Außerdem kommt bei den Teleomorph-Formen die horizontale Übertragung durch Sporenflug, sowie eine Mischform zwischen beiden Übertragungswegen vor. In dieser Gattung existieren somit drei Übertragungsweisen, deren Auftreten von der jeweiligen Pilzart abhängt. Durch die Mischform ist eine ausgewogene Verteilung zwischen beiden Übertragungswegen gegeben, welche die sexuelle Rekombination von Endophyt und Wirt gewährleistet und somit zur Erhöhung der genetischen Variabilität beiträgt (Leuchtman & Clay, 1997).

Infolge der Pilzbesiedlung wird die Vitalität der Wirtspflanzen verbessert durch erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen biotische Faktoren wie Beweidung, Insektenfraß, parasitische Nematoden und mikrobielle Parasiten (Clay, 1992; Bush et al., 1997; Schardl, 2001; Schardl et al., 2004) sowie abiotische Faktoren wie Trockenstress und Hitze (Arachevaleta et al., 1989; Malinowski & Belesky, 2000). Außerdem werden Biomasseproduktion und Ernährungsstatus verbessert (Latch et al., 1985; Arachevaleta et al., 1989; Groppe et al., 1999; Malinowski et al., 2000). Im Gegenzug erhält der Pilz im Rahmen dieser mutualistischen Assoziation von der Pflanze einen sicheren Lebensraum, Nährstoffe sowie eine Verbreitungsmöglichkeit über die Samen auf die nächste Wirtsgeneration (Saikkonen et al., 2004; Schardl et al., 2004).

Neben den bereits beschriebenen Gattungen *Epichloë/Neotyphodium* finden sich noch weitere Vertreter samenbürtiger symbiontischer Pilze. Samenbürtige Arten mit ebenfalls vitalitätssteigernder Wirkung wurden mit *Phomopsis casuarinae* in *Casuarina equisetifolia* (Kasuarbaum, Eisen-Grenadillholz) (Bose, 1947) und einem nicht bestimmten Pilz in *Helianthemum chamaecistus* (Zwerg-Heideröschen) (Bournnell, 1950) beschrieben. In neuerer Zeit wurden p-Endophyten (mit penicilliaten Konidiophoren), die zuvor auch als *Phialophora*- und *Gliocladium*-ähnlich bezeichnet wurden, als weitere, nicht mit *Epichloë/Neotyphodium* verwandte Gruppe samenbürtig übertragener Endophyten beschrieben (Latch et al., 1984; An et al., 1993; Siegel et al., 1995). Zumindest unter bestimmten Bedingungen können auch sie das Wachstum ihrer Wirtspflanze fördern (Malinowski et al., 1997a).

Die besondere Bedeutung samenbürtiger Pilze liegt in der während des ganzen Lebenszyklus der Pflanze fortdauernden Assoziation des Pilzes mit der Wirtspflanze (vgl. Bournnell, 1950). Hierbei kann in der pflanzlichen Tochtergeneration infolge der erblichen Assoziation von An-

fang an ein Selektionsvorteil für die Keimlinge aus pilzbesiedeltem Saatgut vorliegen (vgl. Bournell, 1950; Faeth & Sullivan, 2003). Im Hinblick auf gemeinsame Entwicklung (Co-Evolution) beider Partner ist diese enge Assoziation ebenfalls bedeutsam. Bei beiden Partnern können unterschiedliche Genflüsse zwischen deren Populationen vorherrschen: Bei dem strikt asexuellen Endophyten *Neotyphodium* liegt oft zwischen dessen Populationen ein geringer Genfluss vor, während bei der Wirtspflanze, z.B. *Festuca arizonica* (Arizona-Schwingel) ein stärkerer Genfluss infolge Pollenfluges über weitere Strecken vorliegt (Sullivan & Faeth, 2004). Infolge dessen besteht eine Instabilität, die im Laufe der Zeit zu einer Inkompatibilität der Genotypen beider Partner führt. Die Folge ist, dass trotz weiter bestehender Assoziation mutualistische Effekte eine Abschwächung erfahren oder ganz verloren gehen können.

Generell kann die Interaktion zwischen Pilz und Wirtspflanze je nach Art des Wirtes unterschiedlich ausfallen. Häufig als pathogen beschriebene Pilzarten können in anderen Wirtsarten auch als kommensale oder mutualistische Endophyten vorkommen. Als mutualistisch bekannte Pilze können wiederum je nach Wirtsart unterschiedlich stark positive bis gar keine Effekte ergeben (Johnson-Cicalese et al., 2000; Redman et al., 2001). In einzelnen untersuchten Systemen wurde gezeigt, dass der Genotyp der Wirtspflanze innerhalb der gleichen Art einen Einfluss auf die Auswirkung der Interaktion mit dem selben Pilzstamm haben kann (Schmidt, 1991; Marks & Clay, 1996; Malinowski & Belesky, 1999; Malinowski et al., 2000; Cheplick & Cho, 2003). Teilweise wurde eine Förderung leistungsschwacher Wirtsgenotypen beobachtet, während solche mit hoher Produktivität unbeeinflusst blieben oder sogar gehemmt wurden. Auch die Verbesserung der Trockenresistenz wirkt sich je nach Wirtsgenotyp unterschiedlich stark aus (Hesse, 2002).

Neben den Berichten über den positiven Einfluss von Endophyten auf ihre Wirtspflanzen gibt es auch Berichte über deutlich negative Folgen in einzelnen Systemen. Bei Mais (*Zea mays*) und Bananenpflanzen (*Musa acuminata*) wurde eine Verminderung der Photosyntheseleistung in Folge äusserlich symptomloser Infektionen durch *Fusarium moniliforme* bzw. *Colletotrichum musae* festgestellt. In Bananenpflanzen lag diesem Effekt offenbar eine Beeinträchtigung des Elektronentransportes an den Thylakoidmembranen der Chloroplasten zugrunde, während bei Mais die Verminderung des Chlorophyllgehaltes ursächlich war (Rodrigues Costa Pinto et al., 2000). Bei einer Art der auf Kulturgräser allgemein als positiv wirkend bekannten Gattung *Neotyphodium* konnten bei Assoziation mit einem Wildgras infolge der Pilzbesiedlung sogar verminderte Wachstumsparameter beobachtet werden (Faeth & Sullivan, 2003). Hieraus wird ersichtlich, dass eine positive Wirkung durch endophytische Besiedlung nicht überall gegeben ist. Für mit *Neotyphodium* assoziierte Wildgräser scheint ein Nutzen hinsichtlich des Schutzes gegen Herbivore im Gegensatz zu landwirtschaftlich genutzten Grasarten sogar eher die Ausnahme zu sein (Faeth, 2002).

1.3.6 Wirkungsmechanismen

Schutz vor Beweidung von Gräsern durch Säugetiere wie Schafe und Rinder wird durch toxisch wirkende Ergot-Alkaloide (z.B. Ergovalin) und Indol-Diterpene (z.B. Lolitrem B) ver-

mittelt. Diese werden von endophytischen *Epichloë/Neotyphodium*-Arten der Familie Clavicipitaceae, also Verwandten des bekannten Mutterkornpilzes, gebildet. Besonders bekannt wurde das durch neurotoxische Wirkung bedingte Phänomen „ryegrass staggers“ aus Neuseeland (Clay, 1990a; Schardl & Phillips, 1997; Miles et al., 1998; Schardl, 2001). Der Fraßschutz vor Insekten basiert auf insektizid wirkenden Pyrrolizidinen (z.B. N-Formyl-Lolin) und Fraß-abschreckend wirkenden Pyrrolopyrazinen (Peramin) (Schmidt, 1991; Bush et al., 1997; Yue et al., 2000; Schardl, 2001). Schutz vor pathogenen Mikroorganismen kann ebenfalls durch die pilzliche Produktion von inhibierenden Sekundärstoffen erfolgen (Hallmann & Sikora, 1996; Peláez et al., 1998). Der Schutz gegen pathogene Pilze kann aber ebenso auch lokal durch direkte Wechselwirkung der Endophyten mit den Pathogenen erfolgen (Arnold et al., 2003). Infolge der Produktion von Sekundärstoffen mit antimikrobiellen und weiteren pharmakologisch interessanten Eigenschaften werden Endophyten neuerdings systematisch auf bisher unbekannt, in Pharmazie und Landwirtschaft einsetzbare Verbindungen hin untersucht (Strobel & Long, 1998; Schulz et al., 2002; Strobel & Daisy, 2003).

Die Wuchssteigerung der Wirtspflanzen kann auf der pilzlichen Produktion von Hormonen, Sekundärstoffen (Varma et al., 1999) oder durch den Pilz vermittelter erhöhter Mineralstoffaufnahme aus dem Boden beruhen (Malinowski & Belesky, 1999; Malinowski et al., 2000). Für manche in den Wurzeln vorkommende Endophyten ist hierbei auch eine Mykorrhiza-ähnliche Funktion anzunehmen (Jumpponen & Trappe, 1998; Jumpponen, 2001).

Die erhöhte Widerstandsfähigkeit mancher endophytenbesiedelter Pflanzen gegen Trockenstress beruht auf einer Verminderung der Transpirationsverluste durch veränderte Spaltöffnungssteuerung (Malinowski et al., 1997a; Malinowski et al., 1997b; Malinowski & Belesky, 2000) und vermutlich auch auf einer durch den Pilz vermittelten Fähigkeit zur rascheren Anpassung an veränderte Bedingungen (Malinowski et al., 1997a). Außerdem wurden physiologische und biochemische Adaptationen durch Akkumulation osmotisch aktiver Substanzen zur Aufrechterhaltung des Turgors (Malinowski & Belesky, 2000), sowie eine Veränderung der Wurzelmorphologie beobachtet. Hierbei werden mehr und feinere Wurzeln gebildet, wodurch die Wasseraufnahme erleichtert wird (Malinowski & Belesky, 2000).

Die Wirkung von Endophyten bleibt jedoch nicht unmittelbar auf deren Wirtspflanze beschränkt. Durch die Endophyten-vermittelte erhöhte Vitalität kann bei Arten mit hoher relativer Besiedlungshäufigkeit ein Selektionsvorteil entstehen, der zur Verdrängung benachbarter Arten und damit zu einer Veränderung der Populationszusammensetzung führt (Clay & Holah, 1999). Im weiteren scheint die Anwesenheit des Endophyten biotische und abiotische Komponenten des Bodens verändern zu können und wirkt sich damit indirekt ebenfalls auf die Zusammensetzung der Pflanzenpopulation aus (Matthews & Clay, 2001). Die Anwesenheit von Endophyten kann zusätzlich sogar Nahrungsnetze von pflanzenparasitierenden Insekten und deren Hyperparasiten bis in die höheren Trophie-Ebenen beeinflussen, was an Blattläusen auf dem *Neotyphodium*-infizierten Gras *Lolium* (Lolch) nachgewiesen wurde (Omacini et al., 2001).

1.4 Bisherige Kenntnisse über schilfassozierte Pilze

Die bisher bekannten, mit Schilf assoziierten Pilze können in vier funktionelle Gruppen eingeordnet werden:

1. Pathogene, die auf ihrer Wirtspflanze offensichtliche Krankheitssymptome hervorrufen,
2. Saprophyten, die sich als Epiphyten auf der Oberfläche von Pflanzenexsudaten, bzw. von abgestorbenen Teilen ernähren,
3. Endophyten, die das Innere der Pflanze besiedeln und über deren funktionelle Einflüsse beim Schilf noch wenig bekannt ist,
4. symbiontische Wurzelpilze (Mykorrhiza), deren mögliche nützliche Funktionen aus Untersuchungen an anderen Pflanzen bereits bekannt sind.

Die Besiedlung der verschiedenen Teile von Schilfpflanzen durch Pilze ist durch Isolierungen eingehend untersucht worden (Apinis et al., 1972a; Apinis et al., 1972b; Apinis et al., 1975; Taligoola et al., 1975). Die in England durchgeführten Arbeiten umfassten die Untersuchung der Besiedlung von Halmen, Blättern und Blütenständen unter Berücksichtigung verschiedener Altersstadien von lebenden jüngeren bis hin zu bereits lange abgestorbenen Teilen. Aufgrund der gewählten Methodik wurden bei diesen Untersuchungen neben Pathogenen auch Epiphyten bzw. Saprophyten mit erfasst.

Es konnte hierbei gezeigt werden, dass sich die Pilzgemeinschaften an stehenden Halmen über und unter Wasser, sowie innerhalb der verschiedenen submersen Zonen vom schlammigen Grund bis zur Wasseroberfläche voneinander unterscheiden. Die Gemeinschaftszusammensetzung war dabei stadienabhängig und unterlag vom lebenden bis zum toten, noch stehenden Halm einer ausgeprägten Sukzession (Apinis et al., 1972b). Bei der Besiedlung lebender Halme oberhalb der Wasseroberfläche wurde ein Anstieg der Artenvielfalt mit zunehmendem Alter des Halmes festgestellt, wobei die Nodien bevorzugt besiedelt wurden. Vertreter der Deuteromycota-Gattungen *Phoma* und *Stagonospora* (alte Bezeichnung: *Hendersonia*), sowie der Ascomycota-Gattungen *Chaetomium*, *Helotium*, *Dasyscypha* und *Mollisia* waren die am häufigsten nachgewiesenen Pilze (Apinis et al., 1975). An submersen Teilen noch stehender, abgestorbener Halme wurden ebenfalls *Stagonospora*-Arten nachgewiesen (Cunnell, 1957; Apinis et al., 1972b).

Die Besiedlung der Blattoberfläche zeigte eine deutliche Abhängigkeit der Zusammensetzung der Pilzflora von den Entwicklungsstadien der Pflanze von jungen über ältere bis zu abgestorbenen Blättern. Auf der Blattoberfläche wurden 49 verschiedene Pilzarten gefunden, von denen Vertreter der Gattungen *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Dasyscyphus*, *Diplosporium* und *Oidiodendron* größere Häufigkeit und Verbreitung in verschiedenen Habitaten zeigten (Apinis et al., 1972a).

Die Untersuchung der lebenden und abgestorbenen Blütenstände zeigte, dass diese durch relativ wenige Pilze mit geringen Häufigkeiten besiedelt werden. Die Arten, welche die Blütenstände besiedelten, waren im wesentlichen die selben, die auch auf den anderen Teilen dieser Pflanze vorkamen. Vertreten waren auf den Blütenständen v.a. die Gattungen *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Claviceps* und *Epicoccum*, ferner auch Vertreter der Gattung *Stagonospora* (Taligoola et al., 1975).

Bei der Untersuchung bekannter pathogener Pilze auf oberirdischen Pflanzenteilen in ungarischen Schilfbeständen konnte durch visuelle Bonitierung ein habitatsabhängiges, unterschiedliches Vorherrschen der verschiedenen Arten gezeigt werden (Bán et al., 1996). Hierbei zeigten Vertreter der Gattungen *Puccinia*, *Polythrinciopsis* und eine *Phoma*-ähnliche Art in einem überfluteten Habitat erhöhte Infektionshäufigkeit, während *Deightoniella*, gefolgt von einer weiteren *Puccinia*-Art in einem semi-ariden Habitat die schwersten Infektionen auslöste. Weiterhin konnte an ungarischen Schilfbeständen ein Zusammenhang zwischen der industriell nutzbaren Qualität der Schilfhalmes und dem ebenfalls aufgrund der Krankheitssymptome (Blattflecken, -nekrosen) bestimmten Befall mit pathogenen Pilzen gezeigt werden (Bán et al., 2000). Hierbei konnte für Arten der Gattung *Deightoniella* eine positive Korrelation zwischen verminderter Verarbeitungsqualität und dem Befallsausmaß gezeigt werden, während bei Vertretern der ebenfalls als pathogen eingeordneten Gattung *Stagonospora* kein Zusammenhang zwischen der Qualität und dem Ausmaß des Pilzbefalles nachgewiesen wurde. Dagegen war die Befallshäufigkeit des Rostpilzes *Puccinia phragmitis* bei Pflanzen guter Qualität am höchsten (Bán et al., 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Elementgehalt in den Schilfblättern von der Art des Pathogens abhängt und durch manche Pathogene (*Stagonospora*, *Deightoniella*) gesenkt wird, während er bei anderen (*Puccinia*) eine positive Korrelation mit dem Befall aufweist (Engloner et al., 2000).

Von Schilf an überschwemmten und trockenen Standorten am Bodensee wurde eine Vielzahl endophytischer bzw. eng mit der Pflanze assoziierter Pilze aus den verschiedenen Pflanzenteilen einschließlich der Wurzeln isoliert und mittels klassischer und molekularer Techniken bestimmt (Wirsel et al., 2001). Es wurden mindestens 19 verschiedene Gattungen gefunden. Einige von diesen zeigten Bevorzugung überschwemmter (*Microdochium* sp., *Cladosporium* sp.) bzw. trockener Standorte (*Trichoderma* sp., *Cylindrocarpon* sp.). Für eine ausgewählte Gattung (*Cladosporium*) wurde gezeigt, dass sie an den hier untersuchten Bodenseestandorten in mehreren Arten sympatrisch vorkommt (Wirsel et al., 2002). Am Beispiel eines endophytischen Vertreters der Gattung *Microdochium* konnte gezeigt werden, dass der aus Verlusten der Schilfwurzel resultierende Sauerstoffgradient (siehe Abschnitt 1.1.3) endophytische Neubesiedlung auch in einer prinzipiell anoxischen, für Pilze ungeeigneten Umgebung ermöglicht (Damm et al., 2003). Beim Schilf am Bodensee konnte außerdem eine Besiedlung durch eine Vielfalt verschiedener arbuskulärer Mykorrhizapilze (Stamm Glomeromycota) nachgewiesen werden (Wirsel, 2004). Hierbei bestimmen die Bodenbedingungen den Symbiosestatus der Wirtspflanze, denn die Mykorrhizabesiedlung wurde in trockenen Habitaten häufig nachgewiesen, während sie in überschwemmten Habitaten vollständig fehlte.

1.5 Ziele der Arbeit

Im vorliegenden Werk sollten folgende Hauptfragestellungen bearbeitet werden:

An einem naturnahen Gras-System von hoher ökologischer Relevanz sollten Endophyt-Wirt-Wechselwirkungen untersucht werden, da diese an nicht-landwirtschaftlich genutzten krautigen Pflanzen bisher nicht ausführlich untersucht worden sind (Sieber, 2002; Faeth & Sullivan, 2003). Hierfür wurde Schilf (*Phragmites australis*) ausgewählt. Dessen natürliche Bestände unterliegen keiner Düngung, Abweidung, Schnitt oder anderen anthropogenen Einflüssen. Schilf steht damit im Gegensatz zu den meistens untersuchten Weidegräsern, die einer ausgeprägten anthropogenen Selektion unterworfen sind. An solchen Gräsern konnte oft eine Assoziation mit *Neotyphodium*-Arten gezeigt werden, die samenbürtig übertragen werden und damit Musterbeispiele für erbliche Symbiosen darstellen.

Samenbürtige Endophyten wurden bei verschiedenen Gräsern nachgewiesen. Daher sollte Schilf auf das Vorkommen und die Verbreitung samenbürtiger endophytischer Pilze hin untersucht werden. Es sollte ermittelt werden, ob samenbürtige und weitere ausgewählte, häufige Endophyten ähnlich wie bei anthropogen beeinflussten Gräsern einen positiven Einfluss auf die Vitalität der Wirtspflanze haben. Für diese funktionelle Charakterisierung sollte ein Mikrokosmossystem mit axenischen Pflanzen etabliert werden, um die Untersuchungen ohne Störungen durch die Anwesenheit anderer Organismen durchführen zu können.

Mittels *in vitro* Konkurrenztests auf unterschiedlichen Substraten sollte schließlich die Konkurrenzfähigkeit samenbürtiger Pilze mit anderen Endophyten verglichen werden. Dies sollte erste Anhaltspunkte für die Durchsetzungsfähigkeit einzelner Isolate im Freiland bzw. in der Wirtspflanze liefern.

Die Schilfpflanze kommt nicht nur auf Standorten mit normalem Bodenfeuchtegehalt vor, sondern besiedelt auch dauerhaft überschwemmte Standorte. Dies verändert die Art möglicher Interaktionen mit Mikroorganismen. Daher sollte die in vorangegangenen Arbeiten festgestellte Bevorzugung mancher Pilze für bestimmte, stark unterschiedliche Habitatstypen eingehender untersucht werden. Hierbei sollte das Verteilungsmuster in den verschiedenen Pflanzenteilen sowie das saisonale Verhalten der Pilze bzw. die Persistenz über längere Zeiträume mit kultivierungsunabhängigen Methoden untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft des pflanzlichen und pilzlichen Materials

2.1.1 Probenahme

Die beiden Probenahmestellen liegen am Bodensee bei Konstanz nördlich („Mainau“) und südlich („Reichenau“) des Bodanrück, einer von einer Hügelkette längs durchzogenen Halbinsel (Abbildung 2). Die im folgenden mit „Reichenau“ bezeichnete Stelle befindet sich bei der Ruine Schopflen auf der Nordseite des Dammes zur Insel Reichenau, einem landwirtschaftlich intensiv genutzten Gebiet (Untersee-Gnadensee). Die im folgenden mit „Mainau“ bezeichnete Stelle liegt gegenüber der Blumeninsel Mainau in der Bucht „obere Güll“ an einem renaturierten, von Wäldern umgebenen Ufer (Obersee-Überlingersee). Die Entfernung zwischen beiden Standorten beträgt in der Luftlinie 6,8 km.

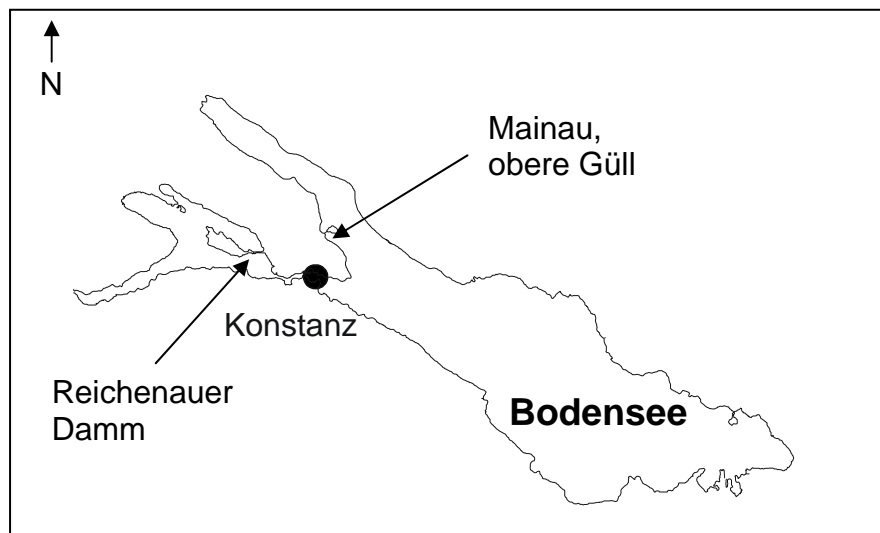


Abbildung 2: Lage der Probenahmestandorte im Bodensee.

Die Standorte wurden in die Zonierungen „überschwemmt“ und „trocken“ differenziert, welche je ca. 20-30 m voneinander entfernt liegen. Die Zonierung „überschwemmt“ ist durch eine fast ganzjährige Überstauung mit Wasser charakterisiert, bei der nur während des Niedrigwassers im Winter für ca. zwei Monate das Sediment trocken liegt. Die Proben wurden aus der seewärtigen Front des Schilfgürtels entnommen. Die Zonierung „trocken“ charakterisiert den landwärtigen Bereich des Schilfgürtels. Sie liegt im erhöhten Uferbereich und wird nur während extremer Hochwasserperioden im Frühjahr/Sommer überstaut, wie z.B. für ca. sechs Wochen beim Hochwasser von 1999.

Die Qualität der beprobten Schilfbestände wurde gemäß dem Schadklassentypisierungssystem von Böcker et al. (2001) beurteilt, welches auf der Struktur der Bestände basiert. Zwischen den jeweils im erhöhten Uferbereich landwärtig („trocken“) liegenden Beständen beider Standorte lag nach dem Hochwasser 1999 kein wesentlicher Unterschied vor. Beide waren in die Klasse G1-G2 (ungeschädigt bis schwach geschädigt) einzuordnen. Dagegen war nach

dem angegebenen System der beprobte Bereich des Bestandes „Reichenau überschwemmt“ etwa als Klasse G3 (mittel/ deutlich geschädigt) und der beprobte Bereich des Bestandes „Mainau überschwemmt“ als Klasse G5 (extrem geschädigt) einzuordnen.

Die exakte Standortbestimmung erfolgte durch ein Satellitennavigationssystem (Global Positioning System) mit einem mobilen GPS-II-Gerät (Garmin International Inc., GPS GmbH, Gräfelfing). An den in Tabelle 1 definierten Stellen erfolgte die Beprobung in einem Umkreis von 5-10 m. Aus dem Beprobungsumkreis ergibt sich, dass eine völlige Identität der Probenahmestelle über die Jahre nicht gegeben ist.

Tabelle 1: GPS-Werte der Probenahmestandorte. Die Breiten- und Längenwerte sind in Grad und Minuten angegeben.

Standort, Zonierung	Breite, Nord	Länge, Ost
Reichenau, überschwemmt	47°41.277'	009°06.092'
Reichenau, trocken	47°41.262'	009°06.105'
Mainau, überschwemmt	47°41.834'	009°11.510'
Mainau, trocken	47°41.830'	009°11.496'

Die Probenahmen erfolgten in den Jahren 1998-2001 durch Ausgraben ganzer Schilfpflanzen einschließlich des Wurzelstockes (Rhizom) bis ca. 30 cm Tiefe. Im Jahr 2000 wurde während der Vegetationsperiode von April bis November in ein- bis zweimonatlichen Abständen beprobt. Pro Standortabschnitt und Probenahmetag wurden eine bis drei Pflanzen ausgegraben. Das Pflanzenmaterial für kultivierungsunabhängige Untersuchungen wurde mit fließendem Leitungswasser so lange gewaschen bis keine Erde oder Schmutz mehr anhaftete. Bis zur Bearbeitung erfolgte die Lagerung bei -20°C.

Schilfblütenstände bzw. Samen für die Isolierung von Pilzen und zur Gewinnung von Saatgut wurden zur Reifezeit im November geerntet und lufttrocken in Papiertüten bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.2 Herkunft des Saatgutes für Mikrokosmos-Experimente

Zur Herstellung axenischer Pflanzen für Mikrokosmos-Experimente wurde im November 1998 gesammeltes Saatgut vom Bodensee-Standort Reichenau, überschwemmt eingesetzt. Zusätzlich wurde kommerziell erhältliches Saatgut aus Norddeutschland verwendet (Jelitto Staudensamen GmbH, Schwarmstedt).

2.1.3 Pilzliches Material

Die für PCR-Tests, Erstellung von Referenzsequenzen für Phylogenien, Mikrokosmen und Konkurrenztests verwendeten Pilzstämme wurden aus den in Tabelle 2 angegebenen Herkünften bezogen.

Tabelle 2: Herkunft des pilzlichen Materials. Abkürzungen: CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande. In eckigen Klammern angegebene CBS-Nummern unter der Isolat-Nummer kennzeichnen die Deponierung von Isolaten der Phytopathologie Konstanz bei der CBS.

Gattung, Art	Isolat-Nr.	Referenz/ Bezugsquelle	isoliert aus	Standort
<i>Arthrinium</i> sp.	6/97-11	leg. W. Leibinger, 1997, Konstanz, unveröffentlicht	Schilf-Wurzel	Reichenau, überschwemmt
<i>Chaetomium</i> sp.	6/97-38	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Mainau, überschwemmt
<i>Cladosporium herbarum</i>	315W	Wirsel et al., 2002	Schilf-Wurzel	Mainau, trocken
<i>Cladosporium oxysporum</i>	4/97-20	Wirsel et al., 2002	Schilf-Halm	Mainau, überschwemmt
<i>Cladosporium oxysporum</i>	5/97-8	Wirsel et al., 2002	Schilf-Halm	Mainau, überschwemmt
<i>Cladosporium oxysporum</i>	A14	Wirsel et al., 2002	Schilf-Wurzel	Reichenau, trocken
<i>Cladosporium</i> sp.	A13	Wirsel et al., 2002	Schilf-Wurzel	Reichenau, trocken
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	5/97-12 [CBS102892]	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Reichenau, trocken
<i>Epicoccum</i> sp.	4/99-12	eigenes Isolat; Ernst et al., 2003	Schilf-Samen	Reichenau, überschwemmt
<i>Fusarium</i> sp.	5/97-45	Wirsel et al., 2001	Schilf-Halm	Mainau, trocken
<i>Geotrichum</i> sp.	6/97-17	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Reichenau, überschwemmt
<i>Gliocladium</i> sp.	4/97-110	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Reichenau, überschwemmt
<i>Lophiostoma arundinis</i>	CBS621.86	Leuchtman, 1985/ CBS	Schilf	Sarnen, Sarnersee, Kt. Obwalden, Schweiz
<i>Microdochium bolleyi</i>	4/97-7	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Reichenau, überschwemmt
<i>Microdochium bolleyi</i>	5/97-48	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Reichenau, überschwemmt
<i>Microdochium bolleyi</i>	5/97-49	leg. W. Leibinger, 1997, Konstanz, unveröffentlicht	Schilf-Wurzel	Reichenau, überschwemmt
<i>Microdochium bolleyi</i>	5/97-54 [CBS102891]	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Mainau, trocken
<i>Microdochium bolleyi</i>	A7	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Mainau, trocken
<i>Microdochium bolleyi</i>	CBS137.64	leg. J.H. van Emden, 1963/CBS	Rhizosphäre von <i>Secale cereale</i> (Roggen)	Niederlande
<i>Microdochium bolleyi</i>	CBS172.63	leg. W. Gams, 1962/ CBS	Boden von Weizenfeld	Kiel-Kitzeberg, Deutschland

<i>Microdochium nivale</i> var. <i>nivale</i>	CBS110.94	leg. R. Roberti, Centrodi Studio per gli Antiparassitari, Bologna/CBS	Halmbasis von <i>Triticum aestivum</i> (Weizen)	Italien
<i>Microdochium nivale</i> var. <i>nivale</i>	CBS320.78	leg. P. Reinecke/CBS	<i>Triticum aestivum</i> (Weizen)	Deutschland
<i>Microdochium phragmitis</i>	5/97-66	leg. W. Leibinger, 1997, Konstanz, unveröffentlicht	Schilf-Halm	Mainau, trocken
<i>Microdochium phragmitis</i>	CBS285.71	leg. W. Gams, 1966/CBS	Teleutosorus von <i>Puccinia</i> sp. auf Schilf	Bialowiesza Nationalpark, Polen
<i>Microdochium</i> sp.	4/97-39	leg. W. Leibinger, 1997, Konstanz, unveröffentlicht	Schilf-Halm	Mainau, trocken
<i>Microdochium</i> sp.	5/97-16	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Mainau, trocken
<i>Microdochium</i> sp.	5/97-30	leg. W. Leibinger, 1997, Konstanz, unveröffentlicht	Schilf-Wurzel	Mainau, überschwemmt
<i>Microdochium</i> sp.	6/97-20	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Mainau, überschwemmt
<i>Penicillium</i> sp.	5/97-5	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Mainau, überschwemmt
<i>Phaeosphaeria eustoma</i>	CBS337.86	leg. H.A. van der Aa, 1986/CBS	toter Schilf-Halm	Étang d'Hardy, Seignosse, Frankreich
<i>Phaeosphaeria phragmiticola</i>	CBS459.84	Leuchtman, 1984/CBS	trockene Blattscheide von Schilf	Husemersee, Andelfingen, Kt. Zürich, Schweiz
<i>Phaeosphaeria phragmitis</i>	CBS578.86	Leuchtman, 1984/CBS	Schilf	Maur am Greifensee, Kt. Zürich, Schweiz
<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	CBS589.86	Leuchtman, 1984/CBS	Schilf	Wichelsee, Sarnen, Kt. Obwalden, Schweiz
<i>Rhinocladiella</i> sp.	6/97-36	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Mainau, trocken
<i>Sclerotinia</i> sp.	5/97-19	leg. W. Leibinger, 1997, Konstanz, unveröffentlicht	Schilf-Halm	Reichenau, überschwemmt
<i>Septoria arundinacea</i>	CBS281.72	leg. J.W. Veenbaas-Rijks, 1971/CBS	Schilf-Blüte	Zuidelijk Flevoland, Niederlande
<i>Stagonospora neglecta</i> var. <i>colorata</i>	CBS343.86	leg. H.A. van der Aa, 1986/CBS	Schilf-Blatt	Seignosse, Landes, Frankreich
<i>Stagonospora</i> sp.	4/99-1 [CBS113270]	eigenes Isolat; Ernst et al., 2003	Schilf-Samen	Reichenau, überschwemmt
<i>Stagonospora</i> sp.	4/99-5 [CBS113271]	eigenes Isolat; Ernst et al., 2003	Schilf-Samen	Reichenau, überschwemmt
<i>Stagonospora</i> sp.	4/99-18 [CBS113272]	eigenes Isolat; Ernst et al., 2003	Schilf-Samen	Reichenau, überschwemmt
<i>Trichoderma</i> sp.	A11	Wirsel et al., 2001	Schilf-Wurzel	Mainau, trocken
Nicht identifizierter Pilz; ähnlich zu <i>Cordyceps memorabilis</i> mit BLAST-Score 521 (Eric Kemen, Konstanz, unveröffentlichte Daten)	Bo 0015	leg. Dr. Christine Postius, Pflanzenphysiologie, Universität Konstanz	Cyanobakterienkultur Bo 0015 von Biofilm auf Stein im Litoral	Konstanz-Egg

2.1.4 Hinterlegung von Pilzisolaten bei Stammsammlungen

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten *Stagonospora*-Stämme wurden beim Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande deponiert (siehe Tabelle 2).

2.2 Isolierung und Kultivierung von Pilzen

2.2.1 Medien

Malzagar, 2% (nach Leuchtmann, 1984; verändert):

Gerstenmalzextrakt	20 g/l
Agar	20 g/l

Für die Isolierung aus Umweltproben erfolgte zur Unterdrückung des Wachstums von Bakterien die Zugabe einer Kombination von zwei Antibiotika. Diese wurden in wässriger Lösung sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugegeben (Endkonzentrationen):

Ampicillin, Na-Salz	100 µg/ml
Streptomycinsulfat	100 µg/ml

Synthetischer Nährstoffarmer Agar (SNA; nach Nirenberg, 1976):

KH ₂ PO ₄	1 g/l
KNO ₃	1 g/l
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.5 g/l
KCl	0.5 g/l
Glucose	0,2 g/l
Saccharose	0,2 g/l
Agar	20 g/l
pH 6	

V8-Saft-Agar (nach Ko et al., 1978; verändert):

V8-Gemüsesaft	20% (v/v)
Calciumcarbonat	3 g/l
Bacto-Agar	25 g/l
pH 5,8	

Schilfblätter:

Im Freiland gesammelte symptomfreie Schilfblätter wurden im feuchten Zustand in Glaspetrischalen autoklaviert und danach als Substrat für Pilzkulturen in Plastikpetrischalen eingesetzt. Zur Erhaltung des Feuchtegehaltes wurde angefeuchtetes Filterpapier in die Petrischalen gegeben (vgl. Abschnitt 2.3.3).

Getreide-Stroh (nach Leuchtmann, 1984 & pers. Mitteilung):

In 100 ml Erlenmeyerkolben wurde Getreidestroh locker eingefüllt und mit 40 ml Leitungswasser mit Zusatz von je 10 mg Biotin und Thiamin übergossen. Der Kolben wurde mit einem Wattepfropfen verschlossen und autoklaviert.

RNT-Flüssigmedium (nach Rao & Niederpruem, 1969):

Hefe-Extrakt	4 g/l
Glucose	4 g/l
Malzextrakt	10 g/l
Tryptophan	0,1 g/l

Minimalmedium, flüssig (nach Pontecorvo et al., 1953):

NaNO ₃	6 g/l
KCl	0,52 g/l
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,52 g/l
KH ₂ PO ₄	1,52 g/l
FeSO ₄	Spuren (kleine Spatelspitze/l)
ZnSO ₄	Spuren (kleine Spatelspitze/l)
Glucose	10 g/l
pH 6,5	

Complete Medium (CM) für Dauerkulturen (Wirsel et al., 2001; verändert):

Glucose	1% (w/v)
Hefe-Extrakt	0,1% (w/v)
Casein (sauer)	0,05% (w/v)
Casein (enzymatisch)	0,05% (w/v)
Glycerin	20% (w/v)

Saccharose-Pepton-Medium (SP) für Dauerkulturen:

Saccharose	10% (w/v)
Pepton	1% (w/v)

Die pH-Werte der oben angegebenen Medien wurden – sofern sie angegeben sind – mit NaOH bzw. HCl als Titrationsmittel eingestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurde destilliertes Wasser verwendet. Alle oben angegebenen Medien wurden 25 min bei 121°C autoklaviert.

2.2.2 Isolierung aus Samen

Zur Beseitigung der auf der Samenoberfläche vorkommenden Pilze und um die in den Samen vorkommenden Pilze anzureichern, wurden die Samen durch Oberflächensterilisation mit verschiedenen Chemikalien und deren Kombinationen unter Variation der Inkubationsdauer behandelt. Verwendet wurden 5% Natriumhypochlorit (NaOCl), 70% Ethanol (EtOH), sowie eine Kombination von sukzessive 70% EtOH/5% NaOCl/70% EtOH. Die Inkubationszeit betrug 2-30 min (siehe Tabelle 11). Zur Isolierung von Pilzen aus Pflanzenmaterial (hier: Sa-

men) wurde Malzagar mit Antibiotika-Zusatz (siehe Abschnitt 2.2.1) als Medium verwendet. Die Platten wurden bei 20°C im Dunkeln inkubiert.

2.2.3 Dauerkulturen

Zur dauerhaften Aufbewahrung von pilzlichem Material wurden Kulturen zur Cryolagerung angelegt. Hierzu wurde Mycel bzw. Sporen von Malzagarplatten mit Hilfe eines sterilen Spatels abgeschabt und in den entsprechenden Medien suspendiert. Die hierfür verwendeten Medien Complete Medium (CM) und Saccharose-Pepton (SP) sind unter Abschnitt 2.2.1 aufgeführt. Aufgrund der in diesen Medien enthaltenen Komponenten wird die Bildung von Eiskristallen vermindert. Nach einer 30-60 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Lagerung bei -70°C.

2.3 Charakterisierung von Pilzisolaten

2.3.1 Wuchsgeschwindigkeit und Temperaturoptimum

Die Ermittlung der Wuchsgeschwindigkeit und des Temperaturoptimums von Pilzisolaten erfolgte auf Malzagar bei 10, 15, 20, 25 und 30°C im Dunkeln. Pro Isolat und Temperatur wurden drei Replikate angesetzt. Nach einer Woche bei schnell wachsenden Arten bzw. zwei Wochen bei langsam wachsenden Arten wurde die Wuchsstrecke ausgemessen und die durchschnittliche Wuchsgeschwindigkeit in mm pro Tag berechnet. Für die Ansatzserie bei 10°C wurde bei wenigen sehr langsam wachsenden Arten aufgrund geringer Wuchsgeschwindigkeit die Auswertung erst nach drei Wochen durchgeführt.

2.3.2 Sporulationstests

Zur morphologischen Bestimmung der Isolate wurde versucht, diese auf verschiedenen Medien durch mehrwöchige bis mehrmonatige Inkubation zur Sporenbildung anzuregen. Als Substrate dienten Malzagar, SNA mit einer auf die Agaroberfläche gelegten autoklavierten Gersten-Ähre, um dem Pilz ein zusätzliches, hartes Substrat zur Verfügung zu stellen, V8-Saft-Agar und autoklaviertes Getreide-Stroh (siehe Abschnitt 2.2.1). Die Inkubation erfolgte bei 20°C unter permanentem UV-Licht (L36W/73-Leuchtstoffröhre, Osram GmbH, München) bzw. im Dunkeln. Platten mit V8-Saft-Agar wurden zur Anregung der Sporulation zusätzlich für 2-3 Tage einem Kälteschock (-20°C) unterzogen.

2.3.3 Konkurrenztests

Die Durchsetzungsfähigkeit von *Stagonospora*-Isolaten gegenüber anderen Pilzarten wurde mittels *in vitro*-Konkurrenztests in Plastikpetrischalen mit 8,5 cm Durchmesser untersucht. Verwendet wurden drei verschiedene Medien: Malzagar, SNA, sowie autoklavierte Schilfblätter (siehe Abschnitt 2.2.1). Als Inokulum dienten mycelbewachsene runde Malzagarstückchen

mit 8 mm Durchmesser. Die Inokulumspunkte der Kompetitoren lagen sich auf Agar jeweils paarweise im Abstand von 4 cm gegenüber (Abbildung 3 A). Die Schilfblätter wurden im feuchten Zustand zu je zwei Stück in eine Petrischale ohne Agar gelegt. Die Inokulumspunkte mit 4 mm Durchmesser wurden in 3 cm Abstand platziert. In der Randzone der Schale wurde zur Erhaltung der Feuchtigkeit zusätzlich feuchtes Filterpapier platziert und die Schalen mit Parafilm umwickelt (Abbildung 3 B). Das relativ langsam wachsende *Stagonospora*-Isolat 4/99-1 wurde zwei Tage vor den schneller wachsenden Kompetitoren inokuliert (Vorgehensweise analog zu Yuen et al., 1999). Als Kontrolle wurde nach dem gleichen Inokulationschema jeder verwendete Stamm mit sich selbst kombiniert. Für jede Kombination wurden drei Replikate angesetzt und bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach vier Wochen mit einer nochmaligen Überprüfung der Ergebnisse nach acht Wochen Inkubation.

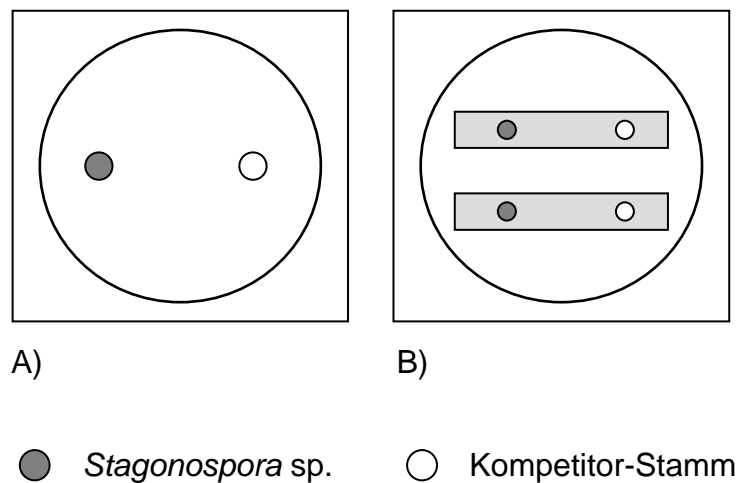


Abbildung 3: Inokulationsschema für die Konkurrenztests. A) auf Agar, B) auf Schilfblattstücken.

Die Auswertung des Wuchsergebnisses erfolgte durch Beurteilung der Koloniemorphologie bezüglich Überwachsen, Wuchshemmung und Ausbildung von Hemmhöfen und deren Einordnung in verschiedene Interaktionstypen gemäß Rayner & Webber (1984), Robinson et al. (1993) und Yuen et al. (1999). Die Beurteilung erfolgte per Auge und mittels eines Binokularmikroskopes bei Vergrößerungen bis 50x (Stereomikroskop SR, Carl Zeiss AG, Oberkochen). In Anlehnung an Yuen et al. (1999) wurde unter Vornahme von Abänderungen ein Punktesystem erstellt, bei dem jeder Art von Interaktion eine Punktzahl zugewiesen wurde (Tabelle 3). Je stärker der Einfluss von *Stagonospora* auf den Kompetitor war, desto mehr Punkte wurden für *Stagonospora* vergeben und desto weniger Punkte erhielt der Kompetitor. Auf Basis der zugeteilten Punkte wurde ein Antagonismusindex für die einzelnen Isolate berechnet.

Tabelle 3: Punktesystem zur Erstellung des Antagonismusindex. Zur Evaluierung der Interaktionen wurde ein Punktesystem erstellt (nach Yuen et al., 1999; modifiziert). Die Kategorien D1 und D2 mit jeweils 3 Punkten für *Stagonospora* bzw. den Kompetitor markieren den neutralen Interaktionsbereich. ⁺Als Hilfe zur Wiedererkennung der Interaktionstypen in Abbildung 33, Abbildung 35, Abbildung 36 und Abbildung 37 wurde jeder Interaktion zusätzlich ein Buchstabe zugeordnet. X = Typ A-G.

Interaktion	Punkte für <i>Stagonospora</i>	Punkte für Kompetitor	Typ ⁺
<i>Stagonospora</i> überwächst Kompetitor	6	0	A
<i>Stagonospora</i> hemmt und umwächst Kompetitor	5	1	B
<i>Stagonospora</i> hemmt Kompetitor	4	2	C
<i>Stagonospora</i> und Kompetitor sind gehemmt	3	3	D1
Ineinanderwachsen beider Pilze	3	3	D2
Art der Interaktion nicht eindeutig	3	3	?
Kompetitor hemmt <i>Stagonospora</i>	2	4	E
Kompetitor hemmt und umwächst <i>Stagonospora</i>	1	5	F
Kompetitor überwächst <i>Stagonospora</i>	0	6	G
Zusätzliche Barrierenbildung durch <i>Stagonospora</i> → ein Zusatzpunkt	+ 1	- 1	XB
Zusätzliche Hemmhofbildung → ein Zusatzpunkt	+ 1	- 1	XH

2.4 DNA-Präparationen

2.4.1 DNA-Präparation aus Pilzen

Die DNA-Präparation aus Pilzmycel erfolgte mit einer einfachen Methode auf Basis des Kationen-Austauschers Chelex 100, verändert nach Walsh et al. (1991) und Wirsal et al. (2002). Folgende Schritte wurden angewendet:

1. Ernte des Pilzmycels durch Abkratzen von der Malzagarplatte mit Hilfe eines sterilen Spatels.
2. Aufschluss des Mycels bei Raumtemperatur mit zwei alternativen Methoden:
 - durch Mixen mit dem Dispergiergerät Ultra Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen) in 300 µl H₂O im 2,0 ml Eppendorf-Gefäß
 - oder durch Quetschen mit einem Kunststoff-Mikropistill (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) im 1,5 ml Eppendorf-Gefäß.
3. Zugabe von 500 µl Chelex 100-Suspension (10% w/v).
4. Inkubation bei 65°C für 30-60 min, mit gelegentlichem Mischen durch Invertieren des Eppendorfgefäßes.
5. Inkubation bei 95°C für 5 min.
6. Zentrifugation 2 min ≥ 15600 g (13000 rpm).
7. Überstand aufbewahren, Lagerung bei -20°C bis zum Gebrauch.

2.4.2 DNA-Präparation aus adulten Pflanzen

Das Pflanzenmaterial wurde vor dem Aufschluss mit fließendem Leitungswasser unter mechanischer Reinigung der Oberfläche gewaschen. Der Aufschluss des adulten Pflanzenmaterials aus dem Freiland mit sehr festen Zellwänden erfolgte durch Mahlen zu feinem Pulver mit Mörser und Pistill in Gegenwart von flüssigem Stickstoff. Hierfür wurden von der gleichen Pflanze nach Organen getrennt entweder ganze Blattspreiten von 2-3 Blättern, 4-6 komplette Seitenwurzeln, 2-3 ca. 5-10 cm lange Halmabschnitte (inklusive Nodium und Internodium) bzw. ein 5-10 cm langes Rhizomstück (nach vollständiger Entfernung der Seitenwurzeln) verwendet. Die harten Teile wurden zuvor mit einer ausgeglühten Schere in kleine Stücke zerschnitten.

Alternativ wurde der Aufschluss in einer Schwingmühle MM300 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan) durchgeführt. 200-400 mg in kleine Stücke zerschnittenes Pflanzenmaterial wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen mit zwei Wolframcarbidskugeln (Durchmesser 3 mm, Qiagen, Hilden) für 30 sec bis 2 min bei einer Frequenz von 30 Schwingungen/sec geschüttelt. Dieser Aufschluss erfolgte ebenfalls unter Cryo-Bedingungen; die Probenhalter wurden zuvor mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Das Pulver wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder ohne Auftauen bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Die Extraktion der DNA aus Pflanzenmaterial erfolgte mit dem NucleoSpin Plant Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) gemäß der Anleitung für die Präparation aus Pflanzenmaterial. Das Verfahren basiert auf einer CTAB-Methode mit Bindung der DNA an eine Silika-Membran in einer Säule, Waschschritten und anschließender Elution. Die eingesetzte Menge an gemörsertem Frischmaterial betrug ≥ 100 mg.

Auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel (siehe Abschnitt 2.6) wurde überprüft, ob die extrahierten DNAs degradiert waren und ob offensichtliche Konzentrationsunterschiede vorlagen. War letzteres der Fall, wurde dies entsprechend durch Anpassung der in der PCR eingesetzten Menge (siehe Abschnitt 2.5.4) berücksichtigt.

2.4.3 DNA-Präparation aus jungen Keimlingen

Der Aufschluss einzelner junger Keimlinge für den abschnittswisen PCR-Nachweis der natürlichen Besiedlung mit *Stagonospora* (siehe Abschnitt 2.8.6, Abbildung 5) erfolgte in der Schwingmühle MM300 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan). Die Keimlingsstücke wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit einem Wolframcarbidskugeln (Durchmesser 3 mm, Qiagen, Hilden) und 200 µl Millipore-gereinigtem Wasser (Milli-Q-Wasserreinigungssystem, Millipore GmbH, Eschborn) bei 4°C für 30 bis 60 sec bei einer Frequenz von 30 Schwingungen/sec geschüttelt. Unmittelbar danach wurden 200 µl Chelex 100-Suspension (10% w/v) zugegeben. Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß den Schritten 4-7 der unter Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Chelex-Methode.

Der Aufschluss von in Gruppen zusammengefassten Keimlingen zum Nachweis des axenischen Status der Pflanzen erfolgte nach ober- und unterirdischen Abschnitten getrennt durch

Mahlen zu feinem Pulver mit Mörser und Pistill in Gegenwart von flüssigem Stickstoff. Die Extraktion erfolgte hierbei mit dem NucleoSpin Plant Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren; siehe Abschnitt 2.4.2).

2.4.4 DNA-Präparation aus Schilfsamen-Pools

Samen der verschiedenen Bodenseestandorte wurden in Pools (= vereinigte Menge) zu jeweils ca. 200 Samen zusammengefasst. Sie wurden einer Oberflächensterilisation mit sukzessive 70% EtOH/5% NaOCl/70% EtOH mit einer Dauer von 1/2/1 min in einem Volumen von je ca. 50 ml unterzogen und anschließend mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen. Der Aufschluss erfolgte in Gegenwart von flüssigem Stickstoff durch Mahlen zu feinem Pulver mittels Mörser und Pistill. Die Extraktion erfolgte gemäß Abschnitt 2.4.2 mit dem NucleoSpin Plant Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

2.4.5 DNA-Präparation aus einzelnen Schilfsamen

Einzelne Samen wurden (ohne vorherige Sterilisation) in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit 200 µl Millipore-gereinigtem Wasser (Milli-Q-Wasserreinigungssystem, Millipore GmbH, Eschborn) über Nacht bei 4°C inkubiert, um die Samen quellen zu lassen. Der Aufschluss erfolgte in denselben Gefäßen mit einem Wolframcarbidkugelchen (Durchmesser 3 mm, Qiagen, Hilden) durch Schütteln bei 4°C für 30 bis 45 sec bei einer Frequenz von 30 Schwingungen/sec mittels der Schwingmühle MM300 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan). Unmittelbar danach wurden 100 µl Chelex 100-Suspension (10% w/v) zugegeben. Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß den Schritten 4-7 der unter Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Chelex-Methode.

2.5 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) mit einer thermostabilen DNA-Polymerase (Saiki et al., 1988) ermöglicht die exponentielle *in vitro*-Vermehrung definierter DNA-Abschnitte, die Zielsequenz für spezifische Sonden („Primer“) sind. Hierdurch kann ein Organismus mit partiell bekannter Sequenz, auch wenn er nur in geringer Konzentration in Umweltproben vorkommt, kultivierungsunabhängig nachgewiesen werden (Britschgi & Giovannoni, 1991; Bruce et al., 1992). Je nach Spezifität der Sonden kann die Methode zur molekularen Unterscheidung zwischen verschiedenen – jedoch u.U. morphologisch nicht unterscheidbaren – Organismen verwendet werden. Durch die Amplifikation kann ebenfalls genügend DNA für weitere Analysen (Sequenzierung) gewonnen werden.

2.5.1 Primer

2.5.1.1 Zielbereich der PCR

Der Zielbereich der PCR im Rahmen der molekularen Pilzsystematik ist oft die ribosomale DNA (rDNA), welche für die rRNA kodiert, aus der die RNA-Untereinheiten der Ribosomen bestehen. Grundlage hierfür sind die Variabilität einzelner Abschnitte der rDNA, welche die Unterscheidung zwischen taxonomischen Einheiten ermöglichen und die besonders gute Nachweisempfindlichkeit aufgrund der hohen Kopienzahl, in der die rDNA vorliegt (White et al., 1990; Bridge, 2002). Abbildung 4 gibt in einer schematischen Übersicht die Positionen der verwendeten Primer auf der rDNA wieder. Der hier dargestellte Ausschnitt zeigt die drei konservierten Abschnitte der rDNA, die für die kleine Untereinheit (18 S), die 5,8 S- und die große Untereinheit des Ribosoms (28S) kodieren. Dazwischen liegen die „Internal Transcribed Spacer“ Bereiche (ITS 1 und ITS 2). Dies sind Bereiche, die zwar transkribiert, jedoch nicht als Ribosomen-Bausteine verwendet werden, da sie post-transkriptionell herausgespleißt werden (Hadjiolov, 1985). Sie eignen sich bei Pilzen aufgrund ihrer Variabilität für die molekulare Taxonomie von der Gattungs- bis zur Artebene (Bridge, 2002). Die in die Struktur des Ribosoms eingehenden Bereiche der 18 S, 5,8 S und 28 S rDNA sind hingegen konserviert und werden daher für die Taxonomie auf höheren Ebenen verwendet (White et al., 1990; Bridge, 2002).

Die Standard-Pilzprimer ITS1-F, ITS2, ITS3 und ITS4 setzen in konservierten Bereichen an. Die spezifischen Primer (SP) für direkte bzw. zweistufige „nested“ PCR (siehe Abschnitt 2.5.2) zum Nachweis einzelner Arten setzen in den Bereichen der variablen ITS 1 und ITS 2-Regionen an. Deren Sequenzen müssen hierzu aus vorheriger PCR und Sequenzierung mit Standard-Pilzprimern bekannt sein.

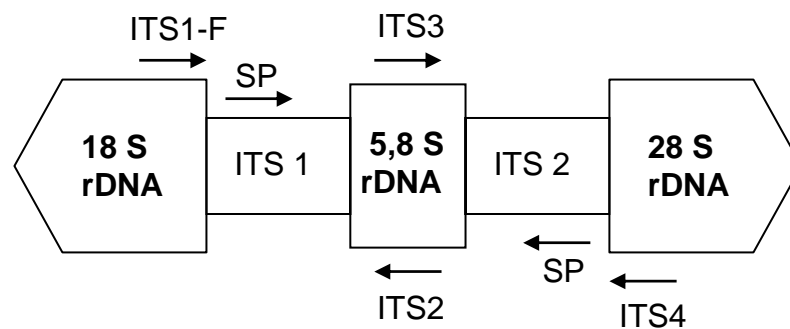


Abbildung 4: Primer-Karte, verändert nach White et al. (1990) und Gardes & Bruns (1993). Lage der allgemeinen und isolatspezifischen Pilzprimer auf dem rRNA-Gencluster. Abkürzungen: rDNA = ribosomale DNA, ITS = Internal Transcribed Spacer, SP = spezifische Primer.

2.5.1.2 Ableitung spezifischer Primersequenzen

Primer für *Phragmites australis*:

Gegen Schilf gerichtete Primer wurden anhand einer veröffentlichten ITS-Sequenz von Schilf entwickelt (Accession-Nr.: AF019810). Die Primersequenzen wurden gegen veröffentlichte ITS-Sequenzen weiterer Gräser der Familie Poaceae abgegrenzt. Dabei handelte es sich um *Anisopogon avenaceus* (AF019800), *Arundo donax* (AF019809), *Centropodia glauca* (AF019861), *Dregeochloa pumilla* (AF019853), *Festuca arundinacea* (AJ240154), *Lolium temulentum* (AJ240145).

Primer für *Stagonospora* sp. 4/99-1:

Die gegen das *Stagonospora*-Isolat 4/99-1 (Accession-Nr. AJ496625) gerichteten Primer wurden gegen die ITS-Sequenzen der *Stagonospora*-Isolate 4/99-5 (AJ496626), 4/99-18 (AJ496627), *Phaeosphaeria eustoma* (AJ496629), *Phaeosphaeria phragmiticola* CBS459.84, *Phaeosphaeria phragmitis* (AJ496631), *Phaeosphaeria pontiformis* (AJ496632), die veröffentlichte Sequenz von *Epicoccum nigrum* (AJ279448), *Epicoccum* sp. 4/99-12, *Septoria arundinacea* (AJ496628) und *Lophiostoma arundinis* (AJ496633) abgegrenzt.

Primer für *Microdochium bolleyi* 5/97-54:

Die gegen *Microdochium bolleyi* 5/97-54 (Accession-Nr. AJ279475) gerichteten Primer wurden gegen die ITS-Sequenzen von *Microdochium* sp. 5/97-16 (AJ279481), *Microdochium nivale* CBS110.94, CBS320.78, *Microdochium phragmitis* (AJ279449), *Arthrobotrys foliicola* (U51954), *Fusarium* sp. und *Arthrinium sphaeospermum* (AJ279456) abgegrenzt.

Primer für *Microdochium* 5/97-16:

Die gegen *Microdochium* sp. 5/97-16 (Accession-Nr. AJ279481) gerichteten Primer wurden gegen die ITS-Sequenzen von *Microdochium bolleyi* 5/97-54 (AJ279475), *Microdochium nivale* CBS110.94, CBS320.78, *Arthrobotrys foliicola* (U51954), *Fusarium* sp. und *Arthrinium sphaeospermum* (AJ279456) abgegrenzt.

Primer für *Trichoderma* sp. A11:

Die gegen *Trichoderma* sp. A11 (Accession-Nr. AJ279459) gerichteten Primer wurden gegen die veröffentlichten ITS-Sequenzen von *Trichoderma harzianum*-Isolaten (AF057605), *Trichoderma viride*-Isolaten (X93978, X93979), *Fusarium* spp. (AJ279455, AJ279478), *Cylindrocarpon* sp. (AJ279490), *Gliocladium* sp. (AJ279488) und *Chaetomium* sp. (AJ279466) abgegrenzt.

2.5.1.3 Primersequenzen

Die verwendeten Primer (Tabelle 4) wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg synthetisiert.

Tabelle 4: Verwendete Primer. Abkürzungen der Verwendung: K = Kontrolle der Amplifizierbarkeit, N = nested PCR, P = Populations-PCR, S = Sequenzierung.

Primer-Bezeichnung	Zielorganismus	5'-Sequenz-3'	Referenz	Verwendung
P.a.-ITS.F1	Schilf	CGG GAG GGG AGG GGA CGA AAC AGA AC	Wirsel et al., 2001/ diese Arbeit	K
P.a.-ITS.R1	Schilf	GGT ACG CCG GCA GCC CCA ACT TC	Wirsel et al., 2001/ diese Arbeit	K
ITS1-F	Höhere Pilze	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes & Bruns, 1993	P, S, (K)
ITS2	Pilze allgemein	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	White et al., 1990	S
ITS3	Pilze allgemein	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	White et al., 1990	S
ITS4	Eukaryonten	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al., 1990	P, S, (K)
4/99-1/ITS.F1	<i>Stagonospora</i> sp. 4/99-1	TGA GGA GTC CCT AAA AAG AC	Ernst et al., 2003/ diese Arbeit	N
4/99-1/ITS.R1	<i>Stagonospora</i> sp. 4/99-1	AAA AGG CTT GTG GAT GC	Ernst et al., 2003/ diese Arbeit	N
A11-ITS.F1	<i>Trichoderma</i> sp. A11	GTT GCC TCG GCG GGG TCA CG	Wirsel et al., 2001/ diese Arbeit	N
A11-ITS.R1	<i>Trichoderma</i> sp. A11	GCC GCG CTC CCG GTG CGA GTT	Wirsel et al., 2001/ diese Arbeit	N
5/97-54/ITS.F2	<i>Microdochium</i> <i>bolleyi</i> 5/97-54	GGT GCT GGA AAC AGT GCT GCC AC	diese Arbeit	N
5/97-54/ITS.R2	<i>Microdochium</i> <i>bolleyi</i> 5/97-54	GTC GTC TGG CCG GCT TGC AG	diese Arbeit	N
5/97-16/ITS.F2	<i>Microdochium</i> sp. 5/97-16	ACC CGA AAG GGT GCT GGA AG	diese Arbeit	N
5/97-16/ITS.R2	<i>Microdochium</i> sp. 5/97-16	TTG GCT ATC GTC TAG ACG TGT TCA A	diese Arbeit	N

2.5.2 Nested PCR

Die nested PCR beruht auf einem zweistufigen Prozess (Jackson et al., 1991). Hierbei erfolgt in der ersten PCR-Stufe eine Amplifikation mit Standard-Pilzprimern gegen konservierte Genbereiche, z.B. die 18 S und 28 S rDNA. In diesem Fall kamen die Primer ITS1-F und ITS4 zur Anwendung. In der zweiten PCR-Stufe wurden spezifische Primer eingesetzt, die innerhalb des Produktes der ersten Stufe binden, aber auf nicht-konservierte Genbereiche zielen (Abbildung 4), so dass zwischen verwandten Arten unterschieden werden kann. Die Produkte der ersten Stufe wurden nach starker Verdünnung in der zweiten PCR-Stufe als Template eingesetzt. Durch die Anwendung des zweistufigen Systems wird die Sensitivität und Spezifität des Nachweises im Vergleich zur einstufigen PCR mit direktem Einsatz der spezifischen Primer erhöht (Jackson et al., 1991).

2.5.3 Nachweisgrenzenbestimmung

Zur Abschätzung der Empfindlichkeit des nested PCR Verfahrens beim Nachweis von *Stagonospora* sp. 4/99-1 in Umweltproben wurde die Nachweisgrenze der nested PCR bestimmt. Hierbei wurde eine definierte Konzentration genomischer DNA von *Stagonospora* 4/99-1 sukzessive in 1:5-Schritten in einem konstant gehaltenen Hintergrund von 80 ng genomischer Wirts-DNA verdünnt. Die hierfür verwendete Schilf-DNA wurde aus axenischen, d.h. pilzfreien Pflanzen aus sterilen Mikrokosmen extrahiert (siehe Abschnitte 2.4.3 und 3.3.1). Das Vorgehen erfolgte ebenfalls mit dem zweistufigen Amplifikationssystem (siehe Abschnitt 2.5.2).

2.5.4 Reaktionsansätze

Die Reaktionsvolumina betragen 20 bzw. 25 µl in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen bzw. Mikrotiterplatten. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten für die verschiedenen PCR-Stufen und Zielorganismen sind in Tabelle 5 angegeben. Das Volumen der genomischen DNA als Template (Matrize) für die Reaktionen mit den Standard-Pilzprimern wurde entsprechend der aus der DNA-Präparation erhaltenen Konzentration variiert und betrug zwischen 0,5 und 5 µl. Zur Minderung der Effekte möglicher, inhibitorisch wirkender Fremdstoffen und zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit der PCR wurde immer BSA (Rinderserumalbumin) zum Reaktionsgemisch zugesetzt (Hernandez et al., 1999; Kageyama et al., 2003). Das verwendete Wasser wurde zuvor durch ein Milli-Q-Wasserreinigungssystem (Millipore GmbH, Eschborn) gefiltert und autoklaviert.

Tabelle 5: Komponenten für die PCR. Das Endvolumen von 20 bzw. 25 µl wurde durch Auffüllen des Reaktionsgemisches mit Millipore-gereinigtem Wasser erreicht.

Endkonzentration		Ansatz/Primer für			
		<i>Phragmites australis</i> , direkte PCR	Standard-Pilz-Primer, direkte PCR	<i>Stagonospora</i> sp. 4/99-1, nested PCR	<i>Trichoderma</i> sp. A11, nested PCR
Komponente	BSA	0,5 mg/ml			
	Reaktionspuffer, 10x	1x (Fermentas), mit (NH ₃) ₂ SO ₄		1x (MWG)	1x (Fermentas), mit (NH ₃) ₂ SO ₄
	MgCl ₂	2,0 mM			1,5 mM
	dNTP-Gemisch	0,2 mM			
	Primer 1	0,25 µM			0,125 µM
	Primer 2	0,25 µM			0,125 µM
	<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,05 U/µl (Fermentas)		0,05 U/µl (MWG)	0,05 U/µl (Fermentas)
	Template, Art u. Anteil am Reaktionsvolumen	Genomische DNA, 1/100	Genomische DNA, 1/50 bis 1/5	Produkt aus 1. PCR-Stufe, 1/100	

2.5.5 PCR-Programme

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurden sämtliche PCR-Reaktionen mit einem „hot start“ begonnen, d.h. die Reaktionsansätze wurden erst in den Heizblock gestellt, nachdem dieser eine Temperatur von 94°C erreicht hatte. Zur Erhöhung der Spezifität bestanden die meisten Programme aus zwei Abschnitten, bei denen im ersten Abschnitt die Annealing-Temperatur von höheren Werten auf den gewünschten Endwert abgesenkt wurde („Touch down“) und im zweiten Abschnitt die weitere Amplifikation bei der Zieltemperatur stattfand. Die von höheren Temperaturen aus erfolgende Annäherung an die gewünschte Annealing-Temperatur dient zur Vermeidung vorzeitiger unspezifischer Bindungen der Primer an DNA-Sequenzen, die nicht Zielbereich der Primer sind (Tabelle 6, Tabelle 7, Tabelle 8).

Tabelle 6: PCR mit spezifischen Primern für *Phragmites australis* bzw. mit Standard-Pilzprimern aus genomischer Pilz-DNA und aus Umweltproben.

Schritt	Vorgang	Zielorganismus					
		<i>Phragmites australis</i>		genomische Pilz-DNA		genomische Pilz-DNA in Umweltproben	
		Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
1	Vordenaturierung	94°C	2 min 30 sec	94°C	2 min 30 sec	94°C	2 min 30 sec
2	Denaturierung	94°C	30 sec	94°C	30 sec	-	-
3	Annealing, Touch down	68°C -1°C/Zyklus	30 sec	70°C -1°C/Zyklus	15 sec	-	-
4	Elongation	72°C	30 sec	72°C	45 sec +1sec/ Zyklus	-	-
5	Wdh. Schritte 2-4	-	9x	-	14x	-	-
6	Denaturierung	94°C	30 sec	94°C	30 sec	94°C	30 sec
7	Annealing	58°C	30 sec	55°C	15 sec	55°C	15 sec
8	Elongation	72°C	30 sec +1sec/ Zyklus	72°C	45 sec +1sec/ Zyklus	72°C	45 sec +1sec/ Zyklus
9	Wdh. Schritte 6-8	-	29-39x	-	39x	-	39x
10	Abschließende Elongation	72°C	10 min	72°C	10 min	72°C	10 min
11	Kühlen und Lagerung	2-4°C	-	2-4°C	-	2-4°C	-

Die PCR-Reaktion mit Standard-Pilzprimern aus Umweltproben („Populations-PCR“) wurde analog der PCR für genomische Pilz-DNA, jedoch bei konstanter Annealing-Temperatur ohne „Touch down“ mit insgesamt 40 Reaktionszyklen durchgeführt, um keine der im Gemisch vorliegenden Zielsequenzen der verschiedenen Pilze zu bevorzugen.

Die PCR-Reaktion aus genomischer Pilz-DNA aus Reinkulturen wurde zur Erzeugung von Fragmenten für die Sequenzierung durchgeführt.

Tabelle 7: Nested PCR mit spezifischen Primern für *Stagonospora* sp. 4/99-1 bzw. für *Trichoderma* sp. A11.

Schritt	Vorgang	Zielorganismus			
		<i>Stagonospora</i> sp. 4/99-1		<i>Trichoderma</i> sp. A11	
		Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
1	Vordenaturierung	94°C	2 min	94°C	2 min 30 sec
2	Denaturierung	94°C	30 sec	94°C	30 sec
3	Annealing, Touch down	75°C -1°C/Zyklus	15 sec	78°C -1°C/Zyklus	15 sec
4	Elongation	72°C	30 sec	72°C	30 sec
5	Wdh. Schritte 2-4	-	9x	-	9x
6	Denaturierung	94°C	30 sec	94°C	30 sec
7	Annealing	65°C	15 sec	68°C	15 sec
8	Elongation	72°C	30 sec +1sec/Zyklus	72°C	30 sec
9	Wdh. Schritte 6-8	-	39x	-	39x
10	Abschließende Elongation	72°C	10 min	72°C	10 min
11	Kühlen und Lagerung	4°C	-	2-4°C	-

Tabelle 8: Nested PCR mit spezifischen Primern für *Microdochium* spp. Die zur Erlangung der erforderlichen Primerspezifität nötige Annealing-Temperatur liegt genau im bzw. über dem Optimumsbereich der *Taq*-DNA-Polymerase. Daher wurden die Schritte Annealing und Elongation zusammengefasst.

Schritt	Vorgang	Zielorganismus			
		<i>Microdochium</i> sp. 5/97-16		<i>Microdochium bolleyi</i> 5/97-54	
		Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
1	Vordenaturierung	94°C	2 min	94°C	2 min
2	Denaturierung	94°C	30 sec	94°C	30 sec
3	Annealing und Elongation, Touch down	77°C -1°C/Zyklus	45 sec	82°C -1°C/Zyklus	45 sec
4	Wdh. Schritte 2-3	-	4x	-	4x
5	Denaturierung	94°C	30 sec	94°C	30 sec
6	Annealing und Elongation	72°C	45 sec +1sec/Zyklus	77°C	45 sec +1sec/Zyklus
7	Wdh. Schritte 5-6	-	39x	-	39x
8	Abschließende Elongation	72°C	10 min	77°C	10 min
9	Kühlen und Lagerung	4°C	-	4°C	-

2.5.6 PCR-Geräte

Für PCR und Sequenzierung wurden folgende Geräte verwendet:

- Programmable Thermal Controller PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts, USA).
- Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf Mastercycler Personal (Eppendorf AG, Hamburg).

2.5.7 Auswertung der PCR aus Umweltproben

Die Auswertung von PCR-Ergebnissen aus Umweltproben für die Darstellung der Nachweis-häufigkeit eines Pilzes bzw. für statistische Analyseverfahren erfolgte nach der Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe Abschnitt 2.6) durch die Zuordnung und Tabellierung der erhaltenen Signale nach dem System 1 = Signal, 0 = kein Signal im Agarose-Gel.

2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Überprüfung der Ergebnisse von DNA-Präparation, PCR und PCR-Produktreinigung erfolgte durch Agarose-Gel-Elektrophorese (Sambrook & Russell, 2001).

Als Auftragspuffer wurde eine 6x Bromphenolblau-Lösung mit einer Konzentration von 0,25% (w/v) Bromphenolblau und 30% (v/v) Glycerin verwendet. Die Mischung des Puffers mit den DNA-Proben erfolgte im Verhältnis 1:6. Die Agarose-Konzentration (Neo; Roth, Karlsruhe) der Gele betrug 0,8% (w/v) für genomische DNA und 2% für PCR-Fragmente. Als Lauf- und Gelpuffer wurde 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM Acetat, pH 8,3, 2 mM EDTA) verwendet. Es wurden Spannungen von 9-13 Volt/cm Gellänge angelegt. Als Molekulargewicht-Standards dienten 100 bp- und 1 kb-Leitern (Fermentas, St. Leon-Rot).

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Anfärbung der DNA in einer 1 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung auf einem Schüttler für 20-30 min inkubiert und anschließend kurz mit Wasser gewaschen. Die gefärbten Gele wurden mit dem Video-Dokumentationssystem Gel Doc 1000 (BioRad Laboratories GmbH, München) und dem Programm Multi-Analyst 1.0.2 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) unter UV-Licht dokumentiert.

2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde zur molekularen Identifizierung von Pilzen aus Reinkulturen und zur Überprüfung der Identität von nested PCR-Produkten verwendet. Zielbereich der Sequenzierung war die ribosomale DNA. Das Sequenzierungsprinzip beruht auf der Didesoxykettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977; Sanger, 1981). Hierbei erfolgt durch den Einbau von im Nukleotidgemisch vorhandenen Didesoxynukleotiden ein statistisch zufallsmäßig verteilter Abbruch der Elongation der DNA-Strangsynthese. Die daraus resultierenden Produkte sind von verschiedener Größe. Sie können aufgrund der Kopplung an einen für jede Base spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff nach elektrophoretischer Auftrennung in einer Gel-Matrix nach Anregung durch einen Laser mittels eines Detektors erfasst und unterschieden werden (Applied Biosystems, 2000).

2.7.1 Reinigung und Quantifizierung von PCR-Produkten

Die Reinigung der PCR-Produkte zur Entfernung der Reagentien erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden), bzw. dem E.Z.N.A. Cycle Pure-Kit (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gemäß den Anweisungen der Hersteller. Die Methode basiert auf einer Bindung der DNA an eine Silika-Membran in einer Säule unter Hochsalzbe-

dingungen, gefolgt von Waschschritten in Gegenwart von Ethanol und abschließender Elution unter Niedrigsalzbedingungen. Die gereinigten PCR-Produkte wurden nach erneuter Auftrennung auf einem Agarose-Gel (siehe Abschnitt 2.6) zur Überprüfung der Ausbeute mit dem oben beschriebenen Video-Dokumentationssystem dokumentiert. Die DNA-Menge bzw. -Konzentration wurde mittels des Vergleiches der Bildpixel-Sättigungsdichte mit ebenfalls aufgetragenen Standards definierter Menge mit dem Programm Multi-Analyst Version 1.0.2 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) ermittelt.

2.7.2 Sequenzierungsreaktion

Für die Sequenzierung von aus genomischer Pilz-DNA erhaltenen PCR-Fragmenten wurden die Primer ITS1-F, ITS2, ITS3 und ITS4 verwendet (siehe auch Tabelle 4). Die Sequenzierung von nested PCR-Produkten erfolgte mit den Primern ITS2 und ITS3. Zur Sequenzierung wurde das Big Dye Terminator Cycle-Sequencing-Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems; Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) verwendet. Die Sequenzierungsreaktion wurde in 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäßen mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt. Als Templates dienten PCR-Fragmente (Tabelle 9, Tabelle 10).

Tabelle 9: Reaktionsansätze für die Sequenzierung.

Endkonzentration bzw. absolute Menge		Verwendetes Kit	
		Big Dye, Versionen bis 2.0	Big Dye, Version 3.1
Komponente	Big Dye-Mix	3 µl	1,5 µl
	Reaktionspuffer	-	1,0 µl
	Primer (10 µM)	0,4 µl	0,5 µl
	Wasser	Auffüllen auf 10 µl	Auffüllen auf 10 µl
	Template	45-90 ng	50 ng

Tabelle 10: Sequenzier-Programme.

		Verwendetes Kit			
		Big Dye, Versionen bis 2.0		Big Dye Version 3.1	
Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
1	Vordenaturierung	-	-	95°C	1 min 10 sec
2	Denaturierung	96°C	15 sec	95°C	20 sec
3	Annealing	50°C	15 sec	50°C	30 sec
4	Elongation	60°C	4 min	60°C	4 min
5	Wdh. Schritte 2-4	-	24x	-	24x
9	Kühlen und Lagerung	4°C	-	2°C	-

2.7.3 Sequenzanalyse

Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden auf einem automatischen Sequenzierungssystem ABI377 bzw. ABI3730 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA, USA) durch die Firma GATC Biotech AG, Konstanz, analysiert.

Die Bearbeitung der Sequenzen erfolgte durch Zusammensetzung im Programm SeqManII Version 5.07 von DNASTAR Inc. (Madison, WI, USA). Die daraus erhaltenen Consensus-Sequenzen wurden für die BLAST-Suche (BlastN, non-redundant, Altschul et al., 1997; Internetseite: <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) in Datenbanken eingesetzt. Hieraus erhaltene BLAST-Treffer mit den höchsten Übereinstimmungen zu den untersuchten Sequenzen wurden als Referenz-Sequenzen für die Erstellung von Phylogenien verwendet.

2.7.4 Molekulare Phylogenie

Für *Stagonospora* und *Phaeosphaeria* wurde die paarweise Ausrichtung von Sequenzen mit dem Martinez/Needleman-Wunsch-Programm im Modul MegAlign Version 5.03 des DNASTAR Inc. Softwarepaketes (Madison, WI, USA) durchgeführt. Molekulare Phylogenien wurden mit dem ClustalW-Programm, ebenfalls in MegAlign bzw. mit dem BioNJ-Algorithmus im Programm PAUP Version 4.0.b10 (Swofford, 2000) und dem Kimura 2 Parameter zur Distanzmessung erstellt. Die Konfidenz des Stammbaumes wurde mit 1000 Bootstrap-Wiederholungen überprüft.

Für *Microdochium* wurde ein Alignment (Ausrichtung der Sequenzen) ebenfalls primär in MegAlign erzeugt. Die Enden wurden auf eine Länge von 471 bp glatt getrimmt und das Alignment in Clustal X (Thompson et al., 1997) importiert. Dort wurde das Alignment weiter optimiert und eine Neighbor-Joining Analyse durchgeführt. Die erhaltenen Verzweigungen wurden mit 1000 Bootstrap-Wiederholungen überprüft.

2.7.5 Überprüfung von nested PCR-Ergebnissen

Produkte von nested PCR-Reaktionen aus Matritzen-DNAs von verschiedenen Pflanzenteilen wurden stichprobenartig mit den Primern ITS2 und ITS3 sequenziert. Durch BLAST-Suche bzw. durch Zusammensetzung im Programm SeqManII Version 5.07 von DNASTAR Inc. (Madison, WI, USA) wurde ihre Identität mit den Sequenzen der Zielpilze verglichen.

2.7.6 Einreichung von Sequenzen in Datenbanken

Im Rahmen dieser Arbeit erzeugte Pilz-ITS-Sequenzen sind in der EMBL Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) unter den Accession-Nummern AJ496625 bis AJ496633 zugänglich (siehe auch Tabelle 13).

2.8 Pflanzenanzucht, Mikro- und Makrokosmen

Zur Untersuchung des Einflusses definierter einzelner Pilzisolat auf Schilf unter Ausschluss von Störungen durch die Anwesenheit weiterer Pilze wurden Mikrokosmen mit axenischen Schilfpflanzen etabliert. Die hierfür benötigten Pflanzen wurden aus Samen angezogen.

2.8.1 Erzeugung steriler Keimlinge

Die Oberflächensterilisation der Schilfsamen erfolgte mit einer Kombination von sukzessive 70% EtOH/5% NaOCl/70% EtOH bei einer Dauer von je 5 min pro Schritt, gefolgt von drei Waschschritten in sterilem dest. Wasser mit je 5 min Dauer. Die Behandlung des kommerziellen gedroschenen Saatgutes erfolgte in 0,1-0,15 Gramm-Aliquots in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen mit je 1 ml Flüssigkeit. Die Behandlung des nicht gedroschenen, also noch mit Fruchthülle und Flughaaren versehenen Saatgutes von Bodensee-Standorten erfolgte in gleicher Weise in 0,1-0,2 Gramm-Aliquots in 13 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit je 10 ml Flüssigkeit.

Die Wahl dieser Methode erlaubte bei dem kommerziellen Saatgut eine zuverlässige Abtötung aller Pilze bei noch ausreichender Keimungsfähigkeit. Das Saatgut von Bodensee-Standorten wurde zusätzlich einer Behandlung mit dem Fungizid Triforin („Saprol neu“, Cyanamid Agrar GmbH & Co. KG, Schwabenheim) mit einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml durch Applikation im Gießwasser unterzogen, um die noch überlebenden Pilze zu eliminieren (Dr. Tsutomu Arie, Laboratory of Plant Pathology, Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT), Japan, persönliche Mitteilung; siehe Tabelle 11). Das Saatgut wurde auf autoklavierter Erde (siehe Abschnitte 2.8.2 und 2.8.4.2) und zur Kontrolle zusätzlich auf Malzagar ausgelegt.

2.8.2 Inkubationsbedingungen für die Keimlingsanzucht

Das Saatgut wurde auf autoklavierter (siehe Abschnitt 2.8.4.2) Gartenerde (Gebrüder Patzer GmbH, Sinnpal-Jossa) in Glaspetrischalen (20 cm Durchmesser, 5 cm Höhe) mit je ca. 300 Samen pro Schale ausgelegt. Die Inkubation erfolgte mit einem Zyklus von 16 Std. Licht bei 24°C und 8 Std. Dunkelheit bei 20°C in heiz- und kühlbaren Lichtthermostatschränken (Ernst Schütt jun. Laborgerätebau, Göttingen). Als Lichtquelle diente eine 400 Watt-Quecksilberdampf Lampe HQL (MBF-U; Osram, Deutschland). Im Inkubationsbereich der Petrischalen wurde eine Lichtintensität von $120 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$ gemessen. Unter sterilen Bedingungen wurde alle zwei Wochen steriles destilliertes Wasser zugefügt, um das Substrat gut feucht zu halten.

2.8.3 Überprüfung der Sterilität

Die Sterilität der Keimlinge für Mikrokosmos-Experimente wurde 24 Tage nach dem Auslegen des Saatgutes durch zwei verschiedene Methoden überprüft:

Die mikrobiologische Kontrolle erfolgte durch Auslegen von Gewebeproben zufallsmäßig ausgewählter, unter sterilen Bedingungen geernteter Keimlinge auf Malzagar.

Die molekularbiologische Kontrolle erfolgte durch PCR mit den Standardpilzprimern ITS1-F und ITS4 an DNA, die aus den Keimlingen präpariert wurde. Hierbei wurden die Keimlinge in Pools zu je 20 zusammengefasst. Die oberirdischen grünen Teile und die Wurzeln der Keimlinge wurden jedoch getrennt bearbeitet.

Die Sterilitätskontrolle des verwendeten Erd-Substrates nach dem Autoklavieren (siehe Abschnitt 2.8.4.2) erfolgte durch Animpfen von Malzagarplatten mit Erdproben.

2.8.4 Mikrokosmen

2.8.4.1 Substrat

Als Substrat für die Mikrokosmos-Experimente wurde ein 1:1:1 Gemisch aus Gartenerde (Gebrüder Patzer GmbH, Sinnpal-Jossa), lehmigem Ton (Bauamt Konstanz) und Sand mit Korngröße 0-8 mm (Meichle & Mohr GmbH, Konstanz) verwendet.

2.8.4.2 Sterilisation, Behälter

Das Substrat wurde 2 x 90 min bei 121°C unter Verwendung eines Meßfühlers zur Temperaturkontrolle autoklaviert. Zwischen den beiden Autoklaviervorgängen lagen zwei Tage Ruhezeit, um eventuell überlebende, ruhende und durch den Vorgang zur Keimung angeregte Sporen beim zweiten Autoklavieren abzutöten. Als Gefäße dienten Glaspetrischalen (20 cm Durchmesser, 5 cm Höhe) mit einer Befüllung von 500 ml Substrat und 120 ml destilliertem Wasser je Schale bzw. 2 l Plastikbecher (14 cm Durchmesser, 18,5 cm Höhe) mit einer Befüllung von 1,2 l Substrat und 300 ml dest. Wasser. Die Plastikbecher wurden mit einer Glasschale bedeckt. Sie weisen keine Drainageöffnung auf und sind im folgenden als „Töpfe“ bezeichnet.

2.8.4.3 Pikieren

Die für die axenischen Mikrokosmen verwendeten Keimlinge wurden nach 50 Tagen Anzucht in Glasschalen unter sterilen Bedingungen in die Töpfe mit Glasdeckel umgesetzt. In jeden Topf wurden 3-4 Keimlinge eingesetzt.

2.8.4.4 Inokulation

Die Inokulation erfolgte beim 1. Experiment mit kommerziellem Saatgut 30 Tage nach dem Pikieren. Beim 2. Experiment mit Saatgut vom Bodensee wurde direkt nach dem Pikieren inokuliert. Das pilzliche Inokulum bestand aus 20 mycelbewachsenen Malzagarstückchen (ca. $0,5 \text{ cm}^2$) je Topf, die in einem Abstand von mindestens 1-2 cm zu den Pflanzen auf die Erdoberfläche gelegt wurden. Jeder Ansatz bestand aus 4 Töpfen mit je 3-4 Keimlingen.

2.8.4.5 Inkubation

Die Inkubation der Mikrokosmen erfolgte in Pflanzschränken bei 22-25°C mit 16 Std. Licht- und 8 Std. Dunkelphase. Die Beleuchtung erfolgte durch 10 Universal-Weißlicht-Leuchtstoffröhren (Osram L58W/25) je Schrank. Die gemessenen Lichtintensitäten betragen auf Bodenhöhe $55-60 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Die Positionen der Töpfe wurden alle zwei Wochen zufallsmäßig zwischen den drei verwendeten Pflanzschränken gewechselt. Steriles destilliertes Wasser (ohne Dünger oder Fungizide) wurde nach Bedarf gegossen, um das Substrat gut feucht zu halten. Zu Beginn des Experimentes waren die Töpfe mit Glasschalen überdeckt; nach 6 Wochen wurden diese durch durchsichtige Plastiktüten mit 30 cm Breite und 66 cm Höhe ersetzt. Die Inkubationsdauer zwischen Inokulation und Ernte betrug bis zu 5 Monate.

2.8.4.6 Auswertung der axenischen Mikrokosmen

Vor der Ernte der Pflanzen wurden Proben von Wurzeln und oberirdischen grünen Teilen der Pflanzen genommen, um die Vitalität, Anwesenheit und Ausbreitung der inokulierten Pilze durch Reisolierung zu überprüfen. Sie wurden einer Oberflächensterilisation mit sukzessive 70% EtOH/5% NaOCl/70% EtOH mit einer Dauer von 1/2/1 min je Schritt unterzogen, gefolgt von mehrfachen Waschschrritten in sterilem dest. Wasser für je 5 min. Eine weitere Serie wurde nur mit sterilem destillierten Wasser gewaschen. Pro Ansatz wurden drei Pflanzen partiell beprobt, deren Teile nach der Behandlung in je 10 Stücke pro Abschnitt und Pflanze zerschnitten und auf Malzagar ausgelegt wurden. Die Platten wurden bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Zusätzliche Proben wurden für mikroskopische Untersuchungen genommen. Im Vergleich zur Gesamtbiomasse war die Probenmasse vernachlässigbar.

Zur Erfassung der Wachstumsparameter wurde die Größe der Pflanzen und ihre Trockenmasse bestimmt. Hierfür wurde die Länge jedes Halms der einzelnen Pflanzen ausgemessen und die Anzahl der Sprosse pro Pflanze bestimmt. Die Halmlänge ist definiert als Länge des Sprosses zwischen der Erdoberfläche und dem Insertionspunkt (Übergang zwischen Blattscheide und Blattspreite) des obersten voll entfalteten Blattes.

Die Bestimmung der Trockenmasse der geernteten Mikrokosmospflanzen erfolgte nach vorgehender zweitägiger getrennter Trocknung der ober- und unterirdischen Teile bei 80°C.

2.8.5 Makrokosmen

Zur Untersuchung etwaiger Wirkungen von *Stagonospora* auf Schilf unter Freilandbedingungen im Vergleich zu axenischen Mikrokosmen wurde ein Makrokosmos-Experiment durchgeführt.

2.8.5.1 Anzucht

Keimlinge aus oberflächensterilisiertem kommerziellem Saatgut wurden in Glaspetrischalen mit Lehmerde-Substrat (siehe Abschnitt 2.8.4.1) angezogen (siehe Abschnitte 2.8.1 und 2.8.2). Die Inokulation mit *Stagonospora* 4/99-1 erfolgte (gemäß Abschnitt 2.8.4.4) 5 Wochen nach der Aussaat. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Inokulation. Die weitere Inkubation erfolgte im Pflanzschrank (gemäß Abschnitt 2.8.4.5). 10 Wochen nach der Aussaat wurden die Deckel der Glasschalen durch Plastiktüten ersetzt, um den Pflanzen weiteren Entwicklungsraum zu geben. Im Alter von drei Monaten wurden die Schutzhauben (Plastiktüten) entfernt, die Pflanzen zunächst in ein Kalt-Gewächshaus und schließlich im Freien an einen schattigen Platz gestellt, um die Pflanzen an die Bedingungen im Freiland zu akklimatisieren. Die Ausbringung in den Freilandversuch erfolgte im Juli 2002, 6 Monate nach der Aussaat.

2.8.5.2 Dämpfung des Substrates

Die Erdmenge (Lehmerde-Substrat, siehe Abschnitt 2.8.4.1) für den Versuch betrug ca. 4 m³ und wurde als langgestreckter Haufen mit einer Plastikfolie überdeckt und von einem zentral eingelegtem Dampfrohr aus mit Heißdampf durchströmt. Die Dämpfung erfolgte für 10 Std. bei 85-90°C (Temperatur der Erdmasse). Das Ergebnis der Dämpfung wurde durch Ausplattierung von Verdünnungsreihen auf Malzagar mit Ampicillin und Streptomycin (siehe Abschnitt 2.2.1) überprüft. Hierzu wurden von verschiedenen Stellen des gedämpften Erdhaufens Proben entnommen und je 1 g Erde mit sterilem Wasser in sukzessiven Schritten von 1:10 (w/v) über 1:100 (v/v) bis 1:1000 (v/v) verdünnt und jeweils 100 µl der Suspension ausplattiert.

2.8.5.3 Freilandanlage

Die Freilandanlage bestand aus drei Kunststoffbecken (150 cm lang, 126 cm breit, 49 cm tief, Abbildung 26, Abbildung 27) je Ansatzreihe. Die Reihen waren räumlich durch 5 m Abstand getrennt. Die Becken wurden zuunterst mit ca. 10 cm grobem Kies (Korngröße 16-32 mm) mit eingelegtem Drainagerohr befüllt. Darüber wurde auf einer Trennschicht aus Folie 30 cm gedämpftes Lehmerdesubstrat (siehe 2.8.4.1) eingebracht. Die Becken verfügten über ein Drainagesystem mit einem drehbaren Stutzen zur Regulation des Wasserstandes. Dieser wurde auf das Niveau der Substratoberfläche eingestellt. Die Bepflanzung erfolgte mit je 20 Schilfpflanzen pro Becken, somit insgesamt 60 Pflanzen pro Versuchsvariante. Für die Bepflanzung der Becken wurden aus beiden Ansatzreihen nur die größten und kräftigsten Pflanzen ausgewählt. Vor der Ausbringung ins Freiland wurde die Anwesenheit des inokulierten Pilzes in den

Pflanzen bzw. dessen Abwesenheit in den Pflanzen der nicht-inokulierten Kontrolle durch Reisolierung aus Wurzel- bzw. Rhizomstücken auf Malzagar überprüft.

Bei der Auspflanzung wurden die Pflanzen der mit *Stagonospora* besiedelten Versuchsvariante zusätzlich inokuliert durch Gabe von ca. 15 mycelbewachsenen Malzagarstückchen von je ca. 0,5 cm² in jedes Pflanzloch in direktem Kontakt zu den Wurzeln. Diese Inokulation erfolgte in drei Tiefenzonen (oberflächennah, mittlere Tiefe, sowie im unteren Bereich der Wurzeln). Es erfolgte keinerlei Düngung, weder bei der Pflanzenanzucht, noch im Freiland.

Am Ende der ersten Vegetationsperiode wurde im Oktober durch Isolierung überprüft, ob *Stagonospora* und weitere, über den Luftweg eingetragene Pilze in der Freilandanlage vorhanden waren. Hierzu wurden je 3 Wurzeln und 3 Rhizome von 6 verschiedenen Pflanzen je Ansatzreihe zunächst mit Leitungswasser, anschließend mit sterilem destilliertem Wasser gespült und auf Malzagar mit Ampicillin/Streptomycin (siehe Abschnitt 2.2.1) ausgelegt.

2.8.6 Detektion von *Stagonospora* in Keimlingen mit natürlicher Pilzbefruchtung

Zur Überprüfung der Vitalität der samenbürtigen Pilze, bzw. ihrer Fähigkeit, die aus den Samen wachsenden Pflanzen zu besiedeln, wurden Schilfkeimlinge aus Samen mit natürlicher Pilzbefruchtung angezogen. Samen vom Bodenseestandort Reichenau, überschwemmt, die im November 2001 geerntet wurden, wurden nach 4 Wochen trockener Lagerung einer Oberflächensterilisation mit sukzessive 70% EtOH/5% NaOCl/70% EtOH mit einer Dauer von 1/2/1 min je Schritt unterzogen. Bei einer Kontrolle wurde ohne Vorbehandlung (nur 3x Waschen in sterilem Wasser) in Glaspetrischalen mit steriler Lehmerde (siehe Abschnitt 2.8.4.1) ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei den unter Abschnitt 2.8.4.5 beschriebenen Bedingungen. Nach 5 Wochen Wachstum wurden die Deckel der Glasschalen durch Plastiktüten ersetzt. Die Ernte der Keimlinge erfolgte nach 9 Wochen Wachstum. Aus jeder Gruppe wurden 21 Keimlinge geerntet und in drei Teile zerschnitten. Die Wurzeln, die unteren und oberen grünen Teile jedes Keimlings wurden getrennt verarbeitet, wobei das Hypokotyl mit den Samenresten verworfen wurde (siehe Abbildung 5).

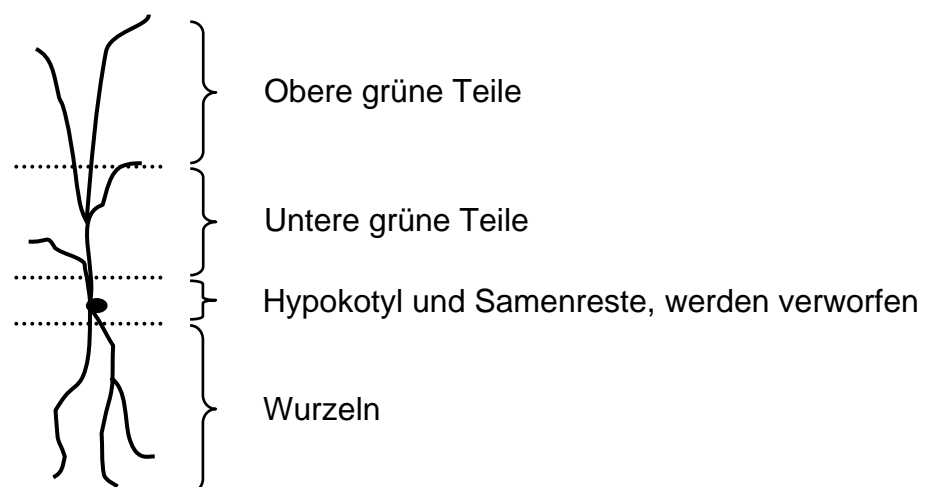


Abbildung 5: Aufbereitung der Keimlinge mit natürlicher Pilzbefruchtung.

Die erhaltenen Proben wurden weiter für DNA-Präparationen und Immunolokalisationsuntersuchungen (siehe Abschnitt 2.9) eingesetzt. Die DNA-Präparation erfolgte gemäß Abschnitt 2.4.3. Die resultierenden DNA-Proben wurden nested PCR-Tests auf *Stagonospora* 4/99-1 unterzogen.

In einem weiteren Versuch wurden Keimlinge aus Saatgut vom November 1998 von Reichenau (überschwemmtes Habitat) nach Oberflächensterilisation mit der oben beschriebenen Methode auf Malzagar, bzw. in autoklavierter Erde angezogen. Aus den Keimlingen wurde DNA präpariert und ein PCR-Test mit den Standard-Pilzprimern ITS1-F und ITS4 durchgeführt. Die daraus erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert. Das hierfür verwendete Material wurde in Pools zu je 15 ganzen Keimlingen von Malzagar bzw. die oberirdischen Teile von in Erde gewachsenen Keimlingen zusammengefasst.

2.9 Immunolokalisation von *Stagonospora*

Der mikroskopische Nachweis diente zur genauen Lokalisierung von *Stagonospora* 4/99-1 im Pflanzengewebe, nachdem dieser in Keimlingen und Mikrokosmospflanzen durch PCR bzw. Reisolierung nachgewiesen wurde.

2.9.1 Herstellung von Antikörpern gegen *Stagonospora*

Stagonospora 4/99-1 wurde in 400 ml RNT-Flüssigmedium 6 Tage unter Schütteln mit 130 rpm bei RT angezogen. Das Mycel wurde unter Wasserstrahl-Vakuum auf einem Papierrundfilter (Macherey-Nagel, Düren) im Büchnertrichter geerntet und mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Mycel unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinem Pulver gemahlen. 5 ml steriles destilliertes Wasser wurden pro ml Mycel-Pulver zugefügt und als 500 µl-Aliquots bei -20°C gelagert.

Ein weibliches Kaninchen der Rasse „SPF New Zealand White Rabbit“ wurde mit einem Aliquot unter Beimischung von 500 µl komplettem Freund Adjuvanz (85% (v/v) Paraffinöl, 15% Mannidmonooleat, mit 0,1% (w/v) abgetöteten *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; nach Freund & McDermott, 1942) immunisiert. Anschließend erhielt das Tier in zweiwöchentlichen Abständen drei „Boosts“ (Auffrischungen) aus Mycel-Aliquots und 500 µl inkomplettem Freund Adjuvanz (85% (v/v) Paraffinöl, 15% Mannidmonooleat, ohne Mycobakterien). Die Serumentnahme erfolgte 26 Tage nach der dritten Auffrischung.

Eine Präadsorption des Serums wurde mit Mycelien nicht-verwandter Pilze durchgeführt, um die Antikörper zu reinigen. Zu diesem Zweck wurde Mycelpulver von den aus Schilf stammenden Pilzisolaten *Arthrinium* sp. 6/97-11, *Cylindrocarpon* sp. 5/97-12, *Sclerotinia* sp. 5/97-19, *Cladosporium herbarum* 315W und *Microdochium bolleyi* 5/97-54 (siehe Tabelle 2) und Wurzeln der Wirtspflanze (Schilf) hergestellt. Einem homogenen Gemisch dieses Pulvers wurde ein gleiches Volumen PBS (pH 7,2) zugefügt und autoklaviert. Anschließend wurde diese Suspension bei Raumtemperatur 1 min mit >16000 g (14000 rpm) zentrifugiert. Die Se-

dimente wurden durch Resuspendierung und erneutes Zentrifugieren bei >16000 g drei Mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Die Lagerung der so erhaltenen Pellets erfolgte bei -20°C. Die Präadsorption wurde unmittelbar vor dem Mikroskopieren durch Mischung von einem Volumen Serum mit einem halben Volumen PBS und einem halben Volumen gereinigtem Mycelgemisch der nicht-verwandten Pilze durchgeführt. Die Inkubation erfolgte 10 min bei Raumtemperatur, gefolgt von 10 min Zentrifugation bei >16000 g. Die daraus erhaltenen Überstände wurden für die Mikroskopie eingesetzt.

2.9.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Vorbereitung der Pflanzengewebeproben bestand in der Fixierung bei Raumtemperatur (RT) durch Vakuuminfiltration mit Paraformaldehyd in MTSB (50 mM PIPES, pH7, 5 mM EGTA, 5 mM MgSO₄) für 60 min bei Evakuierung im 5-minütigen Wechsel, gefolgt von 6 x 10 min Waschschritten in MTSB + 0,1% Triton X-100 bei RT.

Die anschließende Permeabilisierung wurde 30 min bei 30°C mit 1% Fungelase (β -1,3-Glucanase; Serva, Heidelberg) in 10 mM NaAcetat-Puffer pH 5,5 mit Vakuuminfiltration und für weitere 4 Std. bei 30°C unter Bewegung in einem langsam laufenden Rotor mit horizontaler Drehachse durchgeführt. Anschließend wurde 6 x 10 min mit MTSB + 0,1% Triton X-100 bei RT gewaschen und 60 min in 10% DMSO + 3% Nonidet P 40 (Octylphenoethylenoxid-Kondensat; LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden) in MTSB bei RT inkubiert.

Die Absättigung (Blocking) erfolgte durch 60 min Inkubation bei RT in 3% BSA in MTSB + 0,1% Triton X-100 + 0,1% Nonidet P 40 unter Vakuuminfiltration.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:200 mit 0,1% BSA, 0,02% NaAzid in MTSB mit 0,1% Nonidet P 40 durch Vakuuminfiltration bei RT, gefolgt von Inkubation mit Rotation über Nacht bei 37°C. Der Überschuss des primären Antikörpers wurde durch 8 x 30 min Waschungen bei RT mit 0,1% Triton X-100 und 0,1% Nonidet P 40 in MTSB entfernt, wobei die beiden ersten Schritte mit Vakuuminfiltration durchgeführt wurden.

Der Cyanin3-gekoppelte goat-anti-rabbit-Sekundärantikörper (Ziege gegen Kaninchen; Rockland, Gilbertsville, PA, USA) wurde 1:400 verdünnt mit 0,1% BSA, 0,02% NaAzid und 0,1% Nonidet P 40 in MTSB für 15 min vakuuminfiltriert und anschließend bei 37°C über Nacht unter Rotation inkubiert. Die Einbettung der Proben erfolgte mit dem Fluoreszenzsignale-stabilisierenden Mittel Slowfade (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

Die Fluoreszenz-Mikrofotografien wurden mit einem Zeiss Axioplan 2-Mikroskop und einer AxioCam-Kamera bzw. einem Zeiss LSM 510-Mikroskop unter Verwendung von DIC Interferenzkontrast bzw. Fluoreszenzmodus mit passenden Filtern für Cy3 angefertigt. Die Interferenzkontrast- und Fluoreszenz-Mikrofotografien wurden mit dem Programm Adobe Photoshop überlagert.

2.10 Nachweis von *in vitro* gebildeten Gibberellinen

Die Hormonmessungen wurden zur Aufklärung des Mechanismus der Wachsförderung bei Schilfpflanzen durchgeführt. Zu diesem Zweck sollten evtl. ausgeschiedene Hormone aus Flüssigkulturüberständen von Pilzen präpariert werden. Das angewandte Testsystem erlaubt nur den Nachweis von Gibberellinen.

2.10.1 Anzucht und Ernte von *Stagonospora*

Die Anzucht von *Stagonospora*-Isolaten für die Hormontests erfolgte in Flüssigkultur in 250 ml RNT bzw. Minimalmedium (siehe Abschnitt 2.2.1). Die Ernte der Kulturen erfolgte nach einer bzw. zwei Wochen Wachstum bei 19-20°C unter Schütteln bei 120 rpm durch Dekantieren, gefolgt von Zentrifugation bei 20000 rpm im SS34-Rotor für 15 min bei 4°C. Der Überstand wurde weiterverwendet.

2.10.2 Extraktion von Gibberellinen aus Kulturüberständen

Für die Hormonpräparation wurden 10 ml Kulturüberstand sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter, Nalgene, Rochester, NY, USA) und der pH-Wert mit 1-2 Tropfen Salzsäure auf pH 2-2,5 eingestellt. Nach Zugabe von 10 ml Essigsäureethylester wurde im Scheidetrichter geschüttelt und die wässrige Phase verworfen. Zur verbliebenen organischen Phase wurde eine Spatelspitze wasserfreies Natriumsulfat (Na₂SO₄) zur Bindung des restlichen Wassers zugefügt, erneut geschüttelt und abfiltriert. Die organische Phase wurde im Rotationsverdampfer (Rotavapor RE 120, Büchi Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Schweiz) bei 30°C unter Wasserstrahlvakuum eingengt und die nicht-flüchtigen Rückstände in 1 ml Ethanol (absolut, p.a.) aufgenommen.

2.10.3 Nachweisverfahren für Gibberelline

Die Hormontests wurden im Labor von Frau PD Dr. Bettina Tudzynski am Institut für Botanik an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt. Als Testsystem diente eine Gibberellin-defiziente Reis-Mutante (*Oryza sativa* L. cv. „Tan-ginbozu“), die ohne Hormongabe kein Längenwachstum zeigt (Zwergreis) und als Indikator für biologisch aktive Gibberelline verwendet wird (Rood et al., 1986; Rood et al., 1987). Die aus der Extraktion (siehe Abschnitt 2.10.2) erhaltenen Volumina wurden hierfür von 1 ml auf 50 µl eingengt. Auf die Keimlinge wurden 20 µl unverdünnte bzw. 1:10 verdünnte Lösungen der zu testenden Extrakte aufgetragen (Dr. B. Tudzynski, persönliche Mitteilung). Als Positivkontrolle dienten mit 10 µg/ml GA₃ (Gibberellinsäure) behandelte Pflanzen, für die Negativkontrolle wurde H₂O verwendet. Die Größe der Pflanzen wurde nach zwei Wochen verglichen und fotografisch dokumentiert.

2.11 Statistische Verfahren

2.11.1 PCR-Testreihen

Die statistische Bewertung der Unterschiede von PCR-Detektionshäufigkeiten zwischen verschiedenen Pflanzenteilen und/oder Uferzonierungen sowie verschiedenen Monaten innerhalb einer bzw. zwischen zwei Pilzarten erfolgte durch einen abhängigen Anteilstest mit Erstellung einer Kreuztabelle auf Basis des paarweisen Vergleichs im Programm JMP Version 4.04 (SAS Institute, Cary, NC, USA) und anschließendem Binomialverteilungstest in Microsoft Excel Version 10 (Microsoft Corporation, Seattle, USA). Die Konfidenzgrenze des Wahrscheinlichkeitswertes lag bei $p = 0,05$ (95%-Konfidenzintervall). Sie wurde im Falle mehrerer durchgeführter Tests mit der a-posteriori-Korrektur von Bonferroni angepasst. Hierbei wurde die Signifikanzgrenze durch Division des Ausgangs-p-Wertes durch die Anzahl der durchgeführten Tests verschärft.

Die Analyse des gemeinsamen Auftretens zweier Pilzarten in der gleichen Probe erfolgte ebenfalls mit JMP 4.0.4 durch einen abhängigen Anteilstest mit Erstellung einer Kreuztabelle auf Basis des paarweisen Vergleichs. Hierbei wurden die Werte des gemeinsamen Auftretens mit den aus der Zufallsverteilung erwarteten Werten verglichen und die Signifikanz einer eventuellen Begünstigung des gemeinsamen Vorkommens, bzw. einer gegenseitigen Vermeidung mit Fisher's Exact Test (Konfidenzgrenze bei $p = 0,05$), bzw. zusätzlich mit dem weniger strikten Chi-Quadrat-Test (Konfidenzgrenze bei $p = 0,05$) bestimmt.

2.11.2 Mikrokosmen

Die statistische Bewertung der Wachstumsparameter der Mikrokosmos-Experimente basierte auf den kombinierten Ergebnissen aller Pflanzen einer Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Sie erfolgte mit dem Dunnett's Test aus dem Programm JMP Version 4.04 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Die Konfidenzgrenze lag bei $p = 0,05$.

2.11.3 Wuchsgeschwindigkeit und Temperaturoptimum

Die statistische Relevanz der Wachstumsunterschiede von verschiedenen Pilzarten bei einer gegebenen Temperatur wurde durch paarweisen Vergleich mit Dunnett's Test aus dem JMP Programm Version 4.04 (SAS Institute, Cary, NC, USA) untersucht. Die Konfidenzgrenze lag bei $p = 0,05$. Bei *Microdochium* mit mehreren untersuchten Isolaten pro Art gingen die zuvor aus 3 Replikaten gebildeten Mittelwerte von je 4 bzw. 5 Isolaten pro Art in die Berechnung ein. Für den Dunnett's Test wurde eine der an einer Kombination beteiligten Pilzarten als Kontrolle definiert. Zusätzlich wurde der Vergleich der Wuchsgeschwindigkeit von verschiedenen Pilzarten mit mehreren untersuchten Isolaten der gleichen Art verfeinert durch multifaktorielle Varianzanalyse (MANOVA) mit dem Programm JMP Version 4.04 (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt. Hierin ist eine Berücksichtigung der Abhängigkeit der Replikate jedes Isolates einer Art beinhaltet. Die Konfidenzgrenze lag bei $p = 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung und Charakterisierung von samenbürtigen Pilzen

3.1.1 Isolierung samenbürtiger Pilze

Zur Isolierung samenbürtiger endophytischer Pilze aus Schilfsamen wurden diese unter Anwendung verschiedener Chemikalien einer Oberflächensterilisation unterzogen, um die auf der Samenoberfläche vorkommenden Pilze abzutöten. Gleichzeitig wurden Methoden etabliert, um im Inneren des Samens befindliche Pilze ebenfalls vollständig zu eliminieren (Tabelle 11). Die sukzessive Behandlung von 598 Samen, die am überschwemmten Bodensee-Standort Reichenau geerntet wurden (November 1998, 4-5 Monate trocken gelagert) mit 70% EtOH/ 5% NaOCl/70% EtOH für 1/2/1 min führte zu einer starken Abnahme der auf Malzextrakt isolierbaren Pilzkolonien auf eine relative Häufigkeit von 2,2% im Vergleich zur Kontrolle. Die so erhaltenen 13 Isolate wurden *bona fide* als Endophyten betrachtet und weiter bearbeitet (siehe Abschnitt 3.1.2). Nach längeren Inkubationszeiten wurden nur noch vereinzelt Pilze isoliert. Es handelte sich dabei um drei Isolate nach 5/5/5 min mit einer Gesamthäufigkeit von 0,6% und ein Isolat nach 10/10/10 min Inkubationsdauer, welches 0,5% Isolierungshäufigkeit entsprach (Tabelle 11).

Tabelle 11: Sterilisation von Schilfsamen. (a) Die Behandlungen beinhalteten 200-600 Samen pro Ansatz, (b) relative Häufigkeit des pilzlichen Auswuchses auf Malzagar, (c) relative Keimungshäufigkeit der Samen auf sterilem Substrat im Licht, (d) Triforin wurde mit 0,1 mg/ml in Malzagarplatten angewendet bzw. ins Gießwasser gemischt, n.d.: keine Daten vorhanden.

Behandlung ^a	Saatgut vom Bodensee		Kommerzielles Saatgut	
	Pilzkolonien [%] ^b	Keimung [%] ^c	Pilzkolonien [%] ^b	Keimung [%] ^c
H ₂ O, 15 min (Kontrolle)	100,0	15,7	12,8	55,3
5% NaOCl, 4 min	45,5	n.d.	n.d.	n.d.
70% EtOH, 4 min	20,9	n.d.	n.d.	n.d.
EtOH/NaOCl/EtOH, 1/2/1 min	2,2	19,5	0,5	87,4
EtOH/NaOCl/EtOH, 5/5/5 min	0,6	12,9	0,0	36,1
EtOH/NaOCl/EtOH, 10/10/10 min	0,5	0,0	n.d.	n.d.
H ₂ O, 4 min und Triforin ^d	85,9	16,6	n.d.	n.d.
EtOH/NaOCl/EtOH, 5/5/5 min und Triforin ^d	0,0	14,2	n.d.	n.d.

Diese Versuchsserien zeigten ferner Bedingungen auf, unter denen alle Pilze, die auf oder in den Samen vorhanden waren, vollständig beseitigt werden konnten, ohne dass die Keimfähigkeit der Samen stark eingeschränkt war. Diese Bedingungen waren für Saatgut vom Bodensee die sukzessive Behandlung mit EtOH/NaOCl/EtOH für 5/5/5 min und anschließende Fungizidgabe (Triforin). Für kommerzielles Saatgut genügte die Behandlung mit EtOH/NaOCl/

EtOH für 5/5/5 min ohne Fungizidbehandlung (Tabelle 11). Diese Behandlungen wurden für die Anzucht von keimfreien Pflanzen benötigt, die in axenischen Mikrokosmen zum Einsatz kamen (siehe Abschnitt 3.3.1). Das Saatgut vom Bodensee zeigte hierbei eine von vorneherein niedrigere Keimungshäufigkeit und eine stärkere Befruchtung mit Pilzen als das kommerzielle Saatgut (siehe Kontrolle in Tabelle 11).

3.1.2 Bestimmung der Isolate durch Sequenzierung und Mikroskopie

3.1.2.1 BLAST-Suche mit ITS-Sequenzen

Aus den Reinkulturen der erhaltenen Isolate (siehe Abschnitt 3.1.1) wurde die DNA präpariert, anschließend wurden die ITS-Regionen der ribosomalen DNA durch PCR mit den Primern ITS1-F und ITS4 amplifiziert und sequenziert. BLAST-Suche in Genbanken zeigte, dass drei verschiedene Sequenztypen Such-Ergebnisse in den miteinander assoziierten Pilzgattungen *Stagonospora* (Sacc.) Sacc. und *Phaeosphaeria* Miyake erzielten (Tabelle 12). Bei der Gattung *Stagonospora* handelt es sich um die asexuelle Form (Anamorph, Nebenfruchtform). Die Gattung *Phaeosphaeria* bezeichnet die bekannten sexuellen Stadien (Teleomorph, Hauptfruchtform) dieser Pilzgruppe (Cunfer & Ueng, 1999; Camara et al., 2002). Sie gehören zu den Eumycota, Stamm Ascomycota, Unterklasse Dothideomycetidae, Ordnung Pleosporales, Familie Phaeosphaeriaceae (taxonomische Einordnung nach Kirk et al., 2001). Der vierte Sequenztyp passte dagegen zur Gattung *Epicoccum* Link (Tabelle 12), welche nur als Anamorph bekannte Vertreter aus dem Stamm Ascomycota repräsentiert.

Tabelle 12: Relative Häufigkeiten und BLAST-Suchergebnisse der Pilzisolate aus Schilfsamen nach Behandlung mit EtOH/NaOCI/EtOH 1/2/1 min. Das untersuchte Saatgut stammt vom Standort Reichenau, überschwemmt, Sammlung November 1998.

Sequenztyp	Anzahl Isolate (absolute Häufigkeit)	Relative Häufigkeit innerhalb der Isolate [%]	Relative Isolierungshäufigkeit aus 598 Samen [%]	Beste BLAST-Suchergebnisse: Name, (Accession-Nummer)	Score-Wert	Sequenz-Identität [%]
4/99-1	6	46	1,00	<i>Phaeosphaeria avenaria</i> (U77359)	696	93,0
				<i>Phaeosphaeria avenaria</i> (AY196988)	680	92,6
4/99-5	4	31	0,67	<i>Phaeosphaeria insignis</i> (AF439485)	1027	99,6
				<i>Phaeosphaeria culmorum</i> (AF439477)	1027	99,6
4/99-18	1	8	0,17	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i> (AF439499)	846	95,6
				<i>Phaeosphaeria avenaria</i> (U77359)	777	92,4
4/99-12	2	15	0,33	<i>Epicoccum nigrum</i> (AF455455, AF455447)	1096	100

Die Mehrheit der 13 Isolate, die nach 1/2/1 min Behandlungsdauer erhalten wurden (siehe Abschnitt 3.1.1), repräsentierte *Stagonospora* spp.; sechs Isolate gehörten zum Sequenztyp 4/99-1, vier zum Sequenztyp 4/99-5 und eins zum Typ 4/99-18. Die Gattung *Epicoccum* wurde durch zwei Isolate gleichen Sequenztyps vertreten. Beide wiesen eine ITS-Sequenz mit 100% Identität zu *Epicoccum nigrum* Link auf. Sie wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die relativen Häufigkeiten sind in Tabelle 12 angegeben. Nach 5/5/5 min Behandlungsdauer (Tabelle 11) wurden drei Isolate erhalten. Unter diesen wurde über die ITS-Sequenz das erste Isolat als identisch zu *Epicoccum* sp. 4/99-12, das zweite als 97% identisch zu Ascomyceten der Gattung *Nemania* (AF201704; AF201707) sowie das dritte als 98% identisch zu Basidiomyceten der Gattung *Phlebia* (AY271810.1; AY089740.1) bestimmt. Ein nach 10/10/10 min erhaltenes einzelnes Isolat war identisch mit dem Sequenztyp 4/99-5. Da die Isolate aus den längeren Behandlungsdauern Einzelvorkommen waren und auch keinen taxonomischen Zusammenhang erkennen ließen, wurde nur mit den Isolaten bzw. Sequenztypen der häufig vorkommenden *Phaeosphaeria/Stagonospora*-Gruppe weitergearbeitet.

3.1.2.2 Molekulare Phylogenie der *Stagonospora*-Isolate

Durch Erstellung einer molekularen Phylogenie (Abbildung 6) auf Basis der vollständigen ITS-Regionen der drei *Stagonospora*-Sequenzen wurde die Verwandtschaft zwischen diesen und Referenz-Arten ermittelt. Die Referenzen bestanden aus Sequenzen, die aus den Datenbanken EMBL bzw. GenBank entnommen wurden sowie aus während dieser Arbeit neu sequenzierten *Phaeosphaeria*- und *Stagonospora*-Isolaten, die aus der CBS-Stammsammlung bezogen wurden (siehe Tabelle 2).

Aus dem Phylogramm ist ersichtlich, dass die drei von Schilf erhaltenen Sequenztypen drei verschiedene Arten repräsentieren. Der Sequenztyp 4/99-1 ist 100% identisch mit einer der Referenzarten, *Stagonospora neglecta* var. *colorata* Brunaud, Isolat CBS343.86 (AJ496630). Dieses Isolat stammt ursprünglich von Schilf aus Frankreich und wurde 1986 von H. A. van der Aa bei der CBS hinterlegt. Der Sequenztyp 4/99-5 liegt innerhalb einer Gruppe sehr ähnlicher Sequenzen. Er zeigt zu *Phaeosphaeria culmorum* CBS569.86 (AF439477) und *P. insignis* CBS579.86 (AF439485) jeweils 99,6% Identität. Der dritte Sequenztyp 4/99-18 ist 95,4% identisch zu *Phaeosphaeria pontiformis* CBS589.86 (AF439499). Im dargestellten Phylogramm ist *Phaeosphaeria pontiformis* mit zwei verschiedenen Sequenzen vertreten, die aus demselben CBS-Stamm durch eigene Sequenzierung bzw. Entnahme aus den Datenbanken (AF439499) erhalten wurden. Da aus dem von der CBS erhaltenen Stamm während dieser Arbeit zwei Mal unabhängig voneinander Sequenzen erstellt wurden, die sich als identisch erwiesen, muss die Ursache für diese Diskrepanz an anderer Stelle gesucht werden. Für *Phaeosphaeria phragmiticola* wurde eine eigene Sequenz aus CBS459.84 verwendet, die zu einer veröffentlichten (AF250832) des gleichen Stammes zu 98,3% identisch ist. Auch weitere Arten (z.B. *P. avenaria*, *P. nodorum*) sind mit mehreren verschiedenen Sequenzen vertreten. Dies leitet sich entweder aus genetischer Variabilität oder aus Problemen mit der klassischen, morphologisch basierten Taxonomie ab. Es gibt Berichte über Unzuverlässigkeiten von Sequenzeinträgen in Datenbanken (Bridge et al., 2003; Vilgalys, 2003). An dieser Stelle ist jedoch keine Beurteilung bzw. Aufklärung des Sachverhaltes möglich.

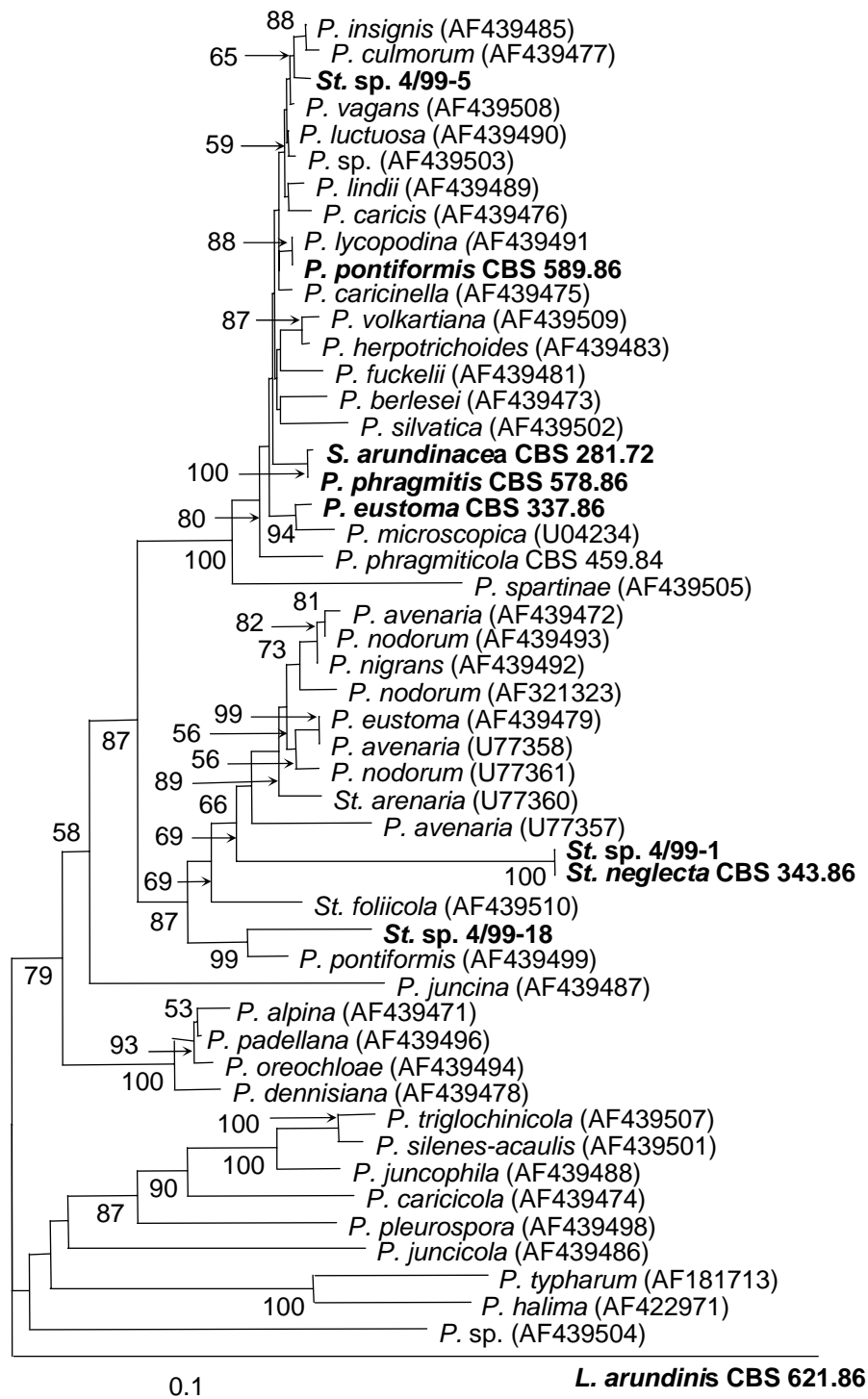


Abbildung 6: Molekulare Phylogenie von *Stagonospora*- und *Phaeosphaeria*-Arten. Verwendet wurden die ITS1-5,8S-ITS2-Sequenzen der rDNA. Während dieser Arbeit neu ermittelte und in Datenbanken eingetragene Sequenzen sind fett gedruckt. Referenzen aus den Datenbanken EMBL bzw. GenBank sind in normalem Schrifttyp dargestellt. Die Accession-Nummern für die Datenbanken sind in Klammern angegeben. Eigene Sequenzen wurden zur besseren Unterscheidung hier nicht mit den Accession-Nummern versehen (siehe Tabelle 13). Bootstrap-Werte über 50% sind angegeben. Als „out-group“ wurde *Lophiostoma arundinis* verwendet. Abkürzungen: *P.* = *Phaeosphaeria*, *St.* = *Stagonospora*, *L.* = *Lophiostoma*, *S.* = *Septoria*. Entnommen aus Ernst et al. (2003).

Im Rahmen dieser Arbeit selbst erzeugte Sequenzen erhielten die folgenden Datenbank-Zugangsnummern (Accession-Nummern, Tabelle 13; Datenbankadresse siehe Abschnitt 2.7.6):

Tabelle 13: Accession-Nummern der in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzen.

Name	Isolat-Nr.	Accession-Nummer
<i>Lophiostoma arundinis</i>	CBS621.86	AJ496633
<i>Phaeosphaeria eustoma</i>	CBS337.86	AJ496629
<i>Phaeosphaeria phragmitis</i>	CBS578.86	AJ496631
<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	CBS589.86	AJ496632
<i>Septoria arundinacea</i>	CBS281.72	AJ496628
<i>Stagonospora neglecta</i> var. <i>colorata</i>	CBS343.86	AJ496630
<i>Stagonospora</i> sp.	4/99-1	AJ496625
<i>Stagonospora</i> sp.	4/99-5	AJ496626
<i>Stagonospora</i> sp.	4/99-18	AJ496627

3.1.2.3 Morphologische Bestimmung

Zusätzlich zur molekularen Phylogenie wurde versucht, die Isolate zum Sporulieren anzuregen, um eine morphologische Bestimmung durchzuführen. Hierzu wurden die Pilze auf unterschiedlichen Medien unter verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen inkubiert. Die Isolate 4/99-5 und 4/99-18 konnten auf Stroh sowie auf einer Gersten-Ähre auf SNA unter UV-Licht zum Sporulieren gebracht werden. Das Isolat 4/99-1 blieb steril. Weitere Isolate des 4/99-1-Sequenztyps konnten ebenfalls nicht zur Sporulation gebracht werden. 4/99-5 bildete Pyknidien mit 4-zelligen Pykno-sporen. 4/99-18 bildete bis zu 8-zellige Pykno-sporen (Abbildung 7). Hierdurch konnten die Isolate morphologisch als *Stagonospora* spp. bestätigt werden (Dr. A. Leuchtmann, ETH Zürich & Dr. U. Damm, persönliche Mitteilungen).

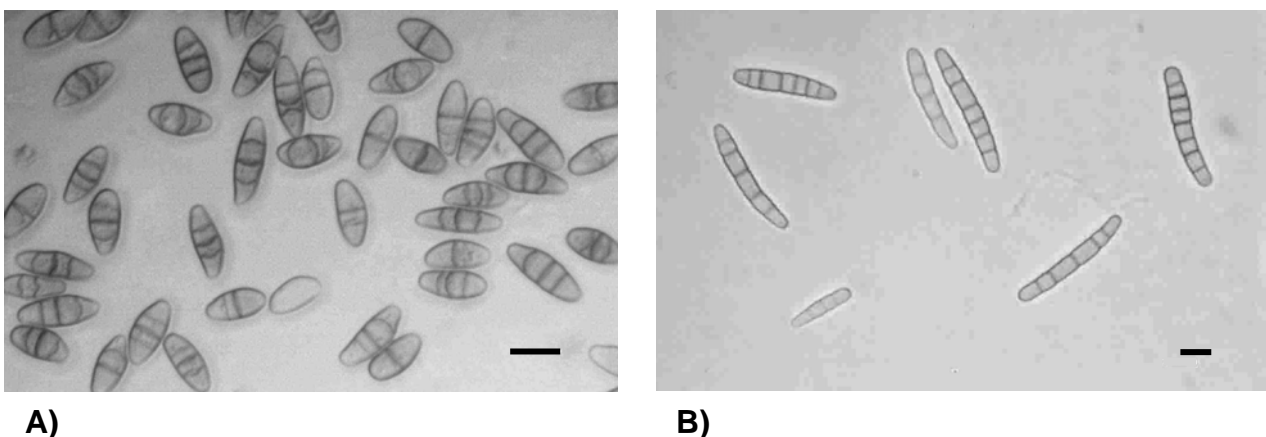


Abbildung 7: Sporen der *Stagonospora*-Isolate. Lichtmikroskopische Aufnahmen. A) Isolat 4/99-5, B) Isolat 4/99-18, Balken = 20 µm. Fotos: Dr. Ulrike Damm.

3.2 PCR-Nachweis ausgewählter Pilzarten in Schilf

3.2.1 PCR-Nachweis von *Stagonospora* sp. 4/99-1

Zum Nachweis der aus Samen am häufigsten isolierten Art *Stagonospora* sp. 4/99-1 wurde ein nested PCR-Test entwickelt. Dieser sollte dazu dienen, die räumliche und zeitliche Verteilung des Pilzes in den verschiedenen Abschnitten der Schilfpflanzen am natürlichen Standort kultivierungsunabhängig zu untersuchen.

3.2.1.1 Spezifitätstests für *Stagonospora*-Primer

Die Spezifität des nested PCR-Nachweises wurde durch Reaktionsansätze mit DNA verschiedener Pilze, sowie DNA, die aus etwa 200 bzw. aus 10 vereinigten Schilfsamen isoliert wurde, geprüft. Die Samen stammten von derselben Ernte, von der die Pilze ursprünglich isoliert wurden (etwa 200 vereinigte Samen) bzw. von einer späteren Ernte (10 vereinigte Samen) vom gleichen Standort. Im ersten PCR-Schritt wurde mit den allgemeinen Pilzprimern ITS1-F und ITS4 erwartungsgemäß aus allen Templates ein Produkt im Größenbereich von 500-700 bp erhalten (Abbildung 8 A). Dagegen wurden im zweiten PCR-Schritt mit den spezifischen Primern für 4/99-1 Produkte nur aus den Samen des Standortes, an dem *Stagonospora* 4/99-1 zuvor isoliert worden war, sowie aus der genomischen DNA des Zielpilzes erzeugt. Die aus der nested PCR erhaltene Fragmentgröße betrug ca. 500 bp bei einer theoretisch erwarteten Größe von 502 bp. Die *Stagonospora*-Stämme 4/99-5, 4/99-18 und *Epicoccum* 4/99-12 dienten als Negativ-Kontrollen (Abbildung 8 B).

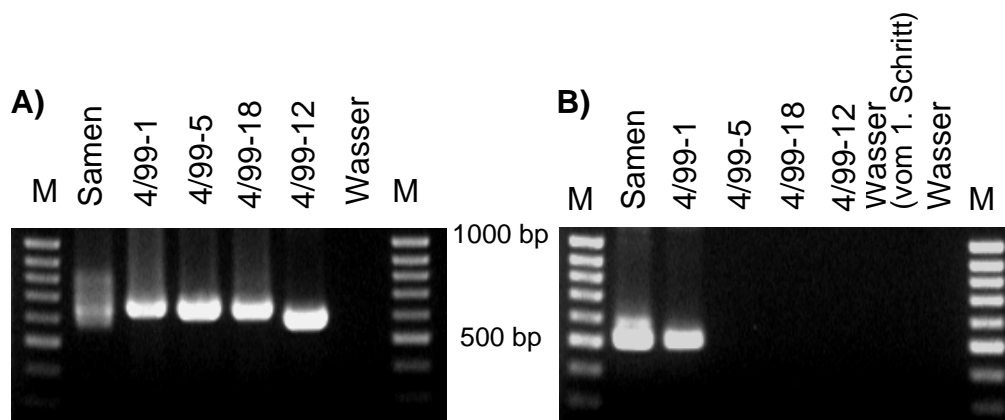


Abbildung 8: Spezifitätstest für die Primer für *Stagonospora* 4/99-1. A) Erster Schritt der nested PCR mit den Primern ITS1-F und ITS4. Samen: 300 ng Template DNA aus einer Gruppe von 10 Samen vom Standort Reichenau, geerntet im November 2001; je 50 ng genomische Pilz-DNA der *Stagonospora*-Stämme 4/99-1, 4/99-5, 4/99-18 und *Epicoccum* 4/99-12; Wasser (Negativ-Kontrolle). B) Zweiter Schritt der nested PCR. 500fache Verdünnungen der PCR-Produkte der ersten Reaktion wurden mit den spezifischen Primern für die ITS-Regionen von *Stagonospora* 4/99-1 amplifiziert. Entnommen aus Ernst et al. (2003).

3.2.1.2 Nachweisgrenze der nested PCR

Zur Beurteilung der Empfindlichkeit des nested PCR-Testsystems wurde ein Sensitivitätstest durchgeführt. Definierte Konzentrationen der genomischen DNA des Zielorganismus 4/99-1 wurden seriell in 1:5 Verdünnungsschritten in einem konstanten Hintergrund genomischer DNA aus axenischen, d.h. pilzfreien Schilfpflanzen verdünnt. Dies diente zur Simulierung von Bedingungen, wie sie in den eigentlichen Reihenuntersuchungen anzutreffen waren. Hieraus wurde die Nachweisgrenze auf etwa 4 fg DNA des Zielorganismus pro PCR-Ansatz bestimmt (Abbildung 9). Bei einer angenommenen Genomgröße von 30 Megabasen für einen typischen Ascomyceten (vgl. Murrin et al., 1986) entspricht dies etwa 1/10 Genom (Umrechnungsfaktor 1 Megabase = ca. 0,00103 pg, abgeleitet aus Shaw (1991)). Damit lag die Nachweisgrenze unter der in einem Zellkern vorliegenden DNA-Menge. Bei einer Annahme von ca. 100-200 Kopien des rDNA-Clusters pro Zellkern eines Ascomyceten (vgl. Singer & Berg, 1992) waren somit für eine erfolgreiche PCR etwa 10 ITS-Kopien erforderlich.

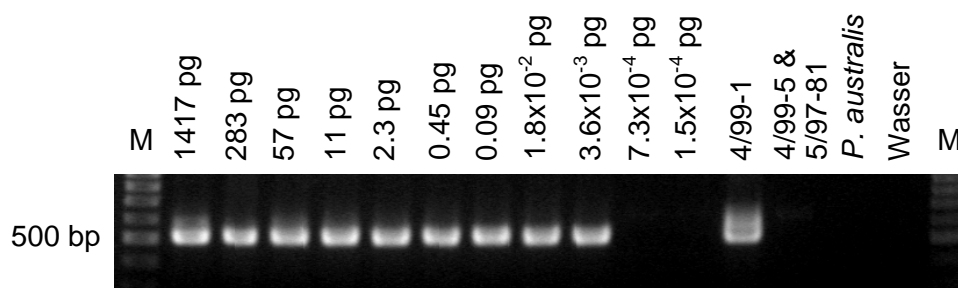


Abbildung 9: Sensitivitätstest. Gezeigt ist der zweite Schritt der nested PCR. Sukzessive Verdünnungen genomischer DNA des *Stagonospora*-Stammes 4/99-1 wurden in einem konstanten Hintergrund von 80 ng DNA aus axenischen Schilfkeimlingen hergestellt. Spur 4/99-1: 4 ng genomische DNA des Zielorganismus; Spur 4/99-5 & 5/97-81: Gemisch von je 80 ng DNA von zwei nicht-Ziel-Pilzen. *P. australis*: 80 ng DNA aus axenischen Schilfkeimlingen. Die Angaben beziehen sich auf die im ersten PCR-Schritt eingesetzte Template-Menge; im zweiten PCR-Schritt wurde eine 100fache Verdünnung des Produktes aus der ersten Reaktion eingesetzt. Entnommen aus Ernst et al. (2003).

3.2.1.3 PCR-Nachweis von *Stagonospora* in Freiland-Proben

Für den Nachweis von *Stagonospora* 4/99-1 im Freiland wurde Schilf über einen Zeitraum von drei Jahren an zwei verschiedenen Bodenseestandorten mit je zwei verschiedenen Habitats-Zonierungen gesammelt. Eine komplette Vegetationsperiode wurde durch Material aus sechs Beprobungen in ein- bis zweimonatlichen Abständen (im Jahr 2000) repräsentiert. Insgesamt wurden vegetative Teile von 66 Pflanzen untersucht. Sie dienten zur Gewinnung einer Gesamtheit von 252 Gewebeproben von Blättern (54 Proben), Halmen, Wurzeln und Rhizomen (je 66 Proben). Weitere Pflanzen wurden ausschließlich für die Gewinnung von Samen verwendet. Die Samen wurden nur im November im reifen Zustand geerntet. Sie wurden als

Pools von je ca. 200 Samen aus ca. 10 verschiedenen Pflanzen pro Beprobungsstelle getestet. Die Samen-Pools waren zuvor einer Oberflächensterilisation mit der Kombination von Ethanol und Natriumhypochlorit unterzogen worden (siehe Abschnitt 2.4.4).

Vor der Durchführung der PCR-Tests auf Pilzvorkommen wurden alle Umweltproben einer Kontrolle der prinzipiellen Amplifizierbarkeit der präparierten genomischen DNA unterzogen. Diese erfolgte durch eine PCR mit spezifischen Primern für die ITS-Region von *Phragmites australis*. Sie zeigte bei allen Ansätzen eine erfolgreiche Amplifikation (Abbildung 18B & Daten nicht gezeigt). Die erhaltene PCR-Fragmentgröße wurde als ca. 400 bp ermittelt und entsprach damit der theoretisch erwarteten Größe von 385 bp.

3.2.1.3.1 Vorkommen von *Stagonospora* an den verschiedenen Bodensee-Standorten und Verteilungsmuster in der Pflanze

Während aller Jahre, in denen Beprobungen erfolgten, war *Stagonospora* an allen untersuchten Bodensee-Standorten nachzuweisen. Die gesamte Nachweishäufigkeit wies je nach Jahr Schwankungen von 20,7% bis 45,8% auf (siehe Tabelle 14). Die mittlere Nachweishäufigkeit betrug 26,3%. Insgesamt wurde damit eine weite Verbreitung des Pilzes aufgezeigt, wobei aufgrund der nicht-quantitativen sehr sensitiven PCR-Methode keine Aussage über die tatsächlich vorhandene Mycelmasse getroffen werden kann.

Tabelle 14: Vorkommen von *Stagonospora* 4/99-1 am Bodensee über mehrere Jahre. Die nested PCR-Ergebnisse der verschiedenen Pflanzenteile (ohne Samen) wurden für jedes Jahr bzw. für jede Standort/Habitat-Kombination zusammengefasst. Abkürzungen: R = Reichenau, M = Mainau, Ü = überschwemmt, T = trocken, n.d.: keine Daten vorhanden.
* Der Mittelwert wurde unter Berücksichtigung der variablen Probenzahlen gebildet.

	Relative Häufigkeit PCR-Signale [%]				Gesamt (Mittelwert)	Gesamtanzahl be- probter Pflanzenteile aller einbezogenen Standorte
	Standorte einzeln					
Jahr	RÜ	RT	MÜ	MT		
1998	25,0	50,0	25,0	25,0	31,3	16
1999	50,0	50,0	25,0	37,5	40,6	32
2000	33,3	18,2	15,6	15,6	20,7	180
2001	n.d.	n.d.	41,7	50,0	45,8	24
Mittelwert*	35,1	25,0	21,7	24,6	26,3	$\Sigma = 252$
R gesamt	30,0		-		-	114
M gesamt	-		23,2		-	138
Ü gesamt (R+M)	27,8				-	126
T gesamt (R+M)	24,8				-	126

Die Verteilung des Pilzes auf die verschiedenen Standorte und Habitate zeigte folgende Ergebnisse: In überschwemmten Habitaten kam *Stagonospora* mit einem Mittelwert von 27,8% und in trockenen Habitaten mit 24,8% vor. Sowohl die Analyse der einzelnen Pflanzenteile als auch ihrer Gesamtheit zeigte keinen signifikanten Unterschied der pilzlichen Verteilung zwischen dem überschwemmten und dem trockenem Habitattyp (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$; Daten nicht gezeigt). Am Standort Reichenau wurde der Pilz mit einer mittleren Gesamthäufigkeit von 30,0%, am Standort Mainau dagegen mit nur 23,2% nachgewiesen. Dieser Unterschied zwischen den beiden Standorten ist signifikant (Binomialverteilungstest, $p < 0,05$). Es ist ersichtlich, dass dieser Unterschied aus den Differenzen zwischen den überschwemmten Habitaten beider Standorte resultiert (Tabelle 14). Hierbei zeigte *Stagonospora* Bevorzugung für Pflanzen des etwas gesünderen überschwemmt stehenden Bestandes (Reichenau, überschwemmt, siehe Abschnitt 2.1.1). Ob diese Differenz in der Besiedlungshäufigkeit Folge der an beiden überschwemmten Standorten unterschiedlichen vorliegenden Schädigungsgrade (siehe Abschnitt 2.1.1) oder Ursache dafür war, kann hieraus nicht geklärt werden.

Die Verteilung des Pilzes in adulten Pflanzen ergab eine deutliche Bevorzugung der oberirdischen Pflanzenteile (Tabelle 15). Die Häufigkeit des Vorkommens des Pilzes in den oberirdischen Pflanzenteilen (Blatt, Halm) war von jener in den unterirdischen Pflanzenteilen (Wurzel, Rhizom) statistisch signifikant verschieden (Binomialverteilungstest, für die Gesamtheit $p < 0,05$; für Einzelvergleiche $p < 0,0083$ infolge Bonferroni-Korrektur). Dagegen wies die Verteilung des Pilzes innerhalb der oberirdischen bzw. innerhalb der unterirdischen Pflanzenteile keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (Binomialverteilungstest, $p > 0,0083$, Tabelle 15). Insgesamt lässt sich feststellen, dass *Stagonospora* im Schilf in allen Pflanzenteilen nachgewiesen wurde.

Tabelle 15: Verteilungsmuster von *Stagonospora* 4/99-1 in den verschiedenen Teilen der Schilfpflanze. Angegeben ist die relative PCR-Detektionshäufigkeit innerhalb jedes Organtyps. Die nested PCR-Ergebnisse von vier verschiedenen Standorten und verschiedenen Jahrgängen wurden zusammengefasst. Zur Verfügung standen insgesamt 252 Gewebeproben aus 66 Schilfpflanzen. Signifikanzangaben für Unterschiede zwischen den Pflanzenteilen gemäss Binomialverteilungstest; verschiedenartige Buchstaben = signifikanter Unterschied ($p < 0,0083$ infolge Bonferroni-Korrektur), gleichartige Buchstaben = kein signifikanter Unterschied.

Pflanzenteil	Relative Häufigkeit [%]	Signifikanz
Blatt	55,6	A
Halm	36,4	A
Rhizom	4,6	B
Wurzel	13,6	B

3.2.1.3.2 Saisonaler Verlauf der Besiedlung

Die Analyse des Vorkommens des Pilzes im jahreszeitlichen Verlauf zeigte deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Pflanzenteilen in Abhängigkeit zur Jahreszeit (Abbildung 10).

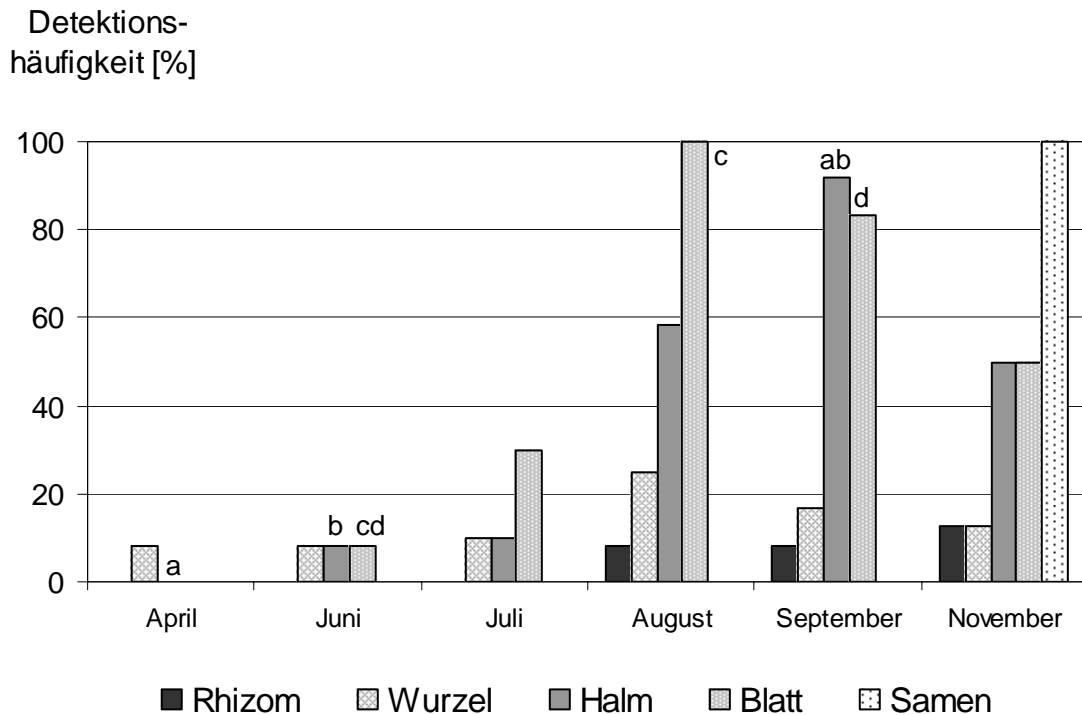


Abbildung 10: Saisonale Sukzession von *Stagonospora* 4/99-1. Dargestellt ist die relative Häufigkeit der nested PCR-Signale. Der nested PCR-Nachweis erfolgte an 66 *Phragmites australis*-Pflanzen vom Bodensee, aus denen 252 vegetative Pflanzenteile gewonnen und einzeln untersucht wurden. Zusätzliche Pflanzen wurden ausschließlich für die Ernte von Samen eingesetzt. Vier verschiedene Standorte bzw. Habitats, sowie die gleichen Monate verschiedener Jahrgänge wurden zusammengefasst. Im April waren keine Blätter, sondern nur zu den Halmen gezählte Schösslinge mit nicht entfalteten Blättern vorhanden. Samen wurden nur im November 1998 und 1999 gesammelt und als Pools von mehreren zusätzlich geernteten Pflanzen des jeweiligen Habitats getestet. Gleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Besiedlung des gleichen Pflanzenteils zwischen den verschiedenen Monaten an (Binomialverteilungstest, $p < 0,005$ für Blätter bzw. $p < 0,0033$ für Halme, Wurzeln und Rhizome infolge Bonferroni-Korrekturen für den Vergleich aller Monate untereinander). Nicht signifikant verschiedene Kombinationen wurden nicht angegeben. Entnommen aus Ernst et al. (2003), verändert.

Beim Beginn des Wachstums der neuen Schösslinge im April war der Pilz lediglich in Wurzeln mit geringer Häufigkeit nachweisbar. Im Verlauf der Vegetationsperiode nahm die Nachweishäufigkeit des Pilzes in den anderen – besonders stark in den oberirdischen – Organen zu. Im September war die Mehrheit der Blätter und Halme mit *Stagonospora* besiedelt. Im November wurden zusätzlich Samen als Pools (8 Pools zu je ca. 200 Samen) untersucht;

hierbei wurde *Stagonospora* in allen Pools nachgewiesen. Die bei den oberirdischen Pflanzenteilen festgestellten, sehr ausgeprägten Unterschiede der Besiedlung zwischen den Frühjahrs- und Sommermonaten wurden als statistisch signifikant ermittelt (Binomialverteilungstest, $p < 0,005$ für Blätter bzw. $p < 0,0033$ für Halm-Proben infolge Bonferroni-Korrekturen; vgl. Abbildung 10). Dagegen waren die für die unterirdischen Pflanzenteile festgestellten, geringeren Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$; Signifikanzgrenze bei $p = 0,0033$). Das Vorkommen relativ weniger Signifikanzen trotz weiterer deutlicher Unterschiede der Werte bei den oberirdischen Pflanzenteilen resultierte aus der relativ geringen Stichprobenzahl für die Kombination Pflanzenteil und Monat ($n = 8-12$, im Mittel 11). Bei Zusammenfassung der PCR-Signale der einzelnen Pflanzenteile zu einem Datensatz für jeden Monat (Abbildung 15) konnten signifikante Unterschiede zwischen den früheren Monaten der Vegetationsperiode (April, Juni, Juli) und den späteren (August, September) auch für die Gesamtheit der Proben nachgewiesen werden (Binomialverteilungstest, $p < 0,0033$ infolge Bonferroni-Korrektur). Somit konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen von *Stagonospora* allgemein und insbesondere in den oberirdischen Pflanzenteilen während der Vegetationsperiode bedeutsam zunahm, während es in den unterirdischen Teilen bei geringerem Häufigkeitsniveau geringeren Schwankungen unterworfen war.

Durch Sequenzierung von sechs PCR-Produkten (je eine Wurzel-, Rhizom-, Halm-, zwei Blatt- und eine Samen-Probe) und BLAST-Suche, bzw. Zusammensetzung im Programm SeqManII wurde die Identität der PCR-Ergebnisse mit der Sequenz des Zielorganismus 4/99-1 stichprobenartig überprüft und in allen untersuchten Fällen nachgewiesen.

3.2.1.3.3 Untersuchung einzelner Samen

Da ein Samen-Pool aufgrund der hohen Sensitivität des PCR-Nachweises auch dann ein positives Detektionsergebnis erbringen kann, wenn nur ein einziger Same mit dem Pilz infiziert ist, wurde zusätzlich zur Untersuchung von Samenpools eine verfeinerte Analyse durchgeführt. 96 Einzelsamen aus insgesamt 67 verschiedenen Pflanzen der Jahre 1998 und 1999 von den vier Probenahmestellen wurden auf *Stagonospora*-Vorkommen getestet. Hierbei wurden 12 Samen pro Beprobungsstelle und Jahr untersucht. Die untersuchten Samen wurden von möglichst vielen verfügbaren, von verschiedenen Pflanzen stammenden Blütenständen genommen (4-12 Stück pro Standort und Jahr). Ständen weniger als 12 Blütenstände zur Verfügung, so wurde eine möglichst gleichmäßige Auswahl der Samen vorgenommen. Im ersten PCR-Schritt mit den allgemeinen Pilzprimern ITS1-F und ITS4 wurde bei 96% aller Samen pilzliches Vorkommen ermittelt (Daten nicht gezeigt). Bei den wenigen Proben, die im ersten PCR-Schritt kein Signal erbrachten, war Amplifikation prinzipiell trotzdem möglich, wie durch PCR mit dem Primerpaar für *Phragmites* nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Anwendung des nur für das Isolat 4/99-1 spezifischen Primerpaares im zweiten PCR-Schritt lässt sich keine Aussage treffen, ob in Samen, die kein nested PCR-Signal zeigten, andere ebenfalls zuvor aus Schilfsamen isolierte Pilze gegenwärtig waren, wie z.B. die beiden anderen *Stagonospora*-Arten, deren Samenbürtigkeit durch die Isolierungsversuche ebenfalls nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 3.1.2.1).

Mit einer Ausnahme reichten die Detektionshäufigkeiten je nach Standort von ca. 8-80% (Tabelle 16). Für eine weitere einzelne Samencharge des Jahrganges 2001 wurde ebenfalls ei-

ne Häufigkeit von über 80% ermittelt. Im Mittel waren 29,2% der Samen der Jahrgänge 1998 und 1999 mit *Stagonospora* besiedelt; dies entsprach 26,9% der untersuchten Blütenstände, bzw. Pflanzen. Der Vergleich der beiden untersuchten Jahre zeigt, dass im Herbst des Jahres 1998 allgemein mit einem Mittel von 52,1% für Einzel-Samen ein hohes Ausmaß der *Stagonospora*-Besiedlung festgestellt wurde. Dagegen wurde im Herbst 1999, also nach dem Extremhochwasser des Frühjahres 1999, eine mit 6,3% deutlich geringere Besiedlung festgestellt. Diese Tendenz ist bei den vegetativen Pflanzenteilen für das Jahr 1999 nicht erkennbar. Sie könnte jedoch – bei Annahme verzögerten Auftretens des Phänomens – in der im Jahr 2000 niedrigeren Besiedlungshäufigkeit in den vegetativen Teilen ebenfalls gesehen werden (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 16: Vorkommen von *Stagonospora* 4/99-1 in Samen. Pro Standort/Habitat wurden 12 einzelne Samen untersucht; für den Standort RÜ 2001 lagen 15 Samen zugrunde. Abkürzungen: R = Reichenau, M = Mainau, Ü = überschwemmt, T = trocken, n.d. = keine Daten verfügbar, da die Anzahl der verwendeten Blütenstände nicht erfasst wurde.

Jahr	Standort, Habitat	Relative Häufigkeit infizierte Samen [%]	Relative Häufigkeit infizierte Blütenstände [%]	Gesamtanzahl verfügbarer Blütenstände
1998	RÜ	83,3	100,0	4
	RT	33,3	50,0	6
	MÜ	75,0	85,7	7
	MT	16,7	18,2	11
	Mittelwert	52,1	53,6	Σ = 28
1999	RÜ	8,3	12,5	8
	RT	8,3	9,1	11
	MÜ	0,0	0,0	8
	MT	8,3	8,3	12
	Mittelwert	6,3	7,7	Σ = 39
1998 und 1999	R gesamt	33,3	31,0	29
	M gesamt	25,0	23,7	38
	Ü gesamt (R+M)	41,7	40,7	27
	T gesamt (R+M)	16,7	17,5	40
	Mittelwert	29,2	26,9	Σ = 67
2001	RÜ	86,7	n.d.	n.d.

Der Vergleich der verschiedenen Standorte und Habitate zeigte folgendes:

Für den Standort Reichenau wurde in beiden Jahren ein etwas höherer Besiedlungsgrad der Samen (insgesamt 33,3%) als beim Standort Mainau (insgesamt 25,0%) festgestellt. Dieser Unterschied war nicht signifikant (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$), stimmte aber mit der Tendenz bei den vegetativen Pflanzenteilen überein (vgl. Abschnitt 3.2.1.3.1 und Tabelle 14). Zwischen dem überschwemmten Habitat mit insgesamt 41,7% mittlerer Besiedlungshäufigkeit der Samen und dem trockenen Habitat mit 16,7% lag bei den Samen im Gegensatz zu den vegetativen Pflanzenteilen (vgl. Abschnitt 3.2.1.3.1) ein signifikanter Unterschied vor (Binomialverteilungstest, $p < 0,05$).

3.2.1.4 Nachweis von *Stagonospora* in Keimlingen mit natürlicher Pilzbefruchtung

Durch die Isolierung nach Oberflächensterilisation auf Malzagar und die PCR-Nachweise an Samen, welche an natürlichen Standorten gesammelt wurden, war angezeigt, dass *Stagonospora* 4/99-1 mit den Samen seines Wirtes verbreitet werden könnte. Aufgrund der geringen Isolierungshäufigkeit (1%, siehe Tabelle 12) auf Agar nach Oberflächensterilisation im Vergleich zu den PCR-Ergebnissen (83,3%, siehe Tabelle 16) aus der gleichen Samencharge kann jedoch nichts über die tatsächliche Vitalität des Pilzes ausgesagt werden. Hierbei ist zu beachten, dass diese auch durch die vorgenommene Oberflächensterilisation beeinträchtigt gewesen sein kann. Daher wurde untersucht, ob die Samen lebensfähige pilzliche Verbreitungseinheiten tragen, die fähig sind, wachsende Pflanzenkeimlinge zu besiedeln.

Ausgehend vom gleichen Saatgut (Reichenau, überschwemmt, November 1998) und unter Anwendung der gleichen Oberflächensterilisationsmethode, mit der die *Stagonospora*-Isolate ursprünglich erhalten wurden, erfolgte die Anzucht von Keimlingen auf Malzagar und autoklavierter Erde. Die Keimlinge erschienen steril; auch bei den auf dem Standardpilzmedium Malzagar wachsenden Keimlingen war keinerlei Pilzwuchs erkennbar. Sie wurden in zwei getrennten Pools zu je 15 Pflanzen geerntet, wobei von Malzagar die ganzen Keimlinge und von der Kultur in Erde nur die oberirdischen grünen Teile verwendet wurden. Nach DNA-Präparation und PCR mit den allgemeinen Pilzprimern ITS1-F und ITS4 wurden einzelne Banden gleicher Größe erhalten (Daten nicht gezeigt). Diese wurden direkt sequenziert und erbrachten saubere Sequenzmuster, die dem Isolat 4/99-1 entsprachen. Dies deutet an, dass dieser Pilz entweder der einzige in den Keimlingen wachsende oder der bei weitem vorherrschende war.

Für ein weiteres, die Vorgänge auf der Ebene von einzelnen Pflanzen betrachtendes Experiment wurden Samen vom Standort Reichenau (überschwemmt, Ernte November 2001) der gleichen Oberflächensterilisation unterzogen, bei der ursprünglich die *Stagonospora*-Isolate erhalten wurden (siehe Abschnitt 3.1.1 und Legende zu Tabelle 12), bzw. eine Kontrollgruppe wurde unbehandelt ausgesät. Nach 9 Wochen Wachstum auf autoklavierter Erde wurden die Keimlinge geerntet und in die Abschnitte Wurzeln, untere und obere grüne Teile zerlegt (siehe Abschnitt 2.8.6 und Abbildung 5). Die einzelnen Pflanzenteile wurden nach DNA-Präparation mittels nested PCR auf das Vorkommen von *Stagonospora* 4/99-1 untersucht. Der Pilz besiedelte besonders häufig die Wurzeln (Abbildung 11), wobei die Detektionshäufigkeit in den Keimlingen die Ergebnisse der nested PCR an Einzelsamen widerspiegelte (siehe RÜ 2001 in Tabelle 16). In den unteren Abschnitten der Sprosse war der Pilz seltener als in den Wurzeln nachweisbar; in die obersten Bereiche wuchs er offenbar nur vereinzelt ein.

Zwischen beiden Ansätzen fand sich ein gegensätzliches Verhalten des Pilzes bei der Besiedlung der Wurzeln und der unteren Sprossabschnitte. Wurzeln von Pflanzen aus oberflächensterilisiertem Saatgut wiesen eine höhere Besiedlungsfrequenz auf als solche aus unbehandeltem Saatgut. Umgekehrt war die Besiedlungsfrequenz der Sprosse von Pflanzen aus behandeltem Saatgut niedriger als bei unbehandeltem. Die Differenz der Besiedlung zwischen Wurzel und unterem Spross bei Pflanzen aus unbehandeltem Saatgut war statistisch nicht signifikant. Durch die Behandlung wurde die Differenz größer, so dass sich ein signifikanter Unterschied

ergab (Binomialverteilungstest, $p < 0,05$). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass *Stagonospora* bei der oberflächensterilisierten Variante weniger dem Konkurrenzdruck von auf der Oberfläche der Samen befindlichen Pilzarten ausgesetzt war. Er blieb daher im Wurzelbereich, während er bei der unbehandelten Variante offenbar verstärkt in die oberirdischen Abschnitte auswich.

Bei der Analyse der Besiedlung der einzelnen Pflanzenabschnitte (Wurzel, unterer Spross, oberer Spross) war im paarweisen Vergleich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Ansatzserien feststellbar (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$). Auch die Mittelwerte der Pilzbesiedlung aller Abschnitte waren mit 34,8% für Pflanzen aus behandeltem Saatgut und 31,7% für Pflanzen aus unbehandeltem Saatgut nicht signifikant verschieden (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$). Bezogen auf die Häufigkeit ganzer Pflanzen, in denen mindestens einer der drei Abschnitte ein Signal ergab (bei 81,8% der Pflanzen aus behandeltem Saatgut bzw. 61,9% aus unbehandeltem Saatgut, Daten nicht gezeigt), war ebenfalls kein signifikanter Unterschied festzustellen (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$). Dies bedeutet, dass die gewählte Behandlung die Vitalität des im Inneren der Samen befindlichen Pilzes offenbar nicht beeinträchtigte.

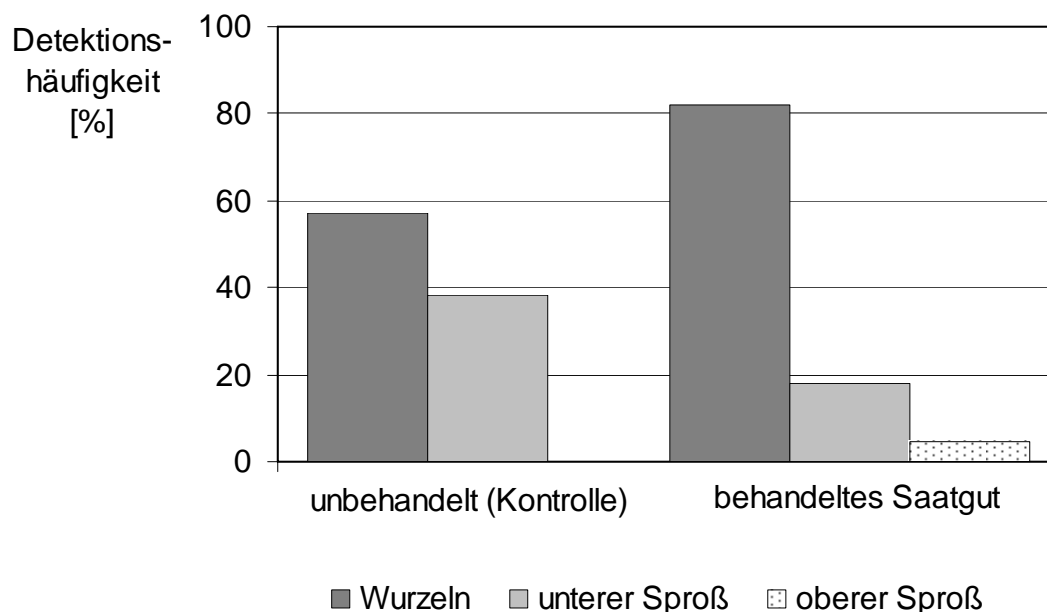


Abbildung 11: Einwuchs von *Stagonospora* 4/99-1 in Keimlinge ohne Inokulation. Nested PCR-Nachweis an 9 Wochen alten Keimlingen. Je Gruppe wurden 21 Pflanzen untersucht. Die behandelte Variante wurde vor der Aussaat einer Oberflächensterilisation mit EtOH/NaOCl/EtOH für 1/2/1 min unterzogen. Die Samen der unbehandelten Kontrolle wurden vor der Aussaat mit sterilem Wasser gewaschen. Entnommen aus Ernst et al. (2003), verändert.

Am Beispiel *Stagonospora* konnte somit sowohl bei natürlich besiedelten Keimlingen als auch adulten Schilf-Pflanzen (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1) durch PCR das Vorkommen eines samenbürtigen Endophyten in allen Teilen der Pflanze – insbesondere aber in den Wurzeln – gezeigt werden. Bei jungen Keimlingen lag hierbei eine ausgeprägte Besiedlung der Wurzeln

vor. Außerdem konnte die Vitalität des Pilzes im Samen und dessen Übertragung auf die nächste Wirtsgeneration gezeigt werden.

3.2.2 PCR-Nachweise von *Microdochium* spp.

Für Pilze der Gattung *Microdochium* konnte in der Isolierungskampagne vor Beginn dieser Arbeit im Frühjahr 1997 neben einem mit insgesamt 25,5% aller Isolate häufigen Vorkommen auch eine Bevorzugung überschwemmter Habitats insbesondere bei der Besiedlung unterirdischer Pflanzenteile (Wurzeln) festgestellt werden (Wirsel et al., 2001). Durch Untersuchung mittels nested PCR mit isolatspezifischen Primern sollte diese Habitat- und Organpräferenz der *Microdochium*-Arten mit einer kultivierungsunabhängigen Methode überprüft werden. Damit sollte das Phänomen, dass Endophyten trotz des durch die Wirtspflanze gewährten Schutzes vor direkten Umwelteinflüssen in ihrem Vorkommen durch äußere Bedingungen beeinflusst sind, eingehender untersucht werden. Für diese Untersuchungen lag der gleiche Probenatz vegetativer Pflanzenteile zugrunde (252 Gewebeproben aus 66 Pflanzen, siehe Abschnitt 3.2.1.3), der für die PCRs mit *Stagonospora* als Zielorganismus verwendet wurde. In Wirsel et al. (2001) wurden zwei Sequenzvarianten von *Microdochium* aufgezeigt (siehe Phylogramm in Wirsel et al., 2001), die ursprünglich als vier verschiedene Morphotypen gruppiert waren. Der häufigste Morphotyp wurde als *Microdochium* sp. identifiziert und ist durch die Isolate des Sequenztyps 5/97-16 repräsentiert. Daher wird dieser Sequenztyp im folgenden als *M. sp. 5/97-16-like* bezeichnet. Er ist zu 98,0% identisch zu *Microdochium phragmitis* (AJ279449) und weist 87,7% bzw. 86,5% Identität der ITS-Sequenz zu *M. nivale* CBS320.78 und CBS110.94 auf (M. Ernst, K. Neubert, K. Mendgen & S. Wirsel, Manuskript in Vorbereitung; Abbildung 12, Daten von K. Neubert & S. Wirsel). Der zweithäufigste Morphotyp wurde als *Microdochium bolleyi* (Sprague) de Hoog und Hermanides-Nijhof identifiziert. Die Sequenzen dieses Typs sind zu 100% identisch zu *Microdochium bolleyi* CBS137.64 und zu 93,4% identisch zu *Microdochium nivale* (AF067642). Dieser Sequenztyp wird daher im folgenden als *M. bolleyi 5/97-54-like* bezeichnet. Zwischen den beiden Sequenztypen 5/97-16 und 5/97-54 liegt 86,3% Identität vor. Die beiden übrigen Morphotypen wurden seltener gefunden. Nur einer von ihnen wurde bei Verfeinerung und Ausweitung der Analysen als neuer Sequenztyp identifiziert. Für diesen lag nur ein Isolat vor. Es wird im folgenden mit 5/97-66 bezeichnet und liegt nahe bei *M. sp. 5/97-16-like* (98,0% Identität). Es weist 100% Identität zu *M. phragmitis* Sydow, Isolat CBS285.71 auf (Abbildung 12). Dieses Isolat stammte ursprünglich aus einem Teleutosorus von *Puccinia* sp. auf Schilf in Polen und wurde 1966 von W. Gams bei der CBS hinterlegt. Somit gibt es wahrscheinlich drei Arten der Gattung *Microdochium* am Bodensee: *M. bolleyi*, *M. sp. 5/97-16-like* und *M. phragmitis*. Die Referenz *M. nivale* findet am Bodensee keine Entsprechungen.

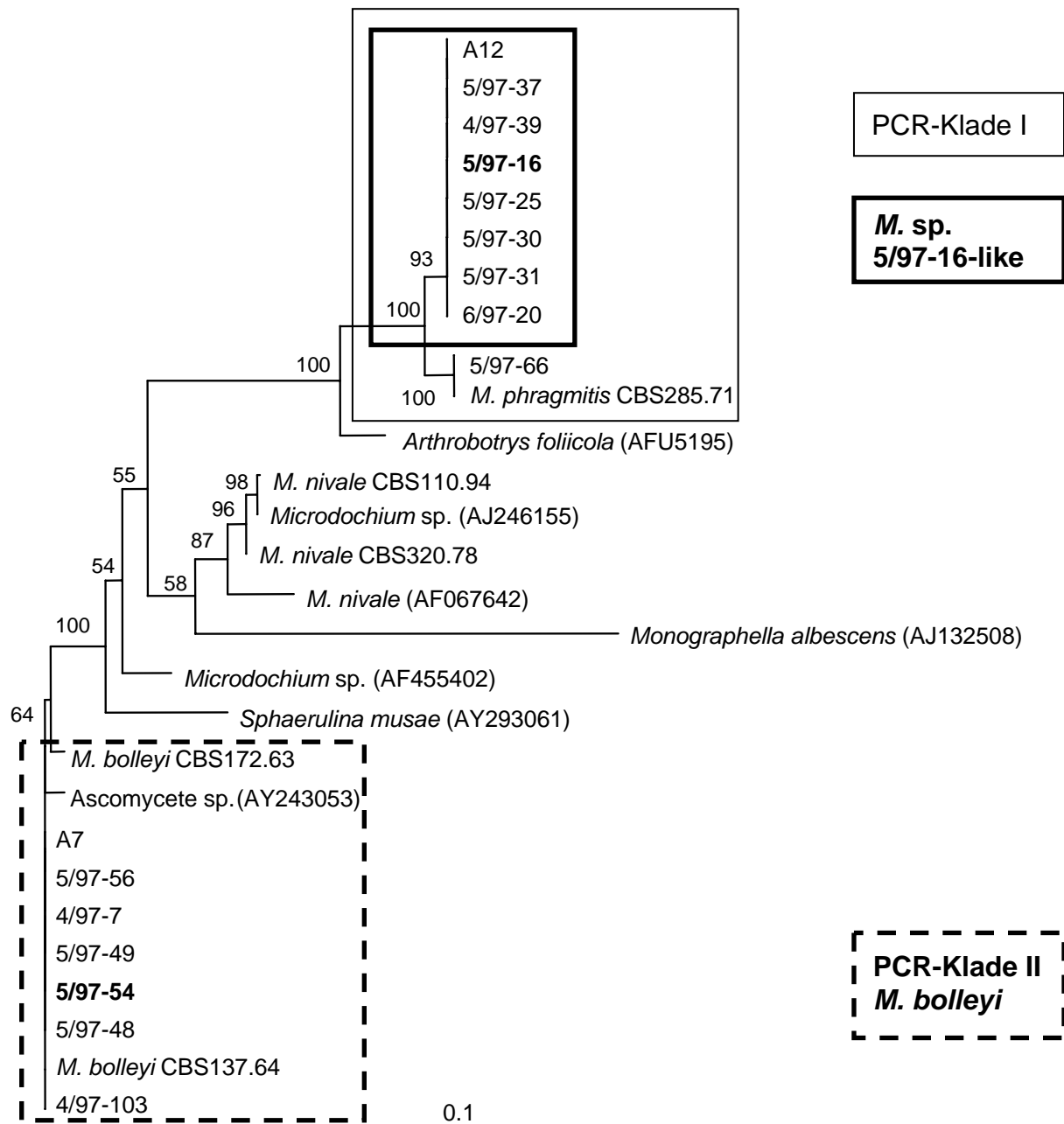


Abbildung 12: Molekulare Phylogenie von *Microdochium* spp. Verwendet wurden die ITS1-5,8S-ITS2-Sequenzen der rDNA. Neben Isolaten vom Bodensee und Referenzstämmen von der CBS wurden *Microdochium*-Sequenzen aus Datenbanken sowie jene nahegelegener BLAST-Treffer verwendet. Bootstrap-Werte über 50% sind angegeben. Hinter Referenz-Arten ist die Stammnummer der CBS bzw. die Accession-Nummer für die Datenbanken angegeben. Übereinstimmende Sequenztypen bzw. durch ITS-PCR nicht unterscheidbare Gruppen (vgl. Abschnitt 3.2.2.1) wurden durch Rahmen gekennzeichnet. Unveröffentlichte, vorläufige Daten von Karin Neubert & Dr. Stefan Wirsal, verändert.

3.2.2.1 Spezifitätstests für *Microdochium*-Primer

Die Spezifität der nested PCR-Nachweise für die beiden *Microdochium*-Arten wurde durch Reaktionsansätze mit DNA aus verschiedenen Pilzen als Negativkontrollen geprüft. Im ersten PCR-Schritt wurde mit den allgemeinen Pilzprimern ITS1-F und ITS4 erwartungsgemäß aus allen Templates ein Produkt erhalten (Abbildung 13 A). Im zweiten PCR-Schritt zeigte nur der aus dem jeweiligen Zielpilz stammende Ansatz ein PCR-Produkt (Abbildung 13 B und C). Die erhaltenen Fragmentgrößen entsprachen mit einer Größe von ca. 380 bp den theoretisch erwarteten Werten von 372 bp (für 5/97-16) bzw. 371 bp (für 5/97-54). Das Isolat *Microdochium phragmitis* 5/97-66, welches phylogenetisch nahe *M. sp.* 5/97-16 steht (vgl. Abschnitt 3.2.2 und Abbildung 12), wurde durch das für *M. sp.* 5/97-16 entworfene Primerpaar ebenfalls erfasst. Da zwischen diesen Sequenzgruppen keine Unterscheidung durch das ITS-PCR-System möglich war, werden sie im folgendem bei der Darstellung der nested PCR-Ergebnisse vereinfachend als PCR-Klade I bezeichnet (Abbildung 12). Die Sequenzgruppe *M. bolleyi* erhält die Bezeichnung PCR-Klade II.

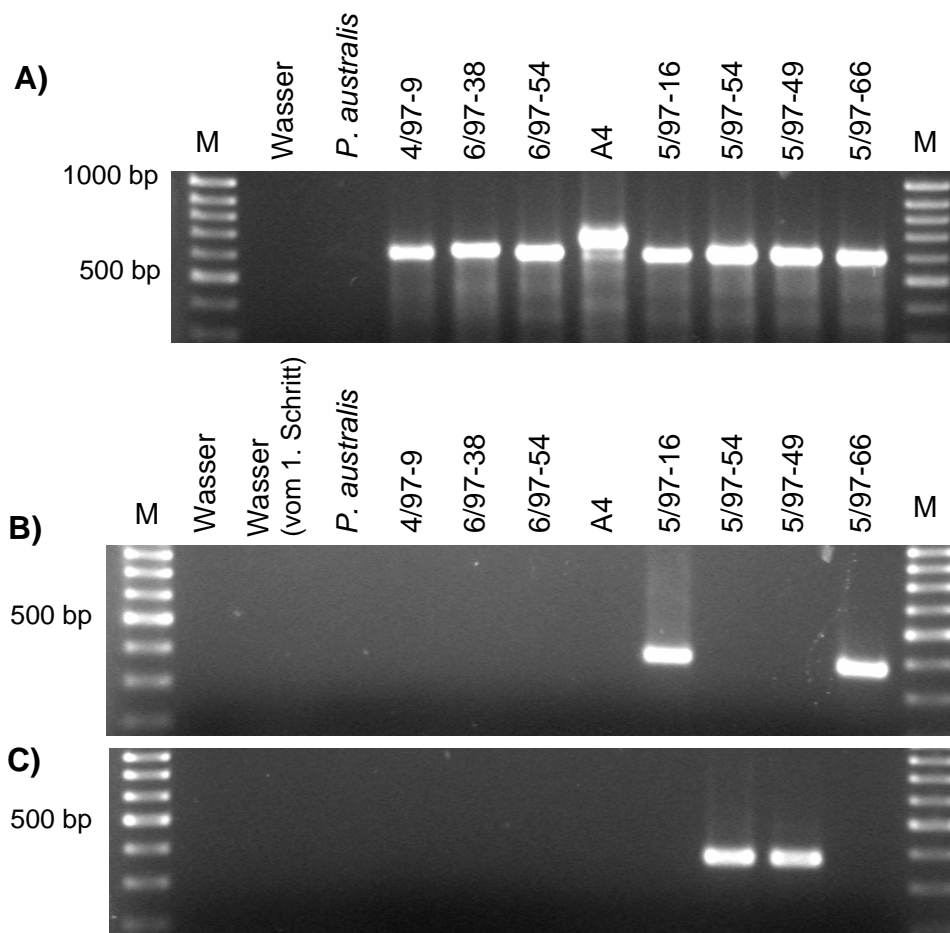


Abbildung 13: Spezifitätstests für die Primer für *Microdochium* spp. A) Erster Schritt der nested PCR mit den allgemeinen Pilzprimern ITS1-F und ITS4. Amplifikation aus genomischer Pilz-DNA. Auftrag: M = 100 bp Molekulargewichtsstandard, Wasser = Negativkontrolle (PCR-Ansatz mit H₂O), *P. australis* = Negativkontrolle mit DNA aus a-

xenischem Schilf, 4/97-9 = *Humicola* sp., 6/97-38 = *Chaetomium* sp., 6/97-54 = *Fusarium* sp., A4 = *Fusarium* sp., 5/97-16 = *Microdochium* sp., 5/97-54 = *Microdochium bolleyi*, 5/97-49 = *M. bolleyi*, abweichender Morphotyp, 5/97-66 = *Microdochium phragmitis*. B) Zweiter Schritt der nested PCR. 10000fache Verdünnungen der ersten Reaktion wurden mit spezifischen Primern für die ITS-Region von *Microdochium* sp., Sequenztyp 5/97-16 amplifiziert. C) Zweiter Schritt der nested PCR. 10000fache Verdünnungen der ersten Reaktion wurden mit spezifischen Primern für die ITS-Region von *Microdochium bolleyi*, Sequenztyp 5/97-54 amplifiziert. Auftragsreihenfolge wie bei B.

3.2.2.2 PCR-Nachweis von *Microdochium* spp. in Freiland-Proben

3.2.2.2.1 Vorkommen an den verschiedenen Bodensee-Standorten und Verteilungsmuster in der Pflanze

Während des Beprobungszeitraumes waren die untersuchten Arten *Microdochium* spp. PCR-Klade I (Sequenztyp *M. sp.* 5/97-16-like einschließlich des durch ITS-PCR davon nicht unterscheidbaren Typs 5/97-66, vgl. Abbildung 12) und PCR-Klade II (*M. bolleyi*) am Bodensee durchgehend nachzuweisen, wobei die gesamte Detektionshäufigkeit je nach Jahr und Art zwischen 6,3% und 25% bzw. 30,2% schwankte (Tabelle 17). Für PCR-Klade I betrug die mittlere Detektionshäufigkeit 21,5% und für PCR-Klade II 26,7%. Hieraus können beide Typen als am Bodensee weit verbreitet angesehen werden. Aufgrund der nicht-quantitativen, sehr sensitiven PCR kann daraus jedoch – ebensowenig wie bei *Stagonospora* – keine Aussage über die tatsächlich vorhandene Pilzmycelmasse getroffen werden.

Tabelle 17: Vorkommen von *Microdochium* spp. am Bodensee über mehrere Jahre. Die nested PCR-Ergebnisse der verschiedenen Pflanzenteile (ohne Samen) und Standorte wurden für jedes Jahr bzw. für jede Standort/Habitat-Kombination zusammengefasst. Abkürzungen: R = Reichenau, M = Mainau, Ü = überschwemmt, T = trocken, n.d.: keine Daten vorhanden. * Der Mittelwert wurde unter Berücksichtigung der variablen Probenzahlen gebildet.

Jahr	Relative Häufigkeit PCR-Signale [%]										Gesamtanzahl beprobter Pflanzenteile aller 4 Standorte
	PCR-Klade I <i>Microdochium</i> sp.					PCR-Klade II <i>Microdochium bolleyi</i>					
	RÜ	RT	MÜ	MT	Gesamt (Mittelwert)	RÜ	RT	MÜ	MT	Gesamt (Mittelwert)	
1998	0,0	0,0	25,0	0,0	6,3	0,0	25,0	0,0	0,0	6,3	16
1999	12,5	0,0	62,5	25,0	25,0	12,5	25,0	37,5	37,5	28,1	32
2000	11,1	22,7	42,2	15,6	22,9	31,1	31,8	13,3	44,4	30,2	180
2001	n.d.	n.d.	25,0	8,3	16,7	n.d.	n.d.	0,0	25,0	12,5	24
Mittelwert*	10,5	17,9	40,6	14,5	21,5	26,3	30,4	13,0	37,7	26,7	Σ = 252
R gesamt	14,2		-		-	28,3		-		-	114
M gesamt	-		27,5		-	-		25,4		-	138
Ü gesamt (R+M)	27,0		-		-	19,0		-		-	126
T gesamt (R+M)	16,0		-		-	34,4		-		-	126

Die Verteilung beider Gruppen am Bodensee wies Unterschiede zwischen den Standorten auf: PCR-Klade I kam insgesamt mit 14,2% Häufigkeit am Standort Reichenau und mit 27,5% am Standort Mainau vor. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Binomialverteilungstest, $p < 0,05$). Er resultierte aus einer deutlichen Bevorzugung des überschwemmten Mainauer Habitates (Tabelle 17). PCR-Klade II (*M. bolleyi*) kam mit 28,3% Häufigkeit am Standort Reichenau und mit 25,4% am Standort Mainau vor, womit sich die Besiedlung der beiden Standorte nicht signifikant unterschied (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$). Sie kam jedoch im überschwemmten Mainauer Habitat mit geringerer Detektionshäufigkeit vor, als auf den anderen Standorten.

Für beide Arten nahm das Habitat Mainau-überschwemmt somit Extremwerte ein: Die eine Art zeigte bevorzugtes Auftreten in dem als durch Hochwasser (1999) stark geschädigt klassifizierten Schilfbestand, während die andere diesen offenbar mied. Ob diese Differenzen in der Besiedlungshäufigkeit Ursache oder Folge der an den Standorten vorliegenden unterschiedlichen Schädigungsgrade der Schilfbestände waren (siehe Abschnitt 2.1.1) oder ob andere Faktoren als Ursache vorlagen, kann hier jedoch nicht geklärt werden.

Die Analyse der Besiedlung überschwemmter im Vergleich zu trockenen Habitaten zeigte für die Gesamtheit aller Standorte und Pflanzenteile eine bei beiden Pilzen entgegengesetzte signifikante Bevorzugung eines bestimmten Habitatstyps (Binomialverteilungstest, $p < 0,05$). Für PCR-Klade I wurde hierbei mit 27,0% Nachweishäufigkeit die signifikante Bevorzugung des überschwemmten Habitats gegenüber dem trockenen mit 16,0% festgestellt. Dagegen zeigte PCR-Klade II eine signifikante Bevorzugung des trockenen Habitatstyps mit 34,4% gegenüber 19,0% Häufigkeit im überschwemmten Habitat. Aufgrund dieser gegenläufigen Bevorzugung wurde dieses Phänomen detaillierter untersucht (siehe Abschnitt 3.2.2.2.3).

Für PCR-Klade I zeigte die Verteilung des Pilzes auf die einzelnen Pflanzenteile eine stärkere Besiedlung der unterirdischen Teile im Vergleich zu den oberirdischen. Dies traf auch auf PCR-Klade II zu. Bei beiden Kladen waren die Wurzeln jeweils das am stärksten besiedelte Pflanzenteil (Tabelle 18; siehe auch Abbildung 17).

Tabelle 18: Verteilungsmuster der *Microdochium*-Arten in den verschiedenen Teilen der Schilfpflanze. Angegeben ist die relative PCR-Detektionshäufigkeit innerhalb jedes Organtyps. Die nested PCR-Ergebnisse von vier verschiedenen Standorten und verschiedenen Jahrgängen wurden zusammengefasst. Zur Verfügung standen insgesamt 252 Gewebeproben aus 66 Schilfpflanzen. Signifikanzangaben für Unterschiede zwischen den Pflanzenteilen gemäss Binomialverteilungstest; verschiedenartige Buchstaben = signifikanter Unterschied ($p < 0,0083$ infolge Bonferroni-Korrektur), gleichartige Buchstaben = kein signifikanter Unterschied.

Pflanzenteil	PCR-Klade I <i>Microdochium</i> sp.		PCR-Klade II <i>Microdochium bolleyi</i>		Signifikanter Unterschied zwischen beiden Typen
	Relative Häufigkeit [%]	Signifikanz	Relative Häufigkeit [%]	Signifikanz	
Blatt	13,0	A	13,0	A	nein
Halm	19,7	AB	19,7	A	nein
Rhizom	13,8	A	21,5	A	nein
Wurzel	37,9	B	50,0	B	nein

Für beide Kladen war die Besiedlung der oberirdischen Pflanzenteile untereinander und auch zum Rhizom nicht signifikant verschieden, dagegen fand sich bei der Besiedlung der Wurzeln eine signifikante Bevorzugung (Binomialverteilungstest, $p < 0,0083$ infolge Bonferroni-Korrektur, Tabelle 18). Zwischen beiden Kladen existierte kein signifikanter Unterschied der Präferenz für bestimmte Pflanzenabschnitte (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$). Die beiden *Microdochium*-Kladien wurden somit im Schilf in allen Pflanzenteilen nachgewiesen, wie das auch bei *Stagonospora* der Fall war (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1). Sie kamen jedoch im Gegensatz zu diesem bevorzugt in den unterirdischen Pflanzenteilen vor.

3.2.2.2.2 Vorkommen von *Microdochium* spp. im saisonalen Verlauf

Die Analyse des Vorkommens der beiden *Microdochium*-Arten im jahreszeitlichen Verlauf zeigt, dass diese während der ganzen Vegetationsperiode vorkamen (Abbildung 14). Für beide Kladien war in den warmen Sommermonaten Juli, August und September eine geringere Detektionshäufigkeit festzustellen, als während der kühleren Monate im Frühjahr und Spätherbst. Diese Abnahme war bei *M. sp.* Klade I (5/97-16-like) ausgeprägter und von längerer Dauer als bei Klade II (*M. bolleyi*). Durch Zusammenfassung der einzelnen Pflanzenteile zu einem Wert pro Monat wird dies noch klarer herausgestellt (Abbildung 15). Die Detektionshäufigkeit der Klade II lag während der Monate Juli, August und September insgesamt höher als bei Klade I. Statistische Analyse zeigte für beide Kladien beim Vergleich innerhalb jedes Organtyps der selben Art keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Monaten (Abbildung 14, Binomialverteilungstest, $p > 0,05$; Signifikanzgrenzen $p = 0,005$ für Blätter, bzw. $p = 0,0033$ für Halme, Wurzeln und Rhizome infolge Bonferroni-Korrekturen für den Vergleich aller Monate untereinander). Die fehlende Signifikanz trotz vorhandener Unterschiede der Werte resultierte aus der relativ geringen Stichprobenzahl für die Kombination Pflanzenteil und Monat ($n = 8-12$, im Mittel 11). Beim monatsweisen Vergleich der Wurzel-

besiedlung zwischen beiden Kladen wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$). Für die übrigen Organe wurden wegen uneinheitlichem Vorkommen der PCR-Signale kein Vergleich zwischen den Kladen durchgeführt (vgl. Abbildung 14). Die Untersuchung der zusammengefassten Daten (Abbildung 15) zeigte für Klade I beim Vergleich des Monats April, also dem Beginn der Vegetationsperiode, mit den Folgemonaten eine Signifikanz des Unterschiedes zu Juli (Binomialverteilungstest, $p < 0,01$ infolge Bonferroni-Korrektur). Auch der Vergleich der niedrigsten Nachweishäufigkeit im Monat Juli mit der höchsten im November zeigte einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$). Für Klade II lagen bei diesem Vergleich keine signifikanten Unterschiede vor ($p > 0,05$; Signifikanzgrenze bei $p = 0,01$ infolge Bonferroni-Korrektur). Für den Vergleich aller Monate untereinander lagen bei beiden Kladen keine signifikanten Unterschiede vor (Binomialverteilungstest, $p < 0,0033$ infolge Bonferroni-Korrektur). Ebenso wurden beim monatsweisen Vergleich beider *Microdochium*-Kladen miteinander keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$; Signifikanzgrenze bei $p = 0,0083$ infolge Bonferroni-Korrektur). Dass dennoch gewisse Unterschiede im saisonalen Verhalten beider Kladen bestanden, ist durch das Vorkommen von signifikanten Unterschieden bei Klade I (April-Juli, Juli-November) belegt, während solche bei Klade II gänzlich fehlten. Beide *Microdochium*-Kladen zeigten im jeweils paarweisen Vergleich signifikante Unterschiede zu *Stagonospora* (Binomialverteilungstest, $p < 0,0083$; Abbildung 15). Somit wies das Vorkommen von *Microdochium* spp. am Bodensee insgesamt keine mit *Stagonospora* vergleichbare, im Laufe der Vegetationsperiode zunehmende Tendenz auf, sondern einen gleichmäßigeren, zur Abnahme im Sommer neigenden Verlauf (Abbildung 15, vgl. auch Abbildung 10).

Durch Sequenzierung von PCR-Produkten (je eine Wurzel-, Rhizom-, Halm- und Blatt-Probe pro Primerpaar), BLAST-Suche, Zusammensetzung im Programm SeqManII, bzw. paarweisem Alignment mit dem Martinez/Needleman-Wunsch-Programm im Modul MegAlign Version 5.03, wurde die Identität der PCR-Ergebnisse mit den Zielsequenzen aus PCR-Klade I bzw. Klade II überprüft. Hierbei wurde für die PCR-Klade II in allen vier überprüften Proben *M. bolleyi* Sequenztyp 5/97-54-like nachgewiesen. Für die PCR-Klade I wurde in einer der überprüften Proben der durch die PCR nicht unterscheidbare Sequenztyp *M. phragmitis* 5/97-66 festgestellt. In den drei übrigen Fällen wurde die Übereinstimmung mit der Zielsequenz für Klade I ebenfalls nachgewiesen. Dabei wurde nicht zwischen den Typen 5/97-16-like und 5/97-66 unterschieden. Somit wurde, wie bei *Stagonospora* auch (siehe Abschnitt 3.2.1.3.2), die Verlässlichkeit des PCR-Systems bzw. der Primerspezifität bestätigt.

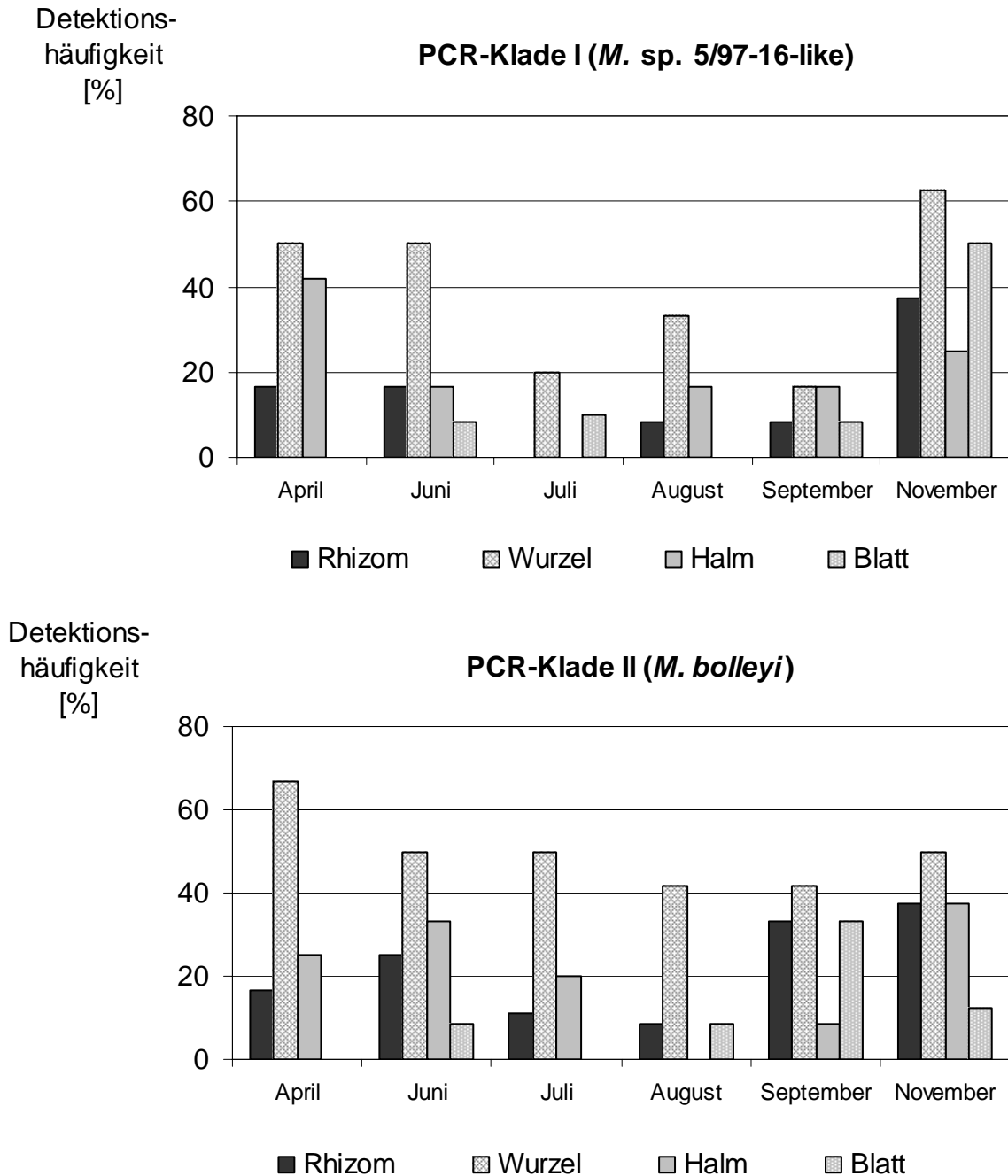


Abbildung 14: Saisonale Sukzession von *Microdochium* spp. Dargestellt ist die relative Detektionshäufigkeit der Signale in der nested PCR. Der nested PCR-Nachweis erfolgte an 252 Organen aus 66 *Phragmites australis*-Pflanzen vom Bodensee. Vier verschiedene Standorte bzw. Habitate, sowie die gleichen Monate verschiedener Jahrgänge wurden zusammengefasst. Das Probenmaterial war identisch mit jenem für den Nachweis von *Stagonospora* (siehe Abbildung 10); Samen wurden hierbei nicht untersucht. Im April waren keine Blätter, sondern nur zu den Halmen gezählte Schösslinge mit nicht entfalteten Blättern vorhanden. Die Unterschiede beim Vergleich der verschiedenen Monate innerhalb jedes Organtyps einer Art waren bei keiner der beiden Kladen statistisch signifikant (Binomialverteilungstest, $p > 0,05$; Signifikanzgrenzen $p = 0,005$ für Blätter, bzw. $p = 0,0033$ für Halme, Wurzeln und Rhizome infolge Bonferroni-Korrekturen für den Vergleich aller Monate untereinander). Daher wurde auf eine Kennzeichnung verzichtet.

Detektions-
häufigkeit
[%]

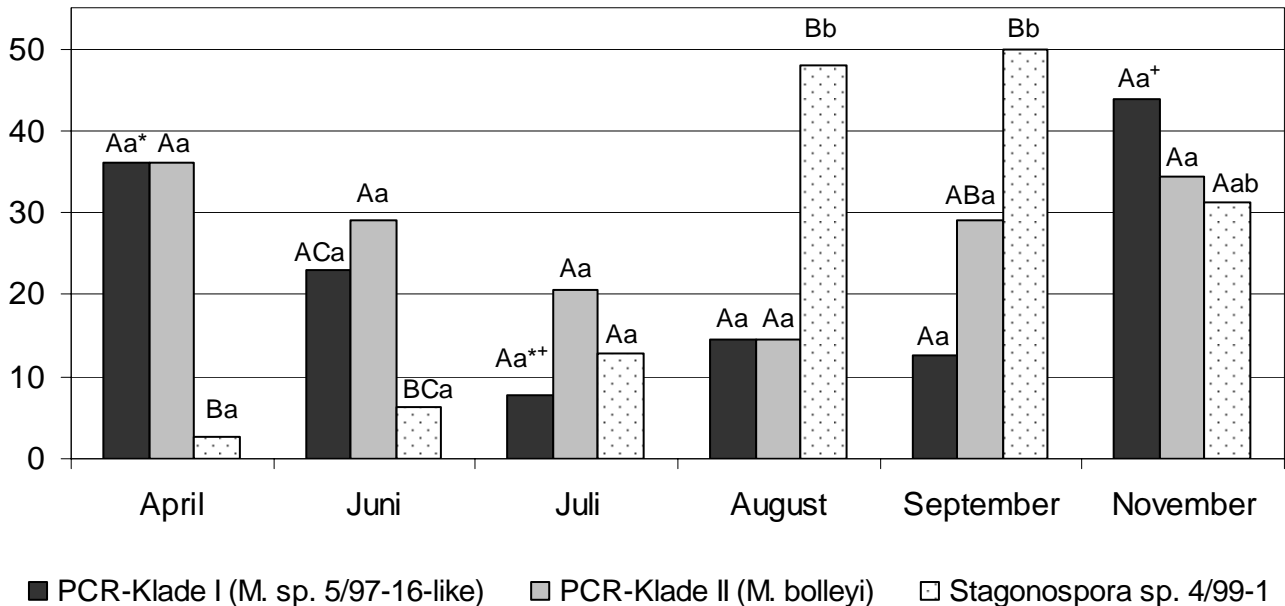


Abbildung 15: Saisonale Sukzession von *Microdochium* spp. im Vergleich mit *Stagonospora* sp. 4/99-1. Relative Detektionshäufigkeit in der nested PCR. Zusammengefasste Darstellung der Daten der einzelnen Pflanzenteile des nested PCR-Nachweises der beiden *Microdochium*-PCR-Kladen aus Abbildung 14 und von *Stagonospora* sp. 4/99-1 aus Abbildung 10. Signifikanzangaben: Verschiedene Buchstaben = signifikanter Unterschied, gleiche Buchstaben = kein signifikanter Unterschied. Große Buchstaben: Vergleich zwischen verschiedenen Arten innerhalb des selben Monats (Binomialverteilungstest, $p < 0,0083$ infolge Bonferroni-Korrektur). Die Arten wurden jeweils paarweise miteinander verglichen. Kleine Buchstaben: Vergleich innerhalb einer Art zwischen den Monaten (Binomialverteilungstest, $p < 0,0033$ infolge Bonferroni-Korrektur für den Vergleich aller Monate untereinander), * signifikanter Unterschied für die Kombination April-Juli beim paarweisen Vergleich des Ausgangsmonates April mit den Folgemonaten (Binomialverteilungstest, $p < 0,01$ infolge Bonferroni-Korrektur für geringere Anzahl Signifikanztests), + signifikanter Unterschied für den Vergleich der minimalen mit der maximalen Detektionshäufigkeit ($p < 0,01$).

3.2.2.2.3 Habitatpräferenz

Die bereits beschriebene, für die Gesamtheit der Standorte und Pflanzenteile bei beiden *Microdochium*-PCR-Kladen festgestellte entgegengesetzte Habitatspräferenz (siehe Abschnitt 3.2.2.2.1) wurde bezüglich der Besiedlung der einzelnen Pflanzenteile detaillierter analysiert (Abbildung 16). Bei PCR-Klade I konnte durch die PCR eine signifikante Präferenz für Wurzeln der überschwemmten Uferzone gegenüber Wurzeln der trockenen Uferzone festgestellt werden (Binomialverteilungstest, $p < 0,025$ infolge Bonferroni-Korrektur). Ein signifikanter

Unterschied zwischen den Zonierungen lag bei den anderen Pflanzenteilen (Blatt, Halm, Rhizom) nicht vor. Dagegen zeigte PCR-Klade II eine hoch signifikante Bevorzugung von Wurzeln der trockenen Uferzone im Gegensatz zur überschwemmten Zone (Binomialverteilungstest, $p < 0,001$). Für die anderen Pflanzenteile konnte, wie auch bei Klade I, kein signifikanter Unterschied zwischen den Zonierungen festgestellt werden. Der direkte Vergleich zwischen beiden *Microdochium*-Arten zeigte einen signifikanten Unterschied nur bei der Besiedlung der Wurzeln der gleichen Uferzone (Binomialverteilungstest, $p < 0,025$ infolge Bonferroni-Korrektur). Dieser Unterschied war insbesondere für die Wurzeln des trockenen Habitates hoch signifikant ($p < 0,001$; Abbildung 16). Für die anderen Pflanzenteile der jeweils gleichen Uferzonierung bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Arten.

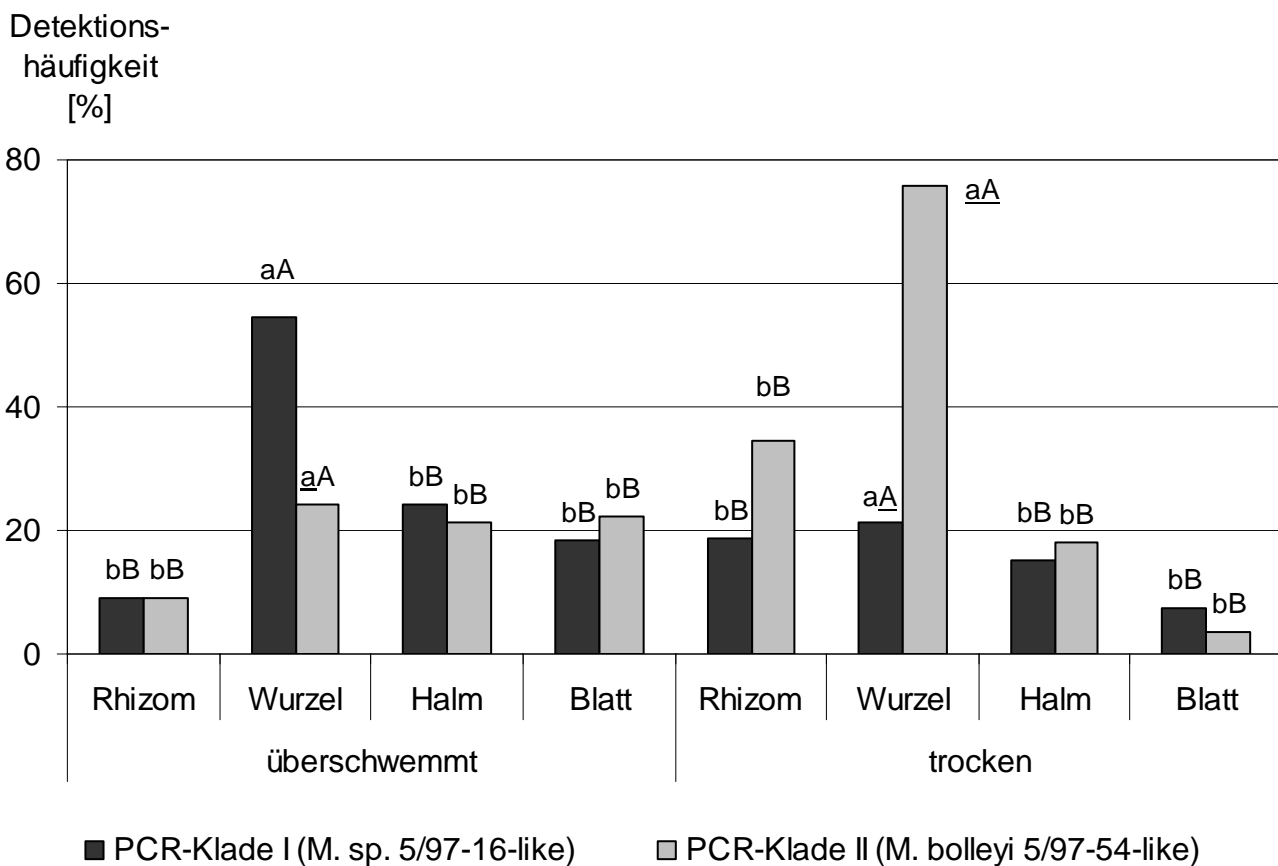


Abbildung 16: Habitatspräferenz von *Microdochium* spp. Dargestellt ist die relative Detektionshäufigkeit in der nested PCR pro Pflanzenteil und Habitatstyp; es liegt der gleiche Datensatz wie bei der saisonalen Sukzession (Abbildung 14) zugrunde. Signifikanzangaben: Kleine Buchstaben: Vergleich für jedes Pflanzenteil zwischen den Habitatstypen innerhalb einer Pilzart, a = signifikanter Unterschied (Binomialverteilungstest, $p < 0,025$ infolge Bonferroni-Korrektur), b = kein signifikanter Unterschied. Große Buchstaben: Vergleich zwischen beiden Pilzarten bei jeweils identischem Pflanzenteil und identischem Habitatstyp, A = signifikanter Unterschied (Binomialverteilungstest, $p < 0,025$), B = kein signifikanter Unterschied. Unterstrichene Buchstaben = signifikanter Unterschied bei $p < 0,001$ (verschärfte Signifikanzgrenze zur Aufzeigung des erhöhten Signifikanzniveaus).

Somit ist erkennbar, dass die für die zusammengefassten Daten festgestellte gegenläufig signifikante Habitatsbevorzugung nur auf den signifikanten Unterschieden bei der Besiedlung der Wurzeln als am stärksten besiedelten Pflanzenteil basierte. Dagegen waren die übrigen Pflanzenteile gleichmäßiger und weniger häufig besiedelt. Ebenso wird deutlich, dass in der Wurzel als dem am stärksten besiedelten Pflanzenteil jeweils nur eine der beiden PCR-Kladen dominierte und die andere zurücktrat. Dies wiederum deutet eine Tendenz der räumlichen Trennung beider Kladen an, die offenbar verschiedene Nischen besetzen.

3.2.2.2.4 Gemeinsames Vorkommen beider *Microdochium*-Arten

Die für beide *Microdochium*-Arten aus identischen DNA-Präparationen durchgeführten oben beschriebenen nested PCR-Tests (Abschnitte 3.2.2.2.1 und 3.2.2.2.2) ermöglichten eine Analyse des gemeinsamen Vorkommens beider Arten bzw. der Vertreter beider PCR-Kladen in Pflanzen natürlicher Habitats.

Trotz der beobachteten gegenläufigen Tendenz beim Auftreten an Wurzeln überschwemmter bzw. trockener Standorte kamen Vertreter beider Kladen oft auch gemeinsam in der selben Probe vor (Abbildung 17).

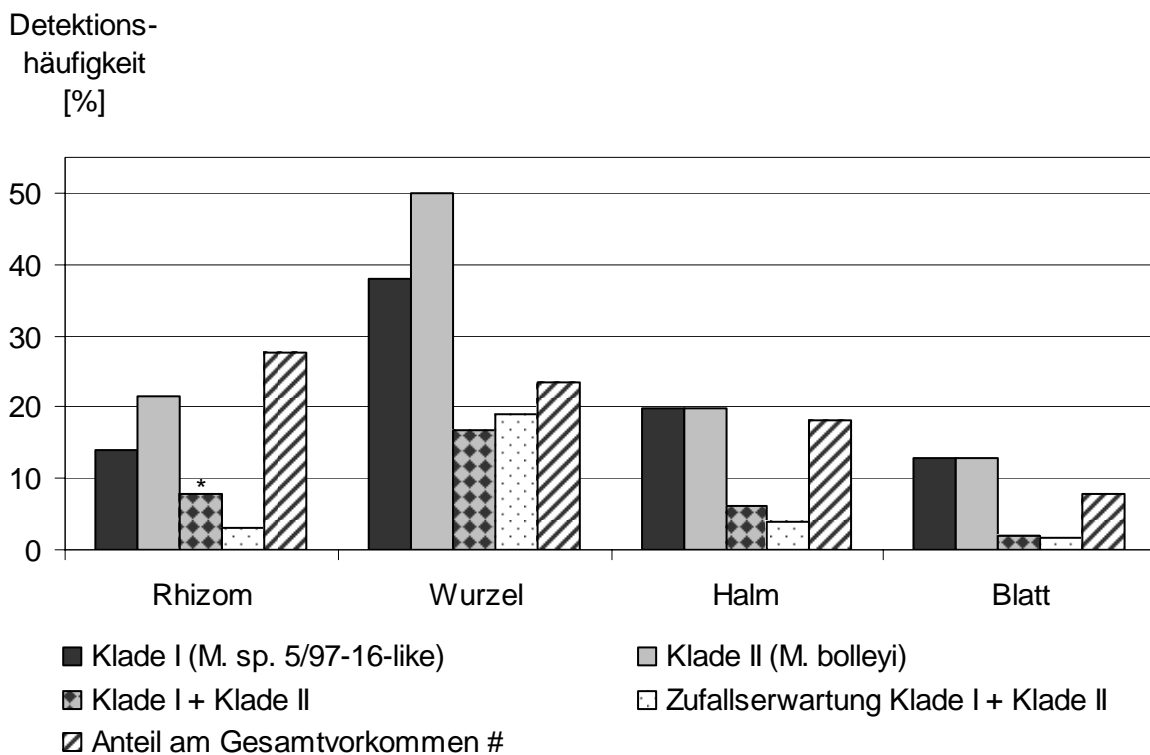


Abbildung 17: Gemeinsames Vorkommen der *Microdochium*-Arten. Dargestellt ist die relative Detektionshäufigkeit in der nested PCR für die beiden PCR-Kladen und deren gemeinsames Vorkommen in der selben Probe, bezogen auf alle verfügbaren Proben eines Organtyps (54 Blatt- und je 66 Halm-, Wurzel- und Rhizomproben). # Der Anteil am Gesamtvorkommen repräsentiert die relative Häufigkeit des gleichzeitigen Vorkommens beider Arten in der Gesamtheit jener Proben, in denen mindestens einer der beiden Typen nachgewiesen wurde. * signifikant verschieden vom Erwartungswert der Zufallsverteilung (Fisher's Exact Test, $p < 0,05$). Der zugrunde liegende Datensatz entspricht jenem aus Abbildung 14.

Für die Gesamtheit aller untersuchten Pflanzenteile betrug das gemeinsame Vorkommen beider Kladen 8,4%. Beide Kladen kamen in den unterirdischen Pflanzenteilen häufiger gemeinsam vor als in den oberirdischen. In Rhizomen traten sie mit einer gemeinsamen Häufigkeit von 7,7%, in Wurzeln mit 16,7%, in Halmen mit 6,1% und in Blättern mit 1,9% Häufigkeit auf. Im Verhältnis zum generellen Ausmaß der Besiedlung einzelner Pflanzenteile war das gemeinsame Vorkommen am stärksten im Rhizom und am geringsten im Blatt ausgeprägt (Abbildung 17, Anteil am Gesamtvorkommen, schräg schraffierte Balken). Die relative Häufigkeit des gemeinsamen Vorkommens beider Arten in der Gesamtheit jener Proben, in denen Vertreter von mindestens einer der beiden Kladen nachgewiesen wurden, betrug für Rhizome 27,8%, für Wurzeln 23,4%, für Halme 18,2% und für Blätter 7,7% (Abbildung 17). Das gemeinsame Vorkommen in der Gesamtheit aller Pflanzenteile lag mit 21 Ereignissen statistisch signifikant über dem theoretischen Erwartungswert einer Zufallsverteilung mit 14,4 Ereignissen (Fisher's Exact Test, $p < 0,05$). Somit war das gemeinsame Auftreten der beiden *Microdochium*-Kladen begünstigt, wenn man die zusammengefassten Daten untersucht. Bei Betrachtung der einzelnen Pflanzenteile war das gemeinsame Vorkommen nur in Rhizomen signifikant begünstigt mit 5 tatsächlich gefundenen Ereignissen über dem theoretischen Erwartungswert von 2 Ereignissen (Fisher's Exact Test, $p < 0,05$; Abbildung 17). Für die restlichen Pflanzenteile waren die Werte nicht signifikant verschieden vom Erwartungswert der Zufallsverteilung, d.h. es lag auch keine signifikante Erniedrigung vor, die auf Antagonismus hinweisen würde. Somit wurde bei detaillierter Betrachtung der einzelnen Pflanzenteile nur bei der Besiedlung der Rhizome ein positiver Effekt nachgewiesen. Dieser ist der wesentliche Grund für die Signifikanz der Begünstigung des gemeinsamen Vorkommens, welche für die Gesamtheit aller Pflanzenteile festgestellt wurde. Die Untersuchung des gemeinsamen Vorkommens beider Kladen nach saisonalen Aspekten zeigte, dass im Monat April ein signifikant erhöhtes gemeinsames Auftreten beider Kladen vorlag (Fisher's Exact Test, $p < 0,05$). Hierbei betrug das tatsächliche Auftreten 8 gegenüber 4,7 erwarteten Ereignissen. Für die übrigen Monate lagen keine signifikanten Abweichungen vom Erwartungswert vor (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.2.5 Gemeinsames Auftreten der Gattungen *Stagonospora* und *Microdochium*

Die Durchführung der nested PCR-Tests aus dem gleichen Probenmaterial ermöglichte eine Analyse des gemeinsamen Vorkommens von Vertretern der beiden PCR-Kladen der Gattung *Microdochium* mit der Art *Stagonospora* sp. 4/99-1 hinsichtlich Bevorzugung oder Vermeidung eines gemeinsamen Vorkommens. Kultivierungsunabhängige Informationen über gemeinsames Vorkommen bzw. gegenseitigen Ausschluss oder Vermeidung am natürlichen Standort sind hilfreiche Ergänzungen zu Ergebnissen aus *in vitro*-Kompetitionstests auf künstlichen Medien (siehe Abschnitt 3.6.2).

Für die Kombination *Stagonospora* 4/99-1 // PCR-Klade II (*M. bolleyi*) lag das gemeinsame Vorkommen in der Gesamtheit aller Pflanzenteile mit 14 Ereignissen unter dem theoretischen Erwartungswert einer Zufallsverteilung mit 17,6 Ereignissen. Dieses Ergebnis war jedoch weder mit Fisher's Exact Test noch mit dem weniger strikten Chi-Quadrat-Test statistisch signifikant (jeweils $p > 0,05$). Auch für die einzeln getesteten verschiedenen Organtypen bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Für die Kombination *Stagonospora* 4/99-1 //

PCR-Klade I (*M. sp. 5/97-16-like*) lag das gemeinsame Vorkommen in der Gesamtheit aller Pflanzenteile mit 12 Ereignissen auch unter dem theoretischen Erwartungswert einer Zufallsverteilung mit 14,2 Ereignissen. Diese Abweichung war ebenfalls nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). Für die einzeln getesteten verschiedenen Organtypen bestand auch kein signifikanter Unterschied (Fisher's Exact Test, $p > 0,05$). Eine Analyse unter saisonalen Aspekten wurde für die Kombination von *Stagonospora* mit jeder der beiden *Microdochium*-Kladen für die Monate April bis November ebenfalls durchgeführt, wobei die Pflanzenteile für jeden Monat zusammengefasst wurden. Für keinen der sechs getesteten Monate konnten signifikante Abweichungen vom Erwartungswert einer Zufallsverteilung festgestellt werden (Fisher's Exact Test und Chi-Quadrat-Test, jeweils $p > 0,05$).

Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz ist somit eine Begünstigung oder Vermeidung des gemeinsamen Auftretens der Vertreter beider Gattungen am vorhandenen Probenmaterial vom Bodensee nicht nachweisbar.

3.2.3 PCR-Nachweis von *Trichoderma*

Für die Gattung *Trichoderma* wurde in einer Isolierungskampagne vor Beginn dieser Arbeit im Frühjahr 1997 neben einem häufigen Vorkommen (9,9% aller Isolate) zusätzlich eine stark bevorzugte Besiedlung von Wurzeln in trockenen Uferhabitaten festgestellt (Wirsel et al., 2001). Durch einen Nachweis mittels PCR mit isolatspezifischen Primern für die ITS-Region von *Trichoderma sp. A11* sollte dieses Ergebnis durch ein kultivierungsunabhängiges, molekulares Verfahren überprüft werden.

Die Spezifität des PCR-Nachweises wurde durch Reaktionsansätze mit DNA aus verschiedenen nicht-verwandten Pilzen als Negativkontrolle geprüft. Hierbei erfolgte nur Amplifikation aus dem Ansatz des Zielpilzes (Abbildung 18A). Zur Kontrolle der prinzipiellen Amplifizierbarkeit aus der aus Schilf präparierten genomischen DNA wurde eine PCR mit spezifischen Primern für die ITS-Region von *Phragmites australis* durchgeführt. Sie zeigte bei allen Ansätzen erfolgreiche Amplifikation. Die erhaltene PCR-Fragmentgröße entsprach mit ca. 400 bp der theoretisch erwarteten Größe von 385 bp (Abbildung 18B).

Bei der PCR mit den allgemeinen Pilzprimern ITS1-F und ITS4 erfolgte ebenfalls bei allen Ansätzen erfolgreiche Amplifikation (Daten nicht gezeigt). In der nested PCR mit spezifischen Primern für *Trichoderma* wurden PCR-Signale nur bei Ansätzen mit Wurzeln trockener Standorte detektiert (Abbildung 18C). In seltenen Fällen wurden sehr schwache Signale auch von anderen Pflanzenteilen, bzw. Habitaten erhalten (Daten nicht gezeigt). Die erhaltene nested PCR-Fragmentgröße entsprach mit ca. 450 bp der theoretisch erwarteten Größe von 437 bp.

Der PCR-Nachweis von *Trichoderma* wurde vor den Untersuchungen bezüglich *Stagonospora* und *Microdochium* (Abschnitte 3.2.1.3 und 3.2.2.2), an einem zu diesem Zeitpunkt noch geringeren zur Verfügung stehenden Probenumfang durchgeführt. Getestet wurden insgesamt 32 Pflanzenteile (Blatt, Halm, Wurzel, Rhizom) aus 8 Pflanzen von Juli/August 1998 und August 1999, sowie insgesamt 8 Samenpools (vgl. Abschnitt 3.2.1.3.2) vom November 1998 und 1999. Hierbei wurden alle Standorte erfasst, ein saisonaler Verlauf ist jedoch nicht darstellbar (Abbildung 18 & Daten nicht gezeigt).

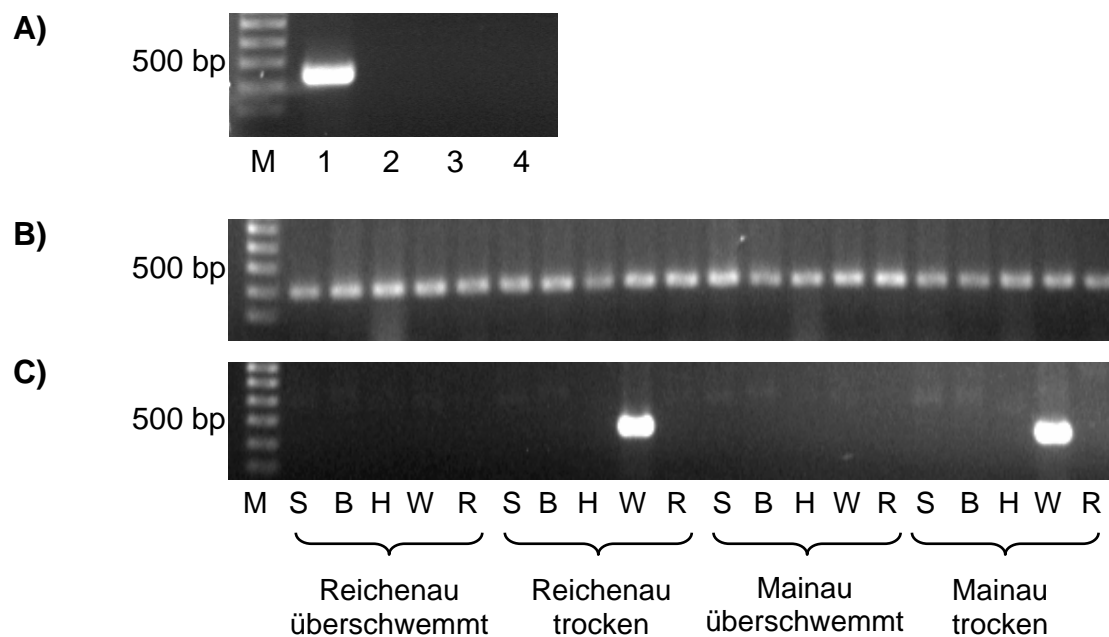


Abbildung 18: PCR-Nachweis von *Trichoderma* sp. A11. A) Spezifitätskontrolle mit spezifischen Primern für A11 und genomischer Pilz-DNA als Templates; Spuren: M = 100 bp Molekulargewichtsstandard, 1-4 PCR-Produkte aus genomischer Pilz-DNA, 1 = *Trichoderma* A11, 2 = *Cylindrocarpon* sp. 5/97-12, 3 = *Gliocladium* sp. 4/97-110, 4 = *Chaetomium* sp. 6/97-55. B) Amplifikationskontrolle mit ITS-Primern für Schilf an DNA aus Schilfproben von Bodenseehabitaten; Spuren: M = 100 bp Molekulargewichtsstandard, weitere Spuren: Je 5 Pflanzenteile von je 4 Probenahmestellen gemäß der unter Abbildung C angegebenen Auftragsreihenfolge. Abkürzungen: S = Samenpool, B = Blatt, H = Halm, W = Wurzel, R = Rhizom. C) Nested PCR mit spezifischen Primern für *Trichoderma* A11 an der gleichen Template-DNA und gleiche Auftragsreihenfolge wie bei Abbildung B. Die verwendeten vegetativen Pflanzenteile wurden im August 1999 gesammelt und stammen von einer Pflanze pro Habitat. Die Samen stammen vom November 1999 und wurden als Pools eingesetzt (vgl. Abschnitt 3.2.1.3.2). Entnommen aus Wirsal et al. (2001).

Für *Trichoderma* sp. A11 konnte somit die zuvor durch Isolierung gezeigte Bevorzugung der Wurzeln von Schilfpflanzen auf trockenen Standorten auch mit einer kultivierungsunabhängigen, molekularen Methode bestätigt werden.

3.3 Mikro- und Makrokosmen

Mikrokosmos-Experimente dienen als vereinfachte Simulation natürlicher Situationen zur Untersuchung des Einflusses einzelner oder mehrerer Umweltfaktoren und/oder Organismen auf einen Modellorganismus.

3.3.1 Etablierung axenischer Mikrokosmen

Zur störungsfreien Untersuchung des Einflusses definierter einzelner Pilzisolat wurden Mikrokosmen mit axenischen Schilfpflanzen etabliert. Die hierfür benötigten Pflanzen wurden aus Samen angezogen. Das Saatgut vom Bodensee zeigte hierbei eine von vorneherein niedrigere Keimungshäufigkeit als das kommerzielle Saatgut (Tabelle 11). Zur Behandlung wurden die Samen einer Oberflächensterilisation unterzogen, die je nach Herkunft des Saatgutes verschieden ausgearbeitet wurde (siehe Tabelle 11). Als geeignet erwies sich die Behandlung mit einer Kombination von sukzessive 70% EtOH/5% NaOCl/70% EtOH mit einer Dauer von 5 min je Schritt. Sie erlaubte bei dem kommerziellen Saatgut eine zuverlässige Elimination aller Pilzkeime bei ausreichender Keimung des Saatgutes. Das Saatgut von Bodensee-Standorten musste wegen seiner höheren natürlichen Pilzfracht zusätzlich einer Behandlung mit dem Fungizid Triforin („Saprol neu“) mit einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml durch Applikation im Gießwasser unterzogen werden (siehe Abschnitt 3.1.1 und Tabelle 11).

Der Nachweis der Sterilität der Keimlinge erfolgte mit zwei Methoden:

1. Die mikrobiologische Kontrolle erfolgte durch Auslegen von Teilen zufallsmäßig ausgewählter unter sterilen Bedingungen geernteter Keimlinge auf Malzagar (Abbildung 19 A).
2. Die molekularbiologische Kontrolle erfolgte durch PCR mit den Standardpilzprimern ITS1-F und ITS4 an DNA, die aus den Keimlingen präpariert wurde. Hierbei wurden die oberirdischen grünen Teile und die Wurzeln der in Pools zu je 20 zusammengefassten Keimlinge getrennt bearbeitet (Abbildung 19 B).

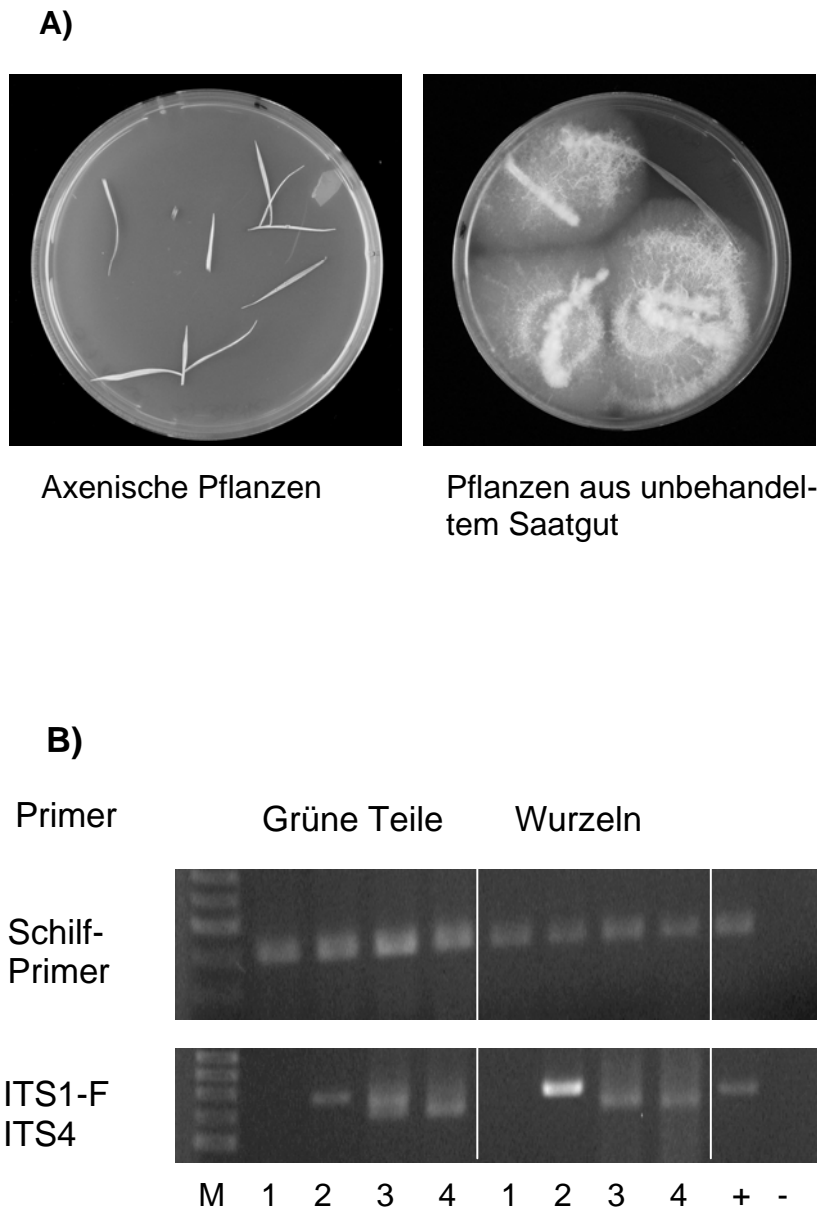


Abbildung 19: Nachweis der Sterilität von Schilfkeimlingen. Das Saatgut stammt vom Bodensee, Standort Reichenau, überschwemmtes Habitat. Die Keimlinge wurden im Alter von 24 Tagen geerntet. A) Mikrobiologische Kontrolle geernteter Pflanzenteile auf Malzagar. Die axenischen Pflanzen stammen aus Saatgut, das mit EtOH/NaOCl/EtOH und nachfolgender Fungizidgabe behandelt wurde. B) Molekularbiologische Kontrolle durch PCR an DNA aus Keimlings-Pools. Oberes Gel: Amplifikationskontrolle mit Primern, die gegen die ITS-Sequenz von Schilf gerichtet sind. Unteres Gel: Allgemeine Pilzprimer ITS1-F und ITS4. Vorbehandlung des Saatgutes: Spur 1 = EtOH/NaOCl/EtOH mit nachfolgender Fungizidbehandlung, 2 = EtOH/NaOCl/EtOH, 3 = H₂O + Triforin, 4 = H₂O, + = Positiv-Kontrolle, - = Negativ-Kontrolle, M = Marker (100 bp Ladder).

3.3.2 Mikrokosmosexperimente

3.3.2.1 Einfluss von *Stagonospora* spp.

Innerhalb der großen Vielfalt der vom Schilf isolierten, endophytisch in dieser Pflanze lebenden, bzw. eng mit ihr assoziierten Pilze wurden Vertreter der Gattung *Stagonospora* für eine ausführlichere Untersuchung ihrer Bedeutung, bzw. ihres Einflusses auf die Wirtspflanze ausgewählt. Diese Auswahl begründet sich mit der Verbreitungsmöglichkeit über die Samen des Wirtes in Analogie zur Gattung *Neotyphodium*, von der bereits etliche Effekte auf die Wirtspflanze bekannt sind (siehe Abschnitt 1.3.5) und dem in vegetativen Pflanzenteilen weit verbreiteten Auftreten der Gattung *Stagonospora* (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1).

Zur Überprüfung des Besiedlungsstatus der Mikrokosmospflanzen mit den inokulierten Pilzen wurden vor der Auswertung der Wuchssparameter Reisolierungstests durchgeführt. Hierbei wurde zwischen endo- und epiphytischer Besiedlung unterschieden. Dies erfolgte durch Anwendung einer Oberflächensterilisation, die der ursprünglichen Isolierung der Pilze aus Samen entsprach (sukzessive EtOH/NaOCl/EtOH für 1/2/1 min).

Alle *Stagonospora*-Isolate wurden mit hoher Häufigkeit aus nicht-sterilisierten Wurzeln reisoliert (Abbildung 20). Durch Sterilisation wurde bei zwei Isolaten die Reisolierungshäufigkeit stark gesenkt. Aus den unteren Sprossabschnitten erfolgte Pilzauswuchs mit geringer Häufigkeit, aus den oberen Abschnitten war eine Reisolierung nicht möglich (Abbildung 20 & Daten nicht gezeigt). Trotz der nachgewiesenen hohen Pilzbesiedlungshäufigkeit wiesen die Wurzeln keine sichtbaren Krankheitssymptome auf.

Die Unterschiede zwischen der Reisolierungshäufigkeit aus unbehandelten und sterilisierten Wurzeln sind in der Eindringtiefe der Pilze, bzw. der verwendeten Chemikalien begründet; das Fehlen in den oberen Sprossabschnitten dürfte daran liegen, dass die Pilze nicht in diese Abschnitte eingewachsen sind. Dass auch nach der Oberflächensterilisation die Vitalität der Pflanzenteile erhalten blieb, ist dadurch belegt, dass während der Inkubation auf Malzagar die Bildung neuer kleiner Sprosse und Wurzeln aus Nodien beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Von der Malzagarplatte abgehobenes und anschließend einer Behandlung mit EtOH/NaOCl/EtOH für 1/2/1 min ebenfalls unterzogenes *Stagonospora*-Mycel überlebte dies nicht. Bei erneuter Ausplattierung erfolgte im Gegensatz zu nur mit Wasser gewaschenem Mycel kein Wachstum (Daten nicht gezeigt). Durch die Reisolierung der Pilze aus den Mikrokosmospflanzen wurde gezeigt, dass eine aktive Besiedlung der Pflanzen von den in einer Entfernung von mindestens 1-2 cm platzierten Agarstückchen über das Erds substrat erfolgt sein muss. Ebenso wurde durch die Reisolierung nach Oberflächensterilisation das endophytische Wachstum bestätigt.

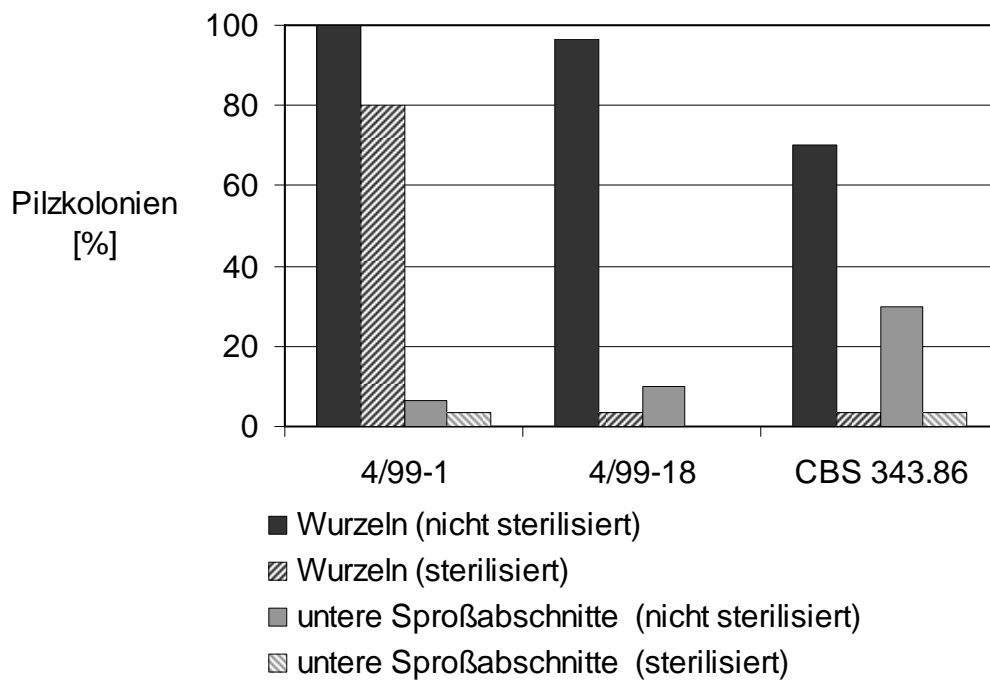


Abbildung 20: Reisolierung von *Stagonospora*-Arten aus Schilf-Mikrokosmen. Dargestellt ist der Pilzauswuchs aus je 30 Proben von 3 verschiedenen Pflanzen pro Pilzisolat, Pflanzenabschnitt und Behandlungsmethode. Die oberflächensterilisierten Pflanzenteile wurden vor dem Auslegen auf Malzagar mit EtOH/NaOCl/EtOH für 1/2/1 min behandelt. Die Pflanzen entstammen aus dem Versuch mit dem kommerziellen Saatgut. Entnommen aus Ernst et al. (2003), verändert.

Zur Untersuchung, ob mit Schilf assoziierte Endophyten einen ähnlichen Effekt auf das Wachstum ihrer Wirtspflanze haben können, wie manche anderen Endophyten (vgl. Abschnitt 1.3.5), wurden axenische Schilfpflanzen in Töpfen mit Erds substrat und pilzlichem Inokulum kultiviert. Der mögliche Einfluss von *Stagonospora* und verwandten Referenzstämmen auf axenisches Schilf wurde an Pflanzen aus Saatgut verschiedener Herkunft untersucht. Angesetzt wurden zwei Mikrokosmen mit Pflanzen aus Saatgut vom Bodensee, bzw. aus kommerziell verfügbarem Saatgut norddeutscher Herkunft (siehe Abschnitt 2.1.2), die mit verschiedenen einzelnen Pilzarten inokuliert wurden. Zur Erfassung des Wachstums wurden die Pflanzen 17 bzw. 23 Wochen nach der Inokulation geerntet, vermessen und deren Trockenbiomasse bestimmt.

Bei beiden Mikrokosmen wurde durch die Inokulation mit *Stagonospora*- bzw. *Phaeosphaeria*-Arten das Wachstum der Schilfpflanzen klar gefördert (Abbildung 21, Abbildung 22). Im Vergleich zur nicht-inokulierten Kontrolle auf etwa das Doppelte gesteigert waren sowohl die oberirdische und unterirdische Trockenbiomasse, als auch die Summe der Halmlängen pro Pflanze. Diese ergibt sich aus der Anzahl der Halme und ihrer Höhe. Die durch die Pilze bedingten Steigerungen der Wachstumsparameter waren von den Kontrollen in Dunnett's Test signifikant verschieden ($p < 0,05$, Abbildung 22). Zwischen den Wachstumsparametern der Ansätze mit den verschiedenen Pilzen untereinander bestand kein signifikanter Unterschied. Zwischen

der Kontrolle ohne Inokulation und der Gabe steriler Malzagarstückchen wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt. In dem verwendeten Mikrokosmos-System mit Lehmerde als Substrat lag eine Limitierung vor, da durch Düngung von nicht-inokulierten Kontrollpflanzen eine Wuchssteigerung erzielt wurde (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 21: Wirkung von *Stagonospora* spp. auf Schilf in axenischen Mikrokosmen.

A) Kontrolle ohne Inokulum, B) Kontrolle mit sterilem Agar, C) mit *Stagonospora* sp. 4/99-1, D) mit *Stagonospora* sp. 4/99-18. Die Pflanzen stammen aus dem Versuch mit kommerziellem Saatgut. Das Foto wurde 16 Wochen nach der Inokulation aufgenommen. Das Alter der Pflanzen betrug zu diesem Zeitpunkt 27 Wochen.

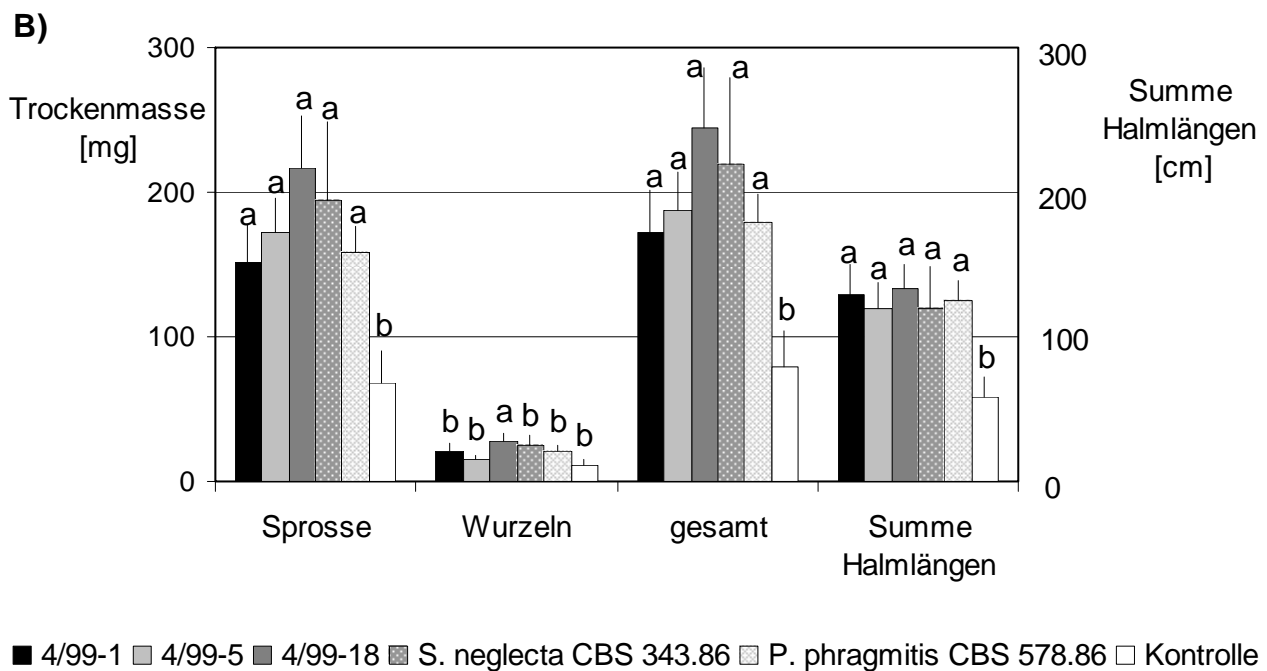
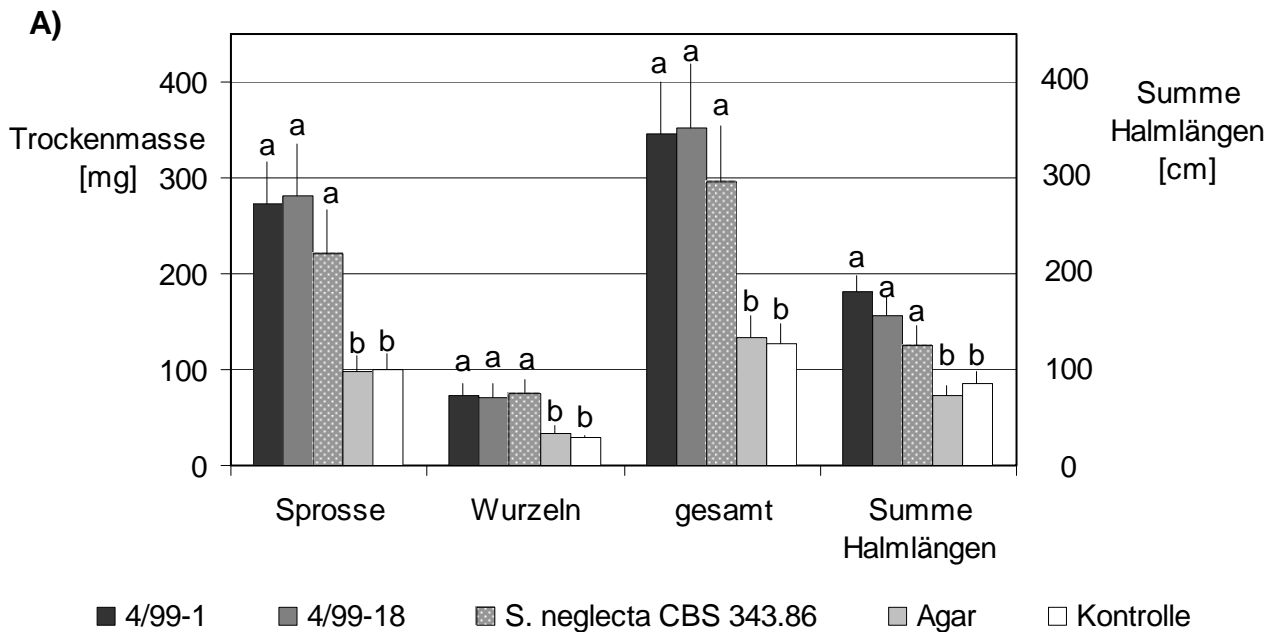


Abbildung 22: Wachstumsparameter von Schilfpflanzen in axenischen Mikrokosmen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Wurzel-, Spross- und Gesamttrockenmasse, sowie der Summe der Halmlängen pro Pflanze. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler. Von der Kontrolle (ohne Inokulum) signifikant verschiedene Werte (Dunnett's Test, $p < 0,05$) sind am oberen Ende der Fehlerbalken mit dem Buchstaben „a“ gekennzeichnet; nicht-signifikant verschiedene Werte tragen die Kennung „b“. A) Pflanzen aus kommerziellem Saatgut. Die Ergebnisse basieren auf 14 Pflanzen pro Behandlung; die Auswertung erfolgte 23 Wochen nach der Inokulation. „Agar“ = Kontrolle mit sterilem Agar. B) Pflanzen aus Saatgut vom Bodensee. Die Ergebnisse basieren auf 12 Pflanzen pro Behandlung; die Auswertung erfolgte 17 Wochen nach der Inokulation. Entnommen aus Ernst et al. (2003), verändert.

3.3.2.2 Einfluss von *Microdochium bolleyi* und *Trichoderma* sp.

Zur Untersuchung, ob die Wuchssteigerung von Schilf durch Arten von *Stagonospora/Phaeospharia* das Resultat einer spezifischen Interaktion ist, oder ob andere vom Schilf isolierte Endophyten ähnliche Effekte verursachen könnten, wurden weitere Pilzisolat in Mikrokosmen getestet. Es handelte sich hierbei um die Isolate *Microdochium bolleyi* 5/97-54 und *Trichoderma* sp. A11. Für diese Mikrokosmen wurden nur aus kommerziellem Saatgut angezogene Pflanzen verwendet. Der Versuch lief parallel zu dem in Abbildung 22A dargestellten Experiment.

Zur Überprüfung des Besiedlungsstatus der Mikrokosmospflanzen wurden vor der Auswertung der Wachstumsparameter wie bei den *Stagonospora*-Mikrokosmen Reisolierungstests durchgeführt. Durch die Anwendung einer Oberflächensterilisation wurde auch hier zwischen endo- und epiphytischer Besiedlung unterschieden (Abbildung 23).

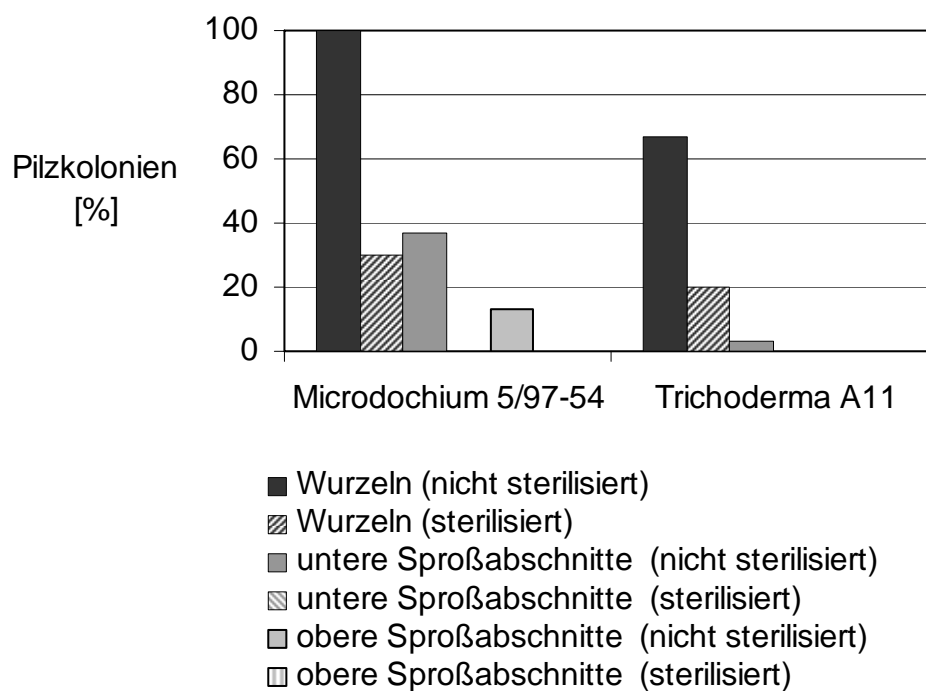


Abbildung 23: Reisolierung von *Microdochium* und *Trichoderma* aus Schilf-Mikrokosmen. Dargestellt ist der Pilzauswuchs aus je 30 Proben von 3 verschiedenen Pflanzen pro Pilzisolat, Pflanzenabschnitt und Behandlungsmethode. Die oberflächensterilisierten Pflanzenteile wurden vor dem Auslegen auf Malzagar mit EtOH/NaOCl/EtOH für 1/2/1 min behandelt. Die verwendeten Pflanzen wurden aus dem kommerziellen Saatgut angezogen.

Die eingesetzten Isolate wurden mit hoher Häufigkeit aus nicht-sterilisierten Wurzeln reisoliert (Abbildung 23). Durch Sterilisation wurde bei beiden die Reisolierungshäufigkeit gesenkt, betrug jedoch noch mindestens 20%. Auch aus den nicht-oberflächensterilisierten unter-

ren Sprossabschnitten war Reisolierung möglich. *Microdochium* 5/97-54 konnte zusätzlich auch von (nicht-sterilisierten) oberen Sprossabschnitten reisoliert werden.

Microdochium bolleyi Isolat 5/97-54 zeigte eine wuchsfördernde Wirkung, die bei der oberirdischen Biomasse und der Gesamtbiomasse signifikant von den Kontrollen verschieden war (Dunnett's Test, $p < 0,05$, Abbildung 24). Die Wurzelmasse und die Summe der Halmlängen wichen dagegen nicht signifikant von den Werten der Kontrollpflanzen ab. Die Pflanzen mit *Trichoderma* Isolat A11 zeigten im Vergleich zu den Kontrollen nur gering gesteigerte Wuchsparameter, die von den Kontrollen nicht signifikant verschieden waren (Abbildung 24). Mit *Microdochium bolleyi* existiert somit außer den *Stagonospora*-Arten, bzw. ihren Verwandten offenbar mindestens ein weiterer Pilz, der die Biomasseproduktion des Schilfes fördert. Mit *Trichoderma* sp. wurde außerdem ein endophytischer Pilz identifiziert, der offenbar hinsichtlich der Beeinflussung von Wuchsparametern neutral ist.

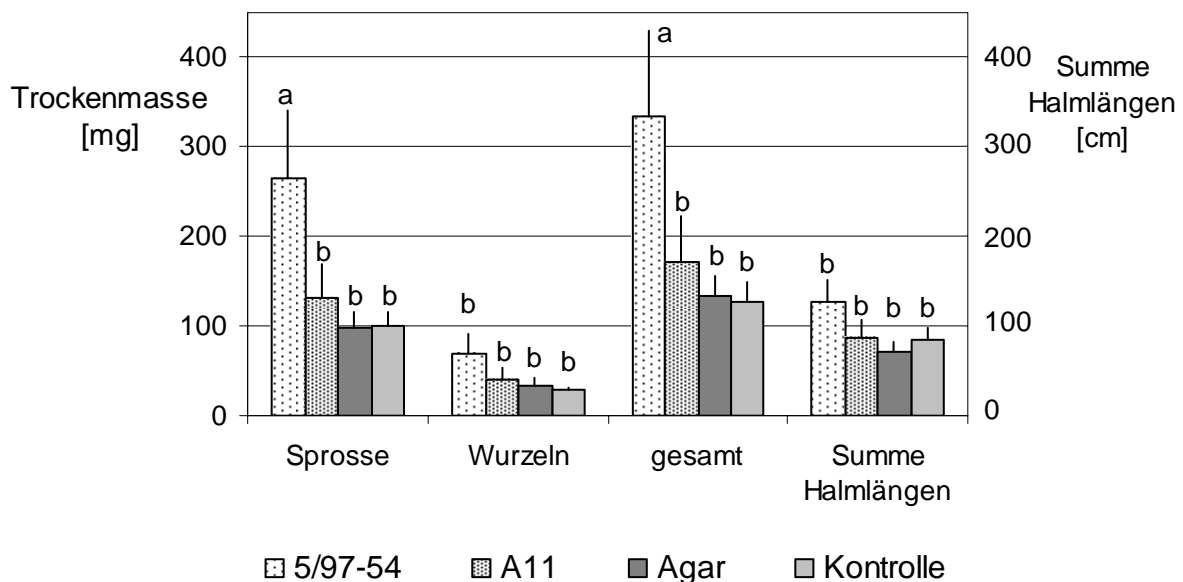


Abbildung 24: Wuchsparameter von Schilfpflanzen in axenischen Mikrokosmen mit *Microdochium* und *Trichoderma*. Dargestellt sind die Mittelwerte der Wurzel-, Spross- und Gesamttrockenmasse, sowie der Summe der Halmlängen pro Pflanze. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler. Von den Kontrollen (ohne Inokulum) signifikant verschiedene Werte (Dunnett's Test, $p < 0,05$) sind am oberen Ende der Fehlerbalken mit dem Buchstaben „a“ gekennzeichnet; nicht-signifikant verschiedene Werte tragen die Kennung „b“. „Agar“ = Kontrolle mit sterilem Agar. Die Pflanzen stammen aus dem kommerziellen Saatgut. Die beiden Kontrollen sind identisch mit denjenigen aus dem parallel durchgeführten Experiment in Abbildung 22A. Die Ergebnisse basieren auf 14 Pflanzen pro Behandlung, für *Trichoderma* standen nur 9 Pflanzen zur Verfügung. Die Auswertung erfolgte 23 Wochen nach der Inokulation.

3.3.3 Makrokosmosexperimente

Um die Wirkung von *Stagonospora* 4/99-1 auf Schilf unter Freilandbedingungen zu untersuchen und mit den Ergebnissen der axenischen Mikrokosmen zu vergleichen, wurde ein Makrokosmos-Experiment in großen Kunststoffbecken angesetzt. Hierbei zeigten die mit *Stagonospora* inokulierten Schilfkeimlinge während der axenischen Anzucht vor der Ausbringung in die Freilandanlage – wie zuvor bei den Mikrokosmos-Experimenten (siehe Abschnitt 3.3.2.1) bereits gesehen – ein besseres Wachstum als die nicht-inokulierte Kontrolle (Abbildung 25). Die Anwesenheit von *Stagonospora* in den Wurzeln der Versuchspflanzen wurde während der Anzucht und vor dem Auspflanzen durch mehrfache erfolgreiche Reiso-lierung bestätigt (Daten nicht gezeigt).

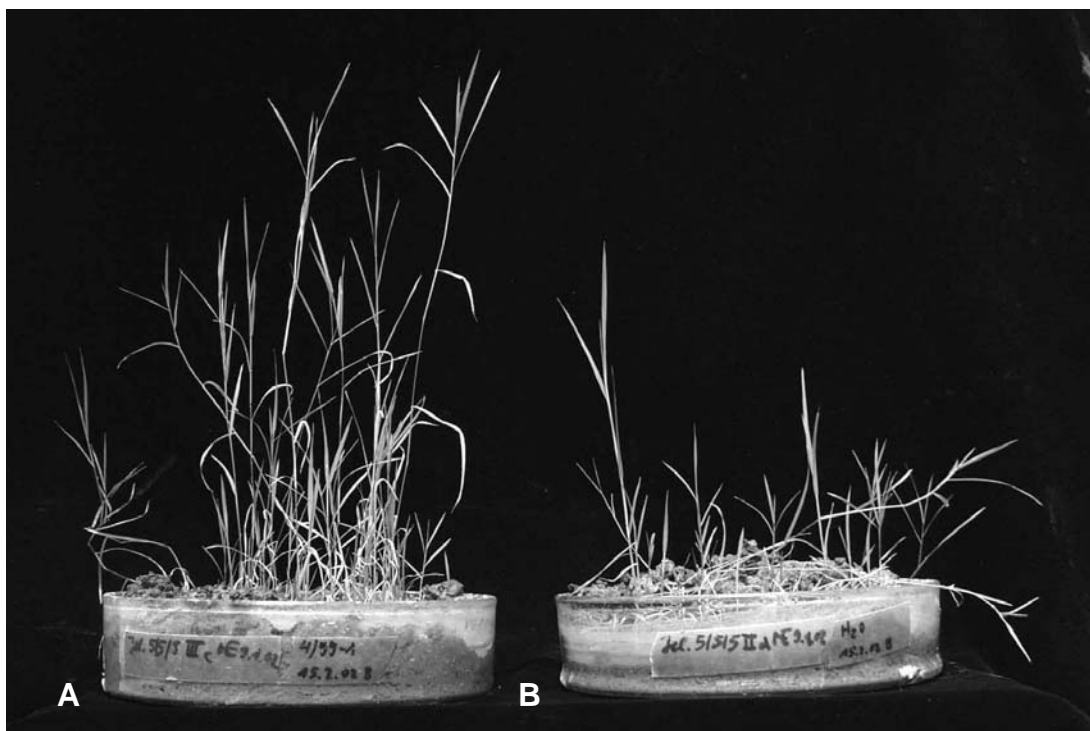


Abbildung 25: Schilfpflanzen für den Makrokosmos vier Monate nach der Inokulation, einen Monat vor der Ausbringung ins Freiland. A) mit *Stagonospora* 4/99-1. B) Kontrolle ohne Inokulation.

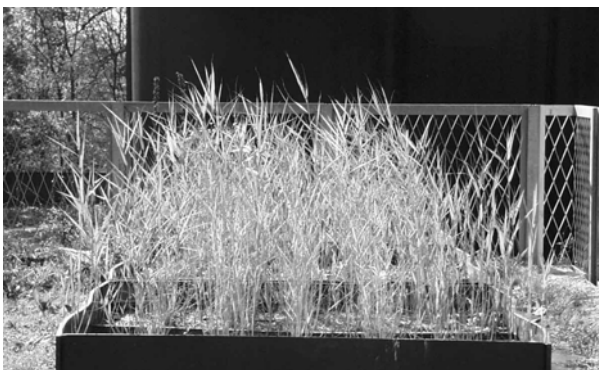
Um aus der in der Freilandanlage einzusetzenden großen Erdmenge störende Organismen weitgehend zu eliminieren, wurde eine Dämpfung vorgenommen. Vor der Dämpfung betrug das Vorkommen filamentöser Pilze in der Erde in drei Proben mit je zwei plattierten Verdünnungen durchschnittlich 4×10^4 cfu pro Gramm Erde. Nach der Dämpfung konnte in dem verwendeten Erds substrat ein geringer erwarteter Restanteil überlebender Pilze detektiert werden (Tabelle 19), welcher sich aufgrund der beim Dämpfen niedrigeren Temperatur im Vergleich zur Sterilisation im Autoklav ergab.

Tabelle 19: Rest-Pilzvorkommen im Erds substrat nach dem Dämpfen. Von jeder Verdünnung wurden 100 µl auf Malzagar mit Ampicillin und Streptomycin ausplattiert. Die Stellen I, II und III des Oberflächenbereiches sind voneinander entfernt liegende, zufällig ausgewählte Beprobungspunkte.

Probenbereich	Verdünnung (w/v)	Anzahl Pilzkolonien	Pilzkolonien pro g Erde
Dicht unter Oberfläche, I	1:10	0	0
	1:100	0	0
	1:1000	0	0
Dicht unter Oberfläche, II	1:10	0	0
	1:100	0	0
	1:1000	0	0
Dicht unter Oberfläche, III	1:10	0	0
	1:100	0	0
	1:1000	0	0
Halbe Tiefe	1:10	0	0
	1:100	0	0
	1:1000	0	0
Tief, nahe Dämpfrohr	1:10	1	100
	1:100	1	1000
	1:1000	0	0

Die isolierten Pilze wurden nicht identifiziert. Da aufgrund der Bedingungen im Freiland im Lauf der Zeit mit einer massiven Besiedlung der Anlage durch Sporenflug verschiedener Pilze zu rechnen war, wurde die geringe verbliebene Pilzmenge im Ausgangsmaterial als akzeptabel angesehen. Das Vorkommen von Bakterien wurde nicht untersucht.

Nach Aussetzung in die Freilandanlage konnte am Ende der ersten Vegetationsperiode drei Monate nach dem Auspflanzen visuell kein Größenunterschied der Pflanzen zwischen den Versuchsreihen festgestellt werden (Abbildung 26 & nicht gezeigt).



A



B

Abbildung 26: Freilandversuch am Ende der ersten Vegetationsperiode, Oktober 2002. A) mit *Stagonospora* 4/99-1 inokulierter Ansatz. B) Kontrolle ohne Inokulation.

Für je eines der drei Becken jeder Versuchsreihe (20 Pflanzen) wurde am Ende der ersten Vegetationsperiode die mittlere Anzahl der Halme pro Pflanze bestimmt. Sie betrug bei der Kontrolle 24,0 und bei dem mit *Stagonospora* inokulierten Ansatz 24,95 Halme pro Pflanze. Dieser Unterschied war nicht signifikant (Dunnett's Test, $p > 0,05$; Daten nicht gezeigt). *Stagonospora* war aus den Pflanzen der inokulierten und durch zuvorige Reisolierung als besiedelt bestätigten Pflanzen bereits drei Monate nach dem Auspflanzen nicht mehr reisolierbar, obwohl er zuvor während der gesamten Anzuchtdauer nachweisbar war. Es wurde lediglich die aufgrund der Bedingungen im Freiland erwartete Anwesenheit weiterer Pilze festgestellt, die durch Mikroskopie identifiziert wurden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Isolierung von Pilzen aus unterirdischen Abschnitten der Schilfpflanzen aus dem Freilandversuch. Die Beprobung erfolgte am Ende der ersten Vegetationsperiode im Oktober 2002. Wurzel und Rhizom sind zusammengefasst. Die Proben stammen von 6 verschiedenen Pflanzen je Ansatzreihe. Die Teile wurden nach Spülen mit Leitungswasser und sterilem Wasser auf Malzagar mit Ampicillin/Streptomycin ausgelegt.

	Ansatz	
	Kontrolle ohne Inokulation	<i>Stagonospora</i> 4/99-1
Populations- zusammensetzung	<i>Penicillium</i> sp. 73,1%	<i>Penicillium</i> sp. 59,5%
Relative Häufigkeit [%]	<i>Cladosporium</i> sp. 15,4%	<i>Epicoccum</i> sp. 18,9%
	<i>Epicoccum</i> sp. 7,7%	<i>Cladosporium</i> sp. 8,1%
	<i>Mortierella</i> sp. 3,8%	<i>Alternaria</i> sp. 5,4%
		<i>Geotrichum</i> sp. 2,7%
		<i>Mortierella</i> sp. 2,7%
		<i>Phoma</i> sp. 2,7%
		<i>Stagonospora</i> sp. 0%
Gesamtzahl Isolate	26	37
Anzahl Proben	24	37

Auch nach der zweiten Vegetationsperiode konnte visuell kein besseres Wachstum der ursprünglich mit *Stagonospora* inokulierten Versuchsreihe festgestellt werden (Abbildung 27). Aus diesem Grund und wegen des Fehlens von *Stagonospora* bereits nach der ersten Vegetationsperiode wurde auf weitere Untersuchungen und Re-Isolierungstests verzichtet.

Aus den Pflanzen der Kontrollreihe wurde weder vor noch nach der Auspflanzung *Stagonospora* reisoliert, wodurch die einwandfreie Verwendbarkeit der Kontrollreihe gewährleistet war. Der Beobachtung des völligen Rückganges von *Stagonospora* liegt offenbar ein Verdrängungsprozess durch andere, die Wurzeln ebenfalls besiedelnde Pilzarten zugrunde. Mit der Abwesenheit oder dem eventuell nur noch geringen, durch einfache Isolierung nicht nachweisbaren Vorkommen des Pilzes fällt auch das Ausbleiben der in den Mikrokosmen beobachteten Wuchssteigerung zusammen.

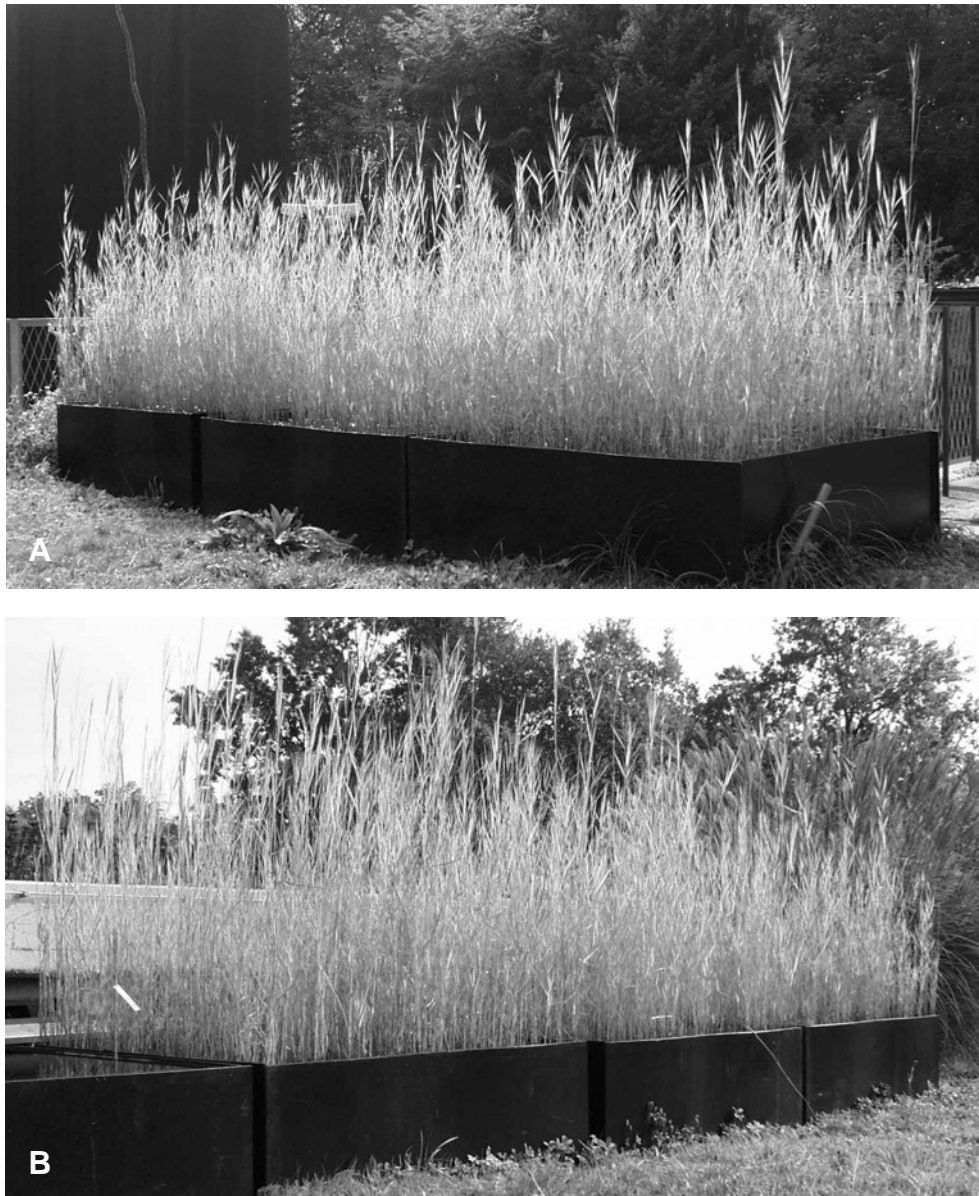


Abbildung 27: Freilandversuch am Ende der zweiten Vegetationsperiode, Oktober 2003. A) mit *Stagonospora* 4/99-1 inokulierter Ansatz. B) Kontrolle ohne Inokulation.

3.4 *Stagonospora*-Hormontests an Reis

Zur Untersuchung möglicher Ursachen der durch die Anwesenheit von *Stagonospora* ausgelösten Förderung des Schilfwachstums wurde freundlicherweise im Labor von Frau PD Dr. Bettina Tudzynski am Institut für Botanik an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster ein Hormontest an einem System mit Reispflanzen durchgeführt. Der Test war ausschließlich auf die Erfassung von Gibberellinen mittels der Gibberellin-defizienten Reis-Mutante (*Oryza sativa* L. cv. „Tan-ginbozu“; Rood et al., 1986; Rood et al., 1987) ausgerichtet. Die Extrakte aus *Stagonospora*-Flüssigkulturüberständen wurden auf die jungen Reis-pflänzchen aufgetragen und deren Längenwachstum fotografisch erfasst (Abbildung 28).

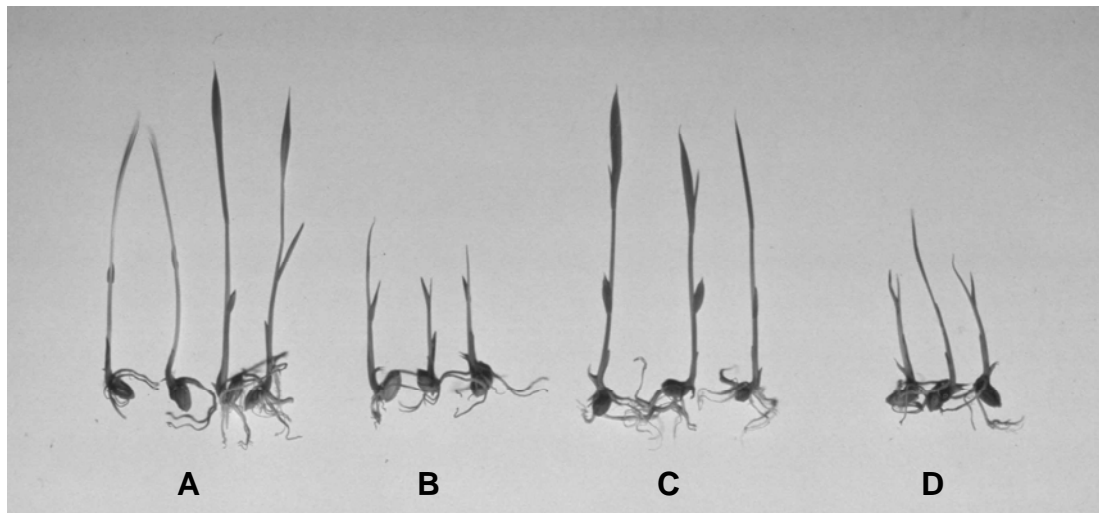


Abbildung 28: Hormontest von *Stagonospora*-Flüssigkulturextrakten an Reiskeimlingen. A) Positiv-Kontrolle mit 10 μ g/ml Gibberellinsäure GA₃. B) Negativ-Kontrolle (H₂O). C) *Stagonospora* 4/99-18, unverdünnter Extrakt aus RNT-Medium. D) *Stagonospora* 4/99-18, 1:10 verdünnter Extrakt aus RNT-Medium. Foto: Dr. B. Tudzynski, Münster.

Der Extrakt von Isolat 4/99-1 aus RNT-Medium zeigte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt). Extrakte des Isolates 4/99-18 zeigten in Abhängigkeit des Flüssigkulturmediums unterschiedliche Wirkung: Der Extrakt aus der Kultur auf RNT-Medium zeigte bei unverdünnter Applikation eine schwache Wirkung, während der 1:10 verdünnte Extrakt keine Wirkung mehr zeigte (Abbildung 28). Der Extrakt aus der Kultur von 4/99-18 mit Minimalmedium führte nicht zu einer Wachsförderung der Reispflanzen (B. Tudzynski, pers. Mitteilungen).

Mit der hier angewandten Methode konnte nur eine geringe Hormonproduktion nachgewiesen werden. Offenbar haben Hormone der Gibberellin-Gruppe für den in den Schilf-Mikrokosmen beobachteten Wuchseffekt keine Bedeutung oder sie wurden in den *in vitro*-Kulturen von *Stagonospora* nicht produziert.

3.5 Immunolokalisation von *Stagonospora*

Zur genauen Lokalisierung und zur Bestätigung des endophytischen Status des Isolates *Stagonospora* 4/99-1 in den verschiedenen Wirtsgeweben wurde an Wurzeln von Mikrokosmospflanzen (siehe Abschnitt 3.3.2.1) und an Wurzeln, Blättern und Halmen von Keimlingen mit natürlicher Pilzbefruchtung (siehe Abschnitt 3.2.1.4) ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis durchgeführt. Verwendet wurde ein gegen dieses Isolat gerichteter primärer und ein Cy3-gekoppelter sekundärer Antikörper. Proben wurden nur von solchen Pflanzen genommen, die in Mikrokosmen durch Reisolierung bzw. im Falle der Keimlinge mit natürlicher Pilzbefruchtung durch PCR zuvor als mit dem Isolat besiedelt nachgewiesen worden waren.

In den Wurzeln von Mikrokosmospflanzen wuchs der Pilz zwischen den Wurzelepidermiszellen und in Kontakt mit der ersten Schicht kortikaler Zellen (Abbildung 29A), was die aktive Besiedlung und Penetration in die Pflanze von den in Entfernung platzierten Inokulumspunkten aus über das Erdsubstrat nachweist. In der Wurzel wuchs der Pilz endophytisch mit gera-

den Hyphen und relativ seltener Verzweigung längs der Wurzelachse. Die Wirtszellen wurden nicht penetriert und es waren keine Abwehrreaktionen zu beobachten.

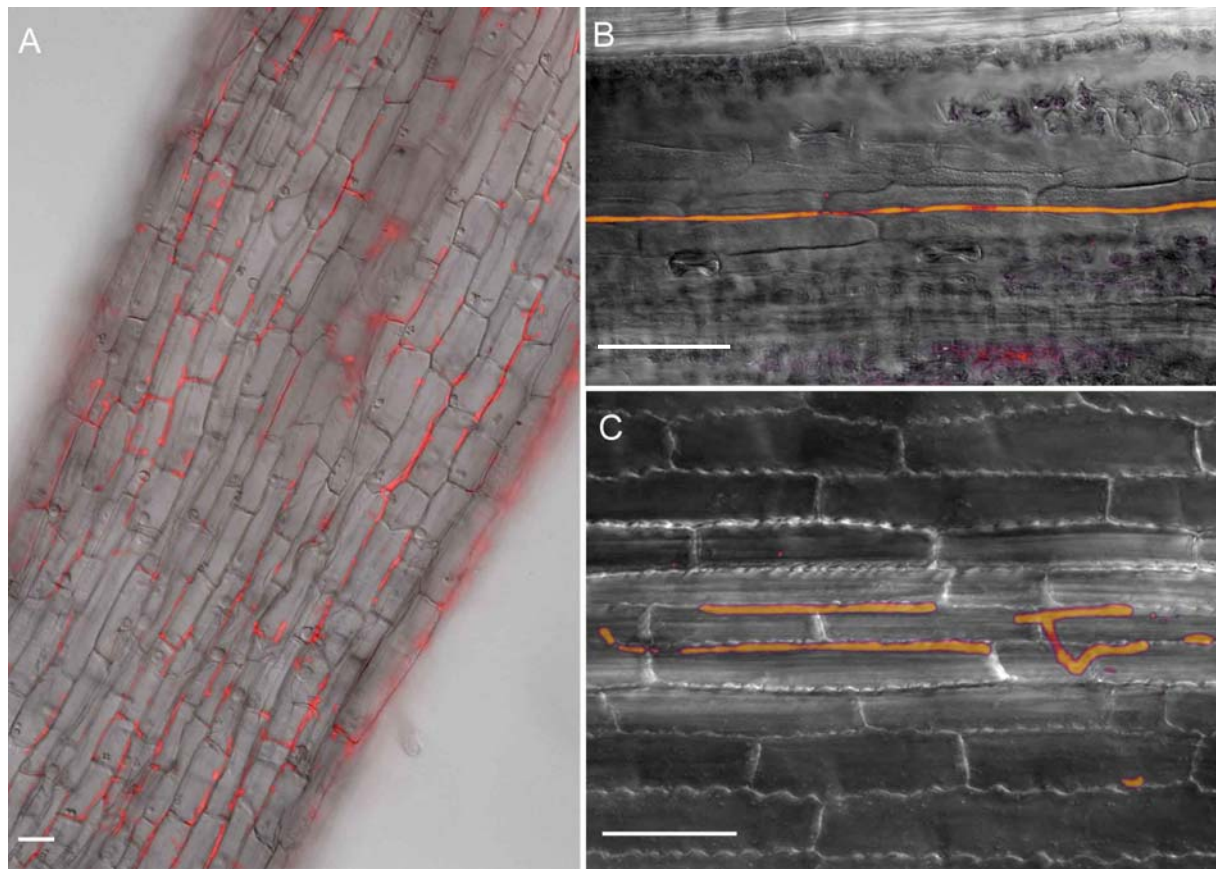


Abbildung 29: Immunfluoreszenzmikroskopie mit einem primären Antikörper gegen *Stagonospora* 4/99-1. A) Wurzel von *Phragmites australis* aus einem Mikrokosmos mit *Stagonospora* 4/99-1 und Pflanzen aus kommerziellem Saatgut; die Pilzhypen sind rot angefärbt. B) Blatt und C) Halm von *P. australis* aus Mikrokosmen ohne Inokulation. Die Pflanzen wurden aus Saatgut vom Bodensee angezogen, wobei die angewandte Oberflächensterilisation das Überleben von Endophyten gestattete; die Pilzhypen sind orange-rot angefärbt. Maßstab (weiße Balken) = 20 µm. Fotos: Prof. Dr. Kurt Mendgen.

In den Wurzeln von Keimlingen mit natürlicher Pilzbefruchtung wies der Pilz das gleiche Wachstumsmuster auf wie in den Mikrokosmospflanzen, die durch Zugabe von Agarstückchen mit Mycel inokuliert waren. In den Halmen der Keimlinge wurden regelmäßig einzelne gerade Hyphen unter den epidermalen Zellen im parenchymatischen Gewebe beobachtet. In Blättern wurden gelegentlich einzelne lange Hyphen gefunden, die durch die Parenchyme wuchsen (Abbildung 29B+C).

Für *Stagonospora* konnte somit das endophytische Wachstum, welches durch Reisolierung aus Mikrokosmen nach Oberflächensterilisation angezeigt war, auch durch Mikroskopie bestätigt werden. Hierdurch wurde ebenso eine genauere Aussage über die Lokalisation im pflanzlichen Gewebe ermöglicht.

3.6 Wuchsverhalten von Endophyten *in vitro*

3.6.1 Temperaturoptimum

Zur Gewährleistung eines für Mikrokosmosversuche und *in vitro*-Kompetitionstests geeigneten Temperaturbereiches und zur Ermittlung physiologischer Unterschiede zwischen Arten der gleichen Gattung wurde das Wachstumstemperaturoptimum einzusetzender Pilze bestimmt.

3.6.1.1 Vergleich der Gattungen

Die Wuchsgeschwindigkeit verschiedener *Stagonospora*-Isolate, verwandter Referenzstämmen von der CBS und weiterer Schilf-Endophyten wurde in einem Temperaturbereich von 10-30°C mit Abständen von 5°C bestimmt (Abbildung 30).

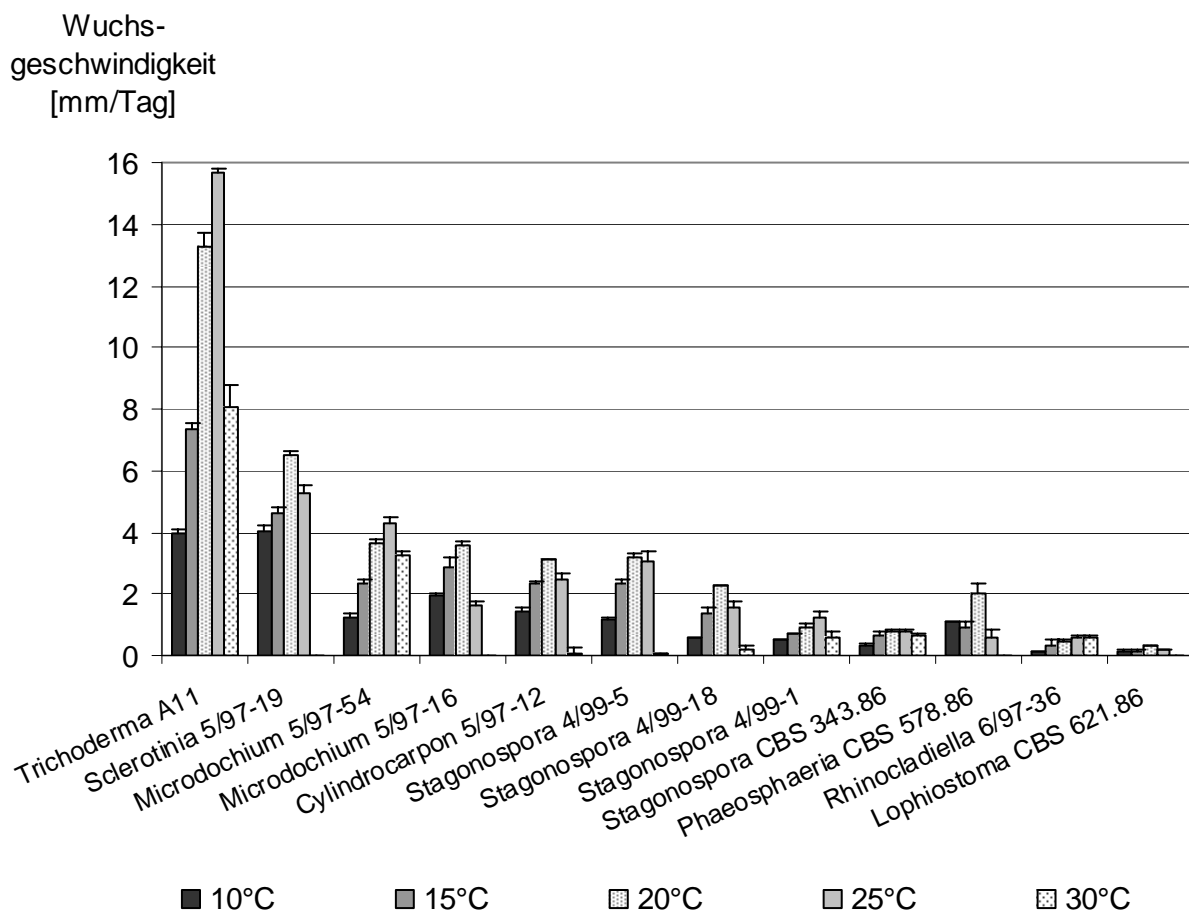


Abbildung 30: Temperaturoptimum verschiedener Pilzgattungen. Die Werte basieren auf drei Replikaten pro Isolat und Temperatur auf Malzagar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die Reihenfolge wurde nach Wuchsgeschwindigkeit und Gattungen sortiert.

Ein Isolat der Gattung *Trichoderma* repräsentierte die am schnellsten wachsende Art mit einer maximalen Wuchsgeschwindigkeit von 15 mm/Tag bei 25°C (Abbildung 30). Vertreter der Gattungen *Sclerotinia* mit 6,5 und *Microdochium* mit 4,3 mm/Tag waren als weitere schnell wachsende Arten erkennbar. Im Vergleich zu diesen Pilzgattungen lag die Wuchsgeschwindigkeit der *Stagonospora*-Isolate mit 1,3 bis 3,2 mm/Tag im mittleren Bereich (Abbildung 30 und Tabelle 21). *Stagonospora* 4/99-1 zeigte ein Optimum bei 25°C, das gleiche galt für den Referenzstamm CBS343.86 mit identischer ITS-Sequenz. Die *Stagonospora*-Isolate 4/99-5 und 4/99-18 wiesen Optima von 20°C auf. Die Wuchsoptima der anderen Pilze lagen ebenfalls bei 20°C, bzw. 25°C. Eine Ausnahme bildete *Rhinochadiella*, welcher bei 30°C die gleiche Wuchsgeschwindigkeit wie bei 25°C aufwies.

Tabelle 21: Wuchsgeschwindigkeiten der *Stagonospora*-Isolate vom Bodensee. Mittlere Wuchsgeschwindigkeit aus 3 Replikaten auf Malzagar in mm/Tag bei verschiedenen Temperaturen. Der verwendete Datensatz entspricht jenem in Abbildung 30. Hinter den Werten ist die Standardabweichung angegeben. Die Werte wurden auf eine Stelle nach dem Komma gerundet. Signifikanzangaben für die Betrachtung zwischen den verschiedenen Isolaten bei jeweils einer Temperatur (Dunnett's Test): verschiedene Buchstaben = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), gleiche Buchstaben = kein signifikanter Unterschied.

Isolat	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
4/99-1	0,5 ± 0,0 (a)	0,7 ± 0,0 (a)	0,9 ± 0,1 (a)	1,3 ± 0,2 (a)	0,6 ± 0,2 (a)
4/99-5	1,2 ± 0,0 (b)	2,4 ± 0,1 (b)	3,2 ± 0,2 (b)	3,0 ± 0,4 (b)	0,0 ± 0,0 (b)
4/99-18	0,6 ± 0,0 (ac)	1,4 ± 0,2 (c)	2,3 ± 0,0 (c)	1,6 ± 0,2 (ac)	0,2 ± 0,1 (bc)

Für die vom Bodensee stammenden *Stagonospora*-Isolate konnte trotz der geringen Anzahl von nur drei Replikaten gezeigt werden, dass diese sich hinsichtlich ihrer Wuchsgeschwindigkeit mehrheitlich signifikant voneinander unterschieden (Dunnett's Test, $p < 0,05$). Die Wuchsgeschwindigkeit des Isolates 4/99-5 war von der von 4/99-1 bei allen 5 getesteten Temperaturen signifikant verschieden (Tabelle 21). 4/99-18 zeigte bei 3 der 5 Temperaturstufen ebenfalls signifikante Unterschiede zu 4/99-1. Ebenso waren die Wuchsgeschwindigkeiten der Isolate 4/99-5 und 4/99-18 bei allen Temperaturen außer 30°C signifikant verschieden. Trotz naher Verwandtschaft konnten somit bedeutsame Unterschiede bei Wuchsgeschwindigkeit und physiologischem Verhalten (Temperaturoptimum) nachgewiesen werden.

Ein ähnliches Phänomen wurde auch für die Gattung *Microdochium* beobachtet. Diese zeigte zwischen den beiden hier repräsentierten Arten deutliche Unterschiede bei Temperaturoptimum und Verträglichkeit hoher Temperaturen (Abbildung 30). Daher wurde dieses Phänomen an mehreren Vertretern beider Arten sowie Referenzstämmen intensiver untersucht (siehe Abschnitt 3.6.1.2).

3.6.1.2 Vergleich verschiedener *Microdochium*-Isolate

Aufgrund der durch PCR nachgewiesenen unterschiedlichen Bevorzugung trockener, bzw. überschwemmter Ufer-Habitate durch die zwei *Microdochium*-PCR-Kladen (siehe Abschnitte 3.2.2.2.1 und 3.2.2.2.3) und der unterschiedlichen Temperaturoptima bei der Untersuchung je eines Isolates dieser Arten (siehe Abschnitt 3.6.1.1) wurden diese Versuche nun auf vier bzw. fünf unabhängige Isolate je Art und zusätzliche Referenzstämme ausgeweitet (Tabelle 22). Die Messungen erfolgten ebenfalls im Bereich 10-30°C mit Abständen von 5°C. Die untersuchten Isolate stammten von Pflanzen aus verschiedenen Uferzonierungen, so dass Herkünfte von überschwemmten und trockenen Habitaten vertreten waren.

Tabelle 22: Herkunft der im Temperaturoptimumstest eingesetzten *Microdochium*-Isolate. Nicht alle verwendeten Referenzstämme stammen von Schilf, jedoch durchgehend von Süßgräsern (vgl. Tabelle 2). * Folgerung des Autors aufgrund der in Tabelle 2 wiedergegebenen Herkunftsangaben, welche durch die Bezugsquellen gemacht wurden.

PCR-Klade	Art/Sequenztyp	Isolat-Nr.	Herkunft	
			Pflanzenteil	Habitat (Zonierung)
II	<i>Microdochium bolleyi</i>	4/97-7	Wurzel	überschwemmt
		5/97-48	Wurzel	überschwemmt
		5/97-49	Wurzel	überschwemmt
		5/97-54	Wurzel	trocken
		A7	Wurzel	trocken
		CBS137.64	Rhizosphäre	trocken?*
		CBS172.63	Erdboden	trocken?*
I	<i>Microdochium</i> sp. (Sequenztyp 5/97-16-like)	4/97-39	Halm	trocken
		5/97-16	Wurzel	trocken
		5/97-30	Wurzel	überschwemmt
		6/97-20	Wurzel	überschwemmt
	<i>Microdochium phragmitis</i>	5/97-66	Halm	trocken
		CBS285.71	Blatt/Halm?*	?
<i>Microdochium nivale</i>	CBS110.94	Halmbasis	trocken?*	
	CBS320.78	?	trocken?*	

Das Temperaturoptimum aller Isolate der Art *Microdochium* sp. mit Sequenztyp 5/97-16-like lag bei 20°C (Abbildung 31). Die Isolate der Art *Microdochium bolleyi* zeigten dagegen einheitlich ein Optimum bei 25°C. Trotz Herkunft der Isolate der jeweiligen Sequenztypen aus verschiedenen Habitatstypen (vgl. Tabelle 22) zeigten diese bezüglich des Temperaturoptimums jeweils durchgehend sehr ähnliche Eigenschaften (Abbildung 31). Ebenso zeigte keines der Isolate vom Typ 5/97-16-like trotz verschiedener Herkünfte aus überfluteten und trockenen Bereichen Wachstum bei 30°C. Dies lässt darauf schließen, dass bei beiden Arten Temperaturoptimum und -sensitivität genetisch und nicht durch die Umgebung bedingt sind.

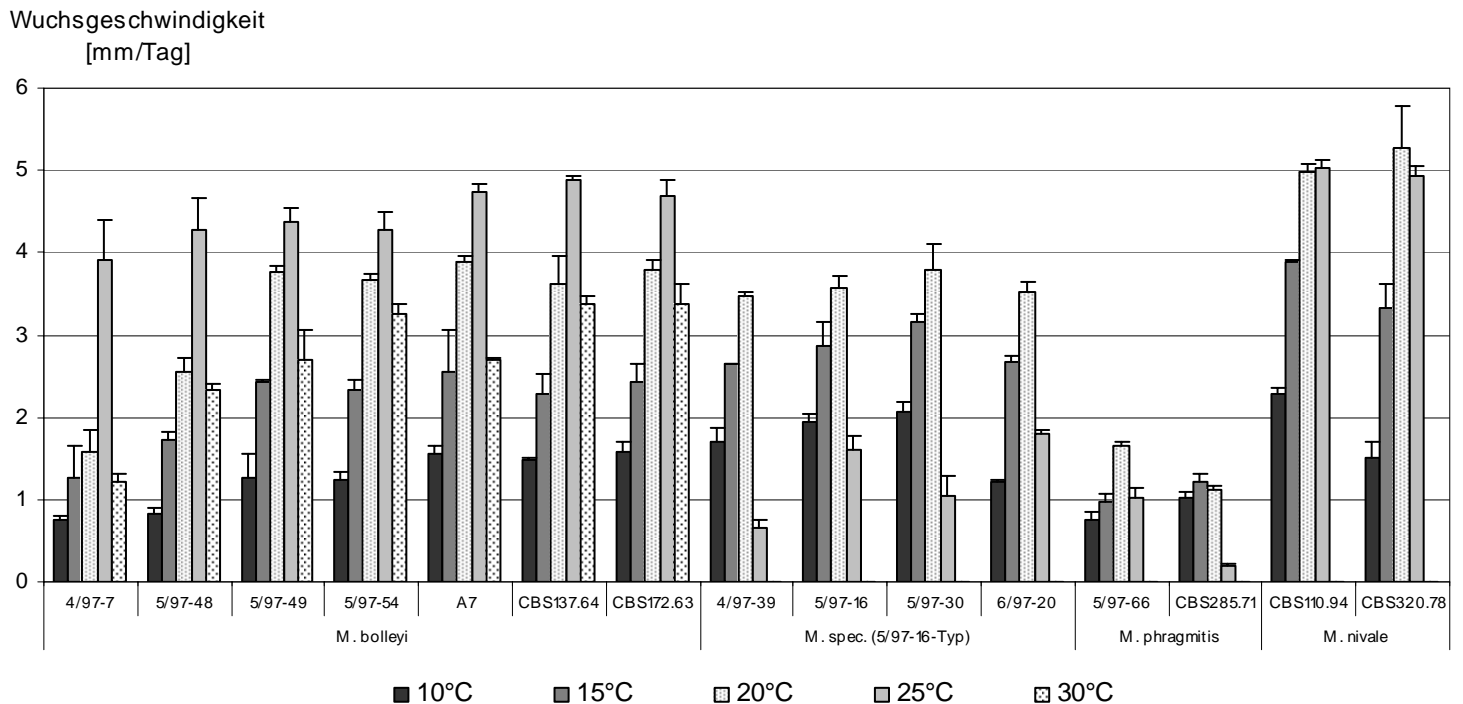


Abbildung 31: Temperaturoptimum von *Microdochium* spp. Die Wuchsgeschwindigkeiten in mm/Tag basieren auf 3 Replikaten pro Isolat und Temperatur auf Malzagar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Die Referenzstämme der Art *M. bolleyi*, CBS172.63 und CBS137.64, zeigten ein mit den *M. bolleyi*-Isolaten vom Bodensee übereinstimmendes Temperaturverhalten. Dabei wuchsen die CBS-Stämme bei allen Temperaturen im Durchschnitt etwas schneller als die vom Bodensee stammenden Isolate (Abbildung 32). Bei den mit dem Typ 5/97-16-like bezüglich ITS nicht sequenzgleichen Referenzstämmen der Art *M. nivale* CBS320.78 und CBS110.94 (87,7% bzw. 86,5% Identität, siehe Abschnitt 3.2.2) lag das Temperaturoptimum im Mittel bei 20°C. Dieser Wert lag jedoch nur sehr knapp über dem Wert bei 25°C. Bei 30°C zeigte diese Art wie der Typ 5/97-16-like keinerlei Wachstum (Abbildung 31 und Abbildung 32). Die beiden Vertreter der Art *M. phragmitis* (5/97-66 und CBS285.71) zeigten unterschiedliche Temperaturoptima bei 20°C bzw. 15°C. Die Optimumskurven dieser beiden Isolate ähnelten denen des Sequenztyps 5/97-16-like, verliefen jedoch infolge deutlich geringerer Wuchsgeschwindigkeiten viel flacher (Abbildung 32). Wie der Sequenztyp 5/97-16-like und die *M. nivale*-Arten zeigen die Vertreter von *M. phragmitis* bei 30°C kein Wachstum. Somit zeigte der vom Sequenztyp 5/97-16-like durch ITS-PCR nicht unterscheidbare, ebenfalls am Bodensee vorkommende *M. phragmitis* 5/97-66 ein ähnliches Wachstumsoptimum und Temperaturverhalten (Abbildung 32).

Die Zusammenfassung der einzelnen Isolate einer Art zeigte für den Sequenztyp 5/97-16 im Temperaturbereich von 10-20°C im Mittel ein schnelleres Wachstum als bei *Microdochium bolleyi* mit Sequenztyp 5/97-54 (Abbildung 32). In diesem Temperaturbereich verliefen die Anstiege der Temperaturkurven beider Arten parallel, was bedeutet, dass beide in diesem Bereich das gleiche Temperaturverhalten zeigten. Zwischen 20-25°C sank die Wuchsgeschwin-

digkeit der Isolate des 5/97-16-Typs stark und lag bei 25°C unter jener der Isolate des 5/97-54-Typs, wobei sich die Optimumkurven kreuzen. Bei 30°C zeigten die Isolate des 5/97-16-Typs kein Wachstum mehr. Die Isolate des 5/97-54-Typs wuchsen dagegen bei 30°C im Mittel noch schneller als bei 15°C.

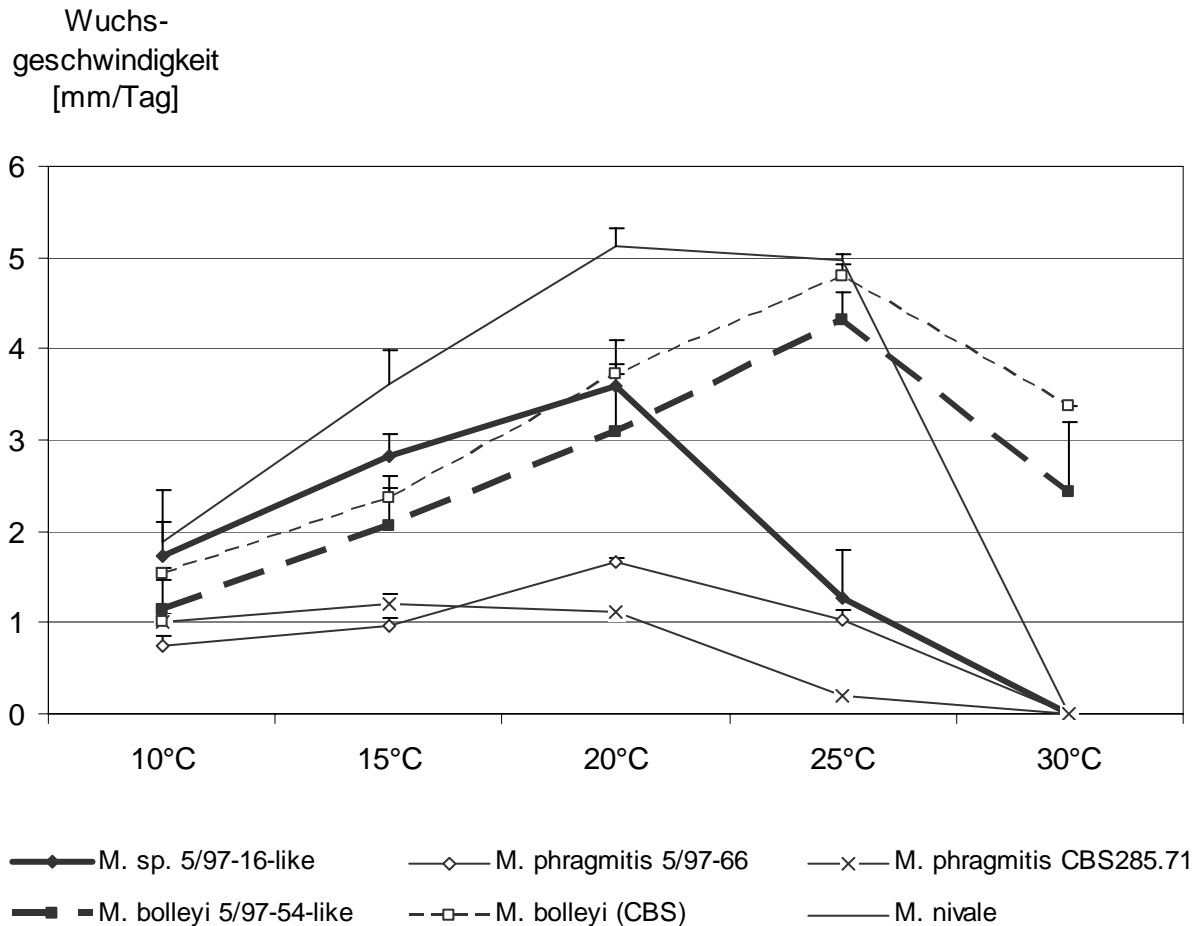


Abbildung 32: Mittlere Wuchsgeschwindigkeiten der *Microdochium*-Arten. Für *M. bolleyi* 5/97-54-like bzw. für *M. spec.* 5/97-16-like wurden je fünf bzw. vier Isolate vom Bodensee untersucht. Für *M. bolleyi* und *M. nivale* standen jeweils zwei CBS-Stämme als Referenzen zur Verfügung. Für *M. phragmitis* stand ein Isolat vom Bodensee und ein CBS-Referenzstamm zur Verfügung. Pro Isolat standen Messungen aus drei Replikaten zur Verfügung. Die angegebenen Werte leiten sich aus den zuvor für jedes Isolat einzeln ermittelten Durchschnittswerten ab. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Der verwendete Datensatz entspricht jenem in Abbildung 31.

Die Wuchsgeschwindigkeiten der beiden häufigsten Sequenztypen vom Bodensee, *M. bolleyi* und *M. sp.* Sequenztyp 5/97-16-like wurden einem statistischen Vergleich unterzogen, um etwaige signifikante Unterschiede zwischen beiden Typen aufzuzeigen. Die in Abbildung 32 wiedergegebenen durchschnittlichen Wuchsgeschwindigkeiten dieser beiden Hauptvertreter (fett gedruckte Linien) wurden bei statistischer Analyse mit Dunnett's Test bei 10°C, 15°C, 25°C und 30°C als signifikant verschieden nachgewiesen ($p < 0,05$). Eine zusätzliche verfei-

nernte Untersuchung mit multifaktorieller Varianzanalyse (MANOVA) unter Berücksichtigung der Abhängigkeit der einzelnen Replikate eines Isolates bestätigte die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$). Bei 20°C waren die Werte nicht signifikant verschieden. Ein Bereich ohne signifikante Unterschiede existiert zwangsläufig im Kreuzungsbereich der Kurven, wo sich die Wuchsgeschwindigkeiten nicht unterscheiden (bei ca. 21°C).

Aus den obigen Daten ist eine auffällige Korrelation des Temperaturoptimums der beiden *Microdochium*-Arten mit der Bevorzugung gegensätzlicher Habitats durch die beiden PCR-Kladen erkennbar (siehe Abschnitte 3.2.2.2.1 und 3.2.2.2.3). Hierbei zeigte die Art mit dem niedrigeren Temperaturoptimum eine Bevorzugung überschwemmter Habitats und jene mit dem höheren Optimum eine Bevorzugung trocken liegender Bereiche des Schilfgürtels. Ebenso zeigte die temperaturempfindlichere Art *M. sp. 5/97-16-like* zusätzlich bei der Analyse des jahreszeitlichen Verhaltens mit PCR (Klade I) eine ausgeprägtere Verminderung der Detektionshäufigkeit während der warmen Sommermonate als der auch bei höheren Temperaturen noch gut wachsende *M. bolleyi* (Klade II; siehe Abschnitt 3.2.2.2.2, Abbildung 14, Abbildung 15).

3.6.2 Konkurrenztests *in vitro*

Konkurrenztests dienen zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen zwei oder mehreren Organismen hinsichtlich Konkurrenz und Durchsetzungsfähigkeit. Durch den Einsatz weniger, definierter Organismen können aufgrund ihrer sonst zu großen Komplexität in der Natur nicht analysierbare Systeme vereinfacht dargestellt und untersucht werden.

Die durchgeführten *in vitro*-Konkurrenztests dienen zur Erzielung von Anhaltspunkten für die Durchsetzungsfähigkeit von *Stagonospora*-Isolaten gegenüber anderen Pilzgattungen im Freiland, bzw. in der Schilfpflanze. Gleichermaßen dienen sie dazu, mögliche Erklärungen für den offensichtlichen Verlust von *Stagonospora* im Makrokosmos (siehe Abschnitt 3.3.3) und das damit verbundene Ausbleiben von Wuchseffekten zu suchen. Diese Tests waren ausschließlich auf *Stagonospora* fokussiert, d.h. die zahlreichen anderen Schilfpilze wurden nicht untereinander kombiniert, da dies – insbesondere bei der Verwendung mehrerer verschiedener Medien – über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen wäre. Die Tests wurden auf drei verschiedenen Medien durchgeführt, um eventuelle substratabhängige Variationen des Verhaltens erkennen zu können. Malzagar wurde als Standardvollmedium für Pilze verwendet, auf welchem alle im Test eingesetzten Pilze ursprünglich auch isoliert worden waren. SNA wurde als nährstoffarmes Minimal-Medium eingesetzt; autoklavierte Schilfblätter wurden verwendet, um dem natürlichen Substrat der Schilfendophyten möglichst nahezukommen. Aufgrund seiner geringen Wuchsgeschwindigkeit wurde das *Stagonospora*-Isolat 4/99-1 zwei Tage vor den schneller wachsenden Konkurrenten inokuliert. Auf Basis der möglichen Interaktionen (Abbildung 33) wurde ein Punktesystem erstellt (siehe Abschnitt 2.3.3, Tabelle 3), das für die Ableitung eines Antagonismus-Index diente (modifiziert nach Yuen et al., 1999). Die dargestellten Werte basieren auf dem Gesamt-Phänotyp aller drei Replikate eines Ansatzes. Die Beurteilung erfolgte im Vergleich zu den Kontrollansätzen (jeder Konkurrent mit sich selbst kombiniert, siehe Abschnitt 2.3.3) hinsichtlich Wuchsverhalten, Koloniemorphologie und Veränderung der Wachstumszone. Wesentliche Differenzen zwischen den Replikaten wurden nicht festgestellt.

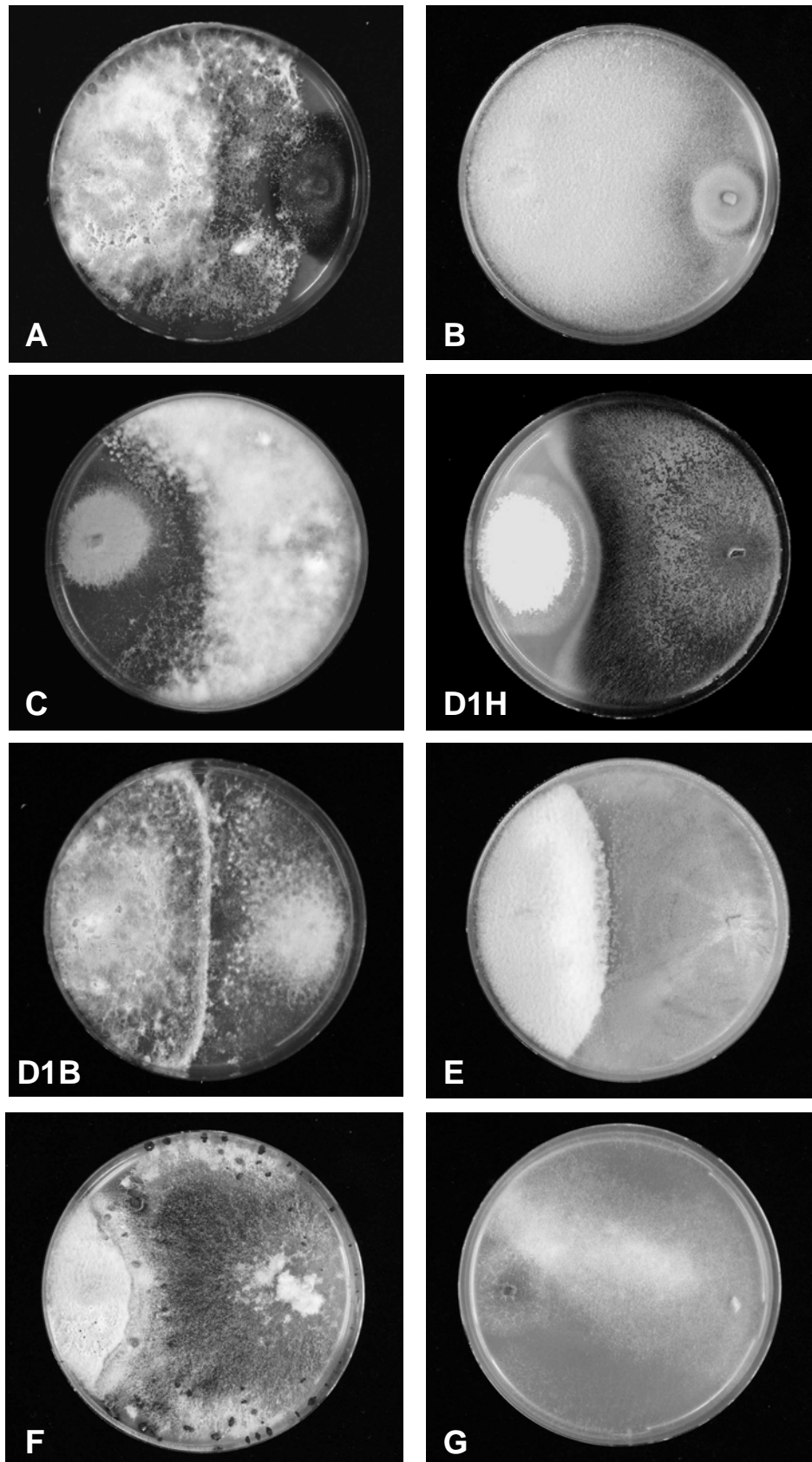


Abbildung 33: Interaktionstypen im Wettbewerbstest. Dargestellt sind ausgewählte Beispiele der Wechselwirkungen zwischen *Stagonospora*-Isolaten und den Konkurrenten auf Malz-agar. Die Inokulumspunkte liegen sich horizontal paarweise gegenüber (siehe Abbildung 3A). *Stagonospora* ist jeweils links platziert und der Konkurrent rechts.

Das interagierende Paar ist in Klammern hinter dem jeweiligen Interaktionstyp angegeben. Kategorien: A = *Stagonospora* überwächst Kompetitor (4/99-18 ↔ *Cladosporium* 5/97-8). B = *Stagonospora* hemmt und umwächst Kompetitor (4/99-5 ↔ *Rhino-cladiella* 6/97-36). C = *Stagonospora* hemmt Kompetitor (4/99-1 ↔ *Geotrichum* 6/97-17). D1H = Beide Kompetitoren sind gehemmt, zusätzlich Ausbildung eines Hemmhofes (4/99-1 ↔ *Microdochium* 5/97-54). D1B = Beide Kompetitoren sind gehemmt, zusätzlich Ausbildung einer Barriere durch *Stagonospora* (4/99-18 ↔ *Epicoccum* 4/99-12). E = Kompetitor hemmt *Stagonospora* (4/99-5 ↔ *Penicillium* 5/97-5). F = Kompetitor hemmt und umwächst *Stagonospora* (4/99-5 ↔ *Sclerotinia* 5/97-19). G = Kompetitor überwächst *Stagonospora*, im Beispiel ist die *Stagonospora*-Kolonie zusätzlich lysiert (4/99-1 ↔ *Trichoderma* A11), für intakte 4/99-1-Kolonien siehe Interaktionen C und D1H. Bemerkung zu den Interaktionen C, D1H und G: Bei dem *Stagonospora*-Isolat 4/99-1 handelt es sich um eine relativ langsam wachsende Art (siehe Abbildung 30).

Die Index-Werte für die Kompetitionsfähigkeit der *Stagonospora*-Arten lagen meist nahe an bzw. unter der Neutralitätsgrenze (Abbildung 34). Bei den Isolaten 4/99-5 und 4/99-18 schwankten die Punktschichten (Summe aller für *Stagonospora* auf Basis der Interaktionstypen zugeordneten Punkte) in Abhängigkeit des Mediums, wobei SNA, das artifizielste Substrat, die niedrigsten Punktschichten ergab. Lediglich für das Isolat 4/99-1 lagen sie bei allen drei Medien knapp über der Neutralitätsgrenze. Hieraus ergibt sich, dass die *Stagonospora*-Isolate zumindest unter den gewählten Versuchsbedingungen, d.h. den Medien und der Temperatur (20°C) nur mäßig kompetitionsfähig sind. Diese Temperatur wurde gewählt, da sie für alle hier untersuchten Isolate gute Bedingungen nahe deren Optimumsbereich bietet (siehe Abbildung 30).

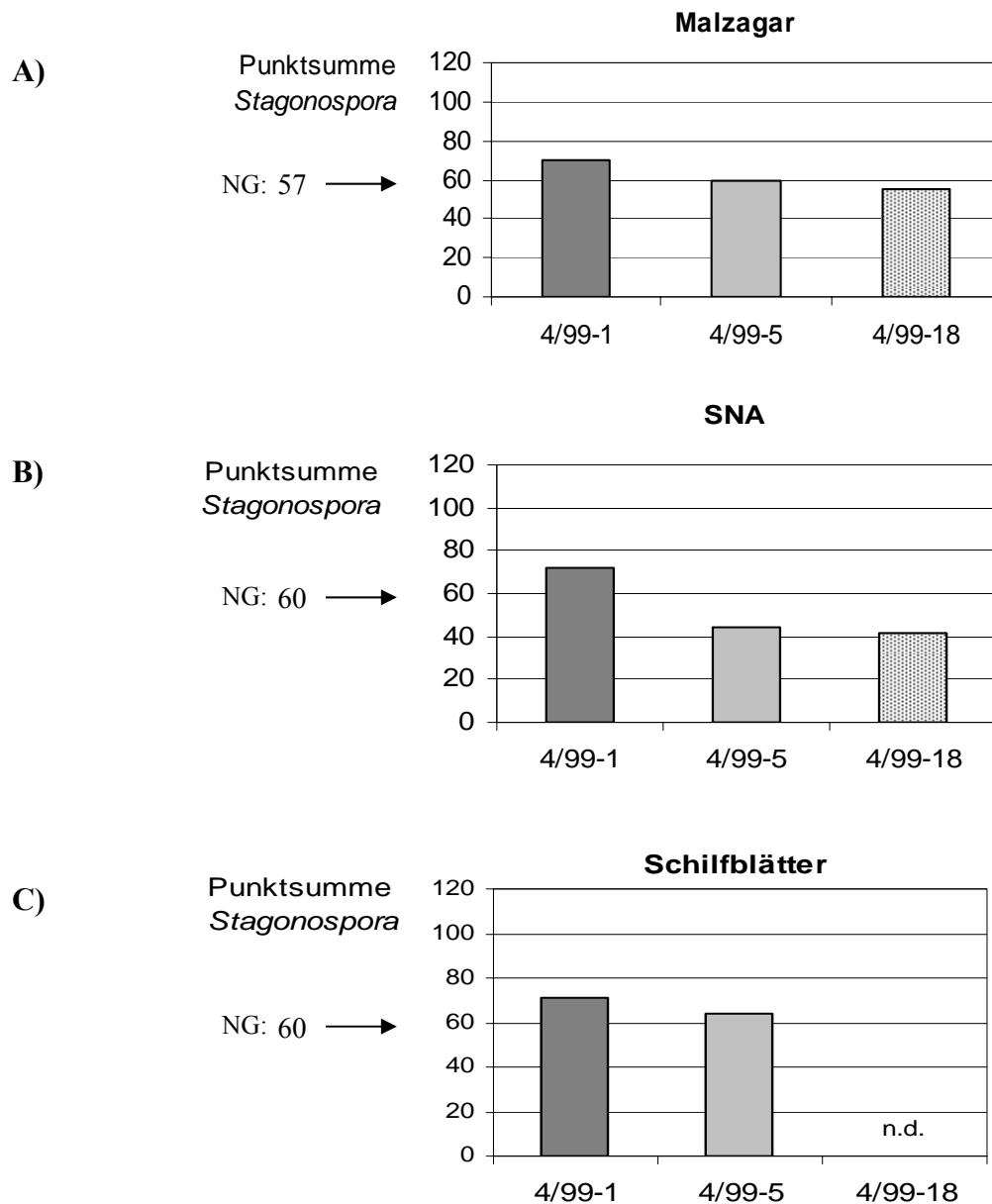


Abbildung 34: Wettbewerbsindex von *Stagonospora*-Isolaten gegen andere Schilfpilze *in vitro*.

Dargestellt ist die Punktsumme, die sich aus den Interaktionen mit den anderen Pilzen auf drei verschiedenen Medien zugunsten von *Stagonospora* ergab. Die Angabe NG, Zahl und Pfeil markieren die Neutralitätsgrenze der Gesamtheit der Interaktionen. Die Neutralitätsgrenze ist definiert durch den halbmaximal möglichen Wert, den ein Isolat erreichen kann. Die Neutralitätsgrenzen weichen bedingt durch die unterschiedliche Anzahl eingesetzter Kompetitorstämme voneinander ab. A) Index für *Stagonospora* gegen 19 verschiedene Isolate auf Malzagar; die maximal mögliche Punktsumme beträgt 114. B) und C) Index für *Stagonospora* gegen 20 verschiedene Isolate auf SNA (B) und Schilfblättern (C); die maximal mögliche Punktsumme beträgt 120. n.d. = keine Daten vorhanden.

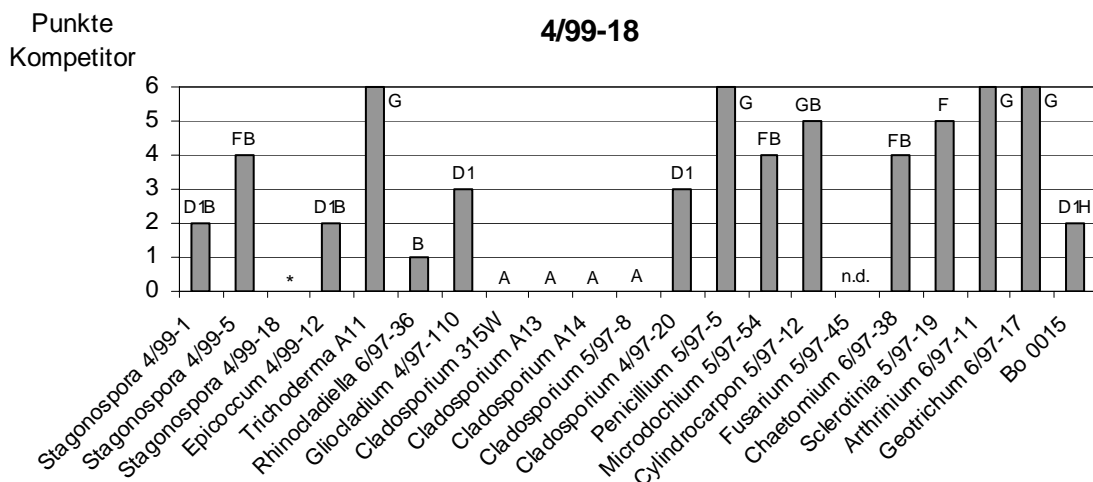
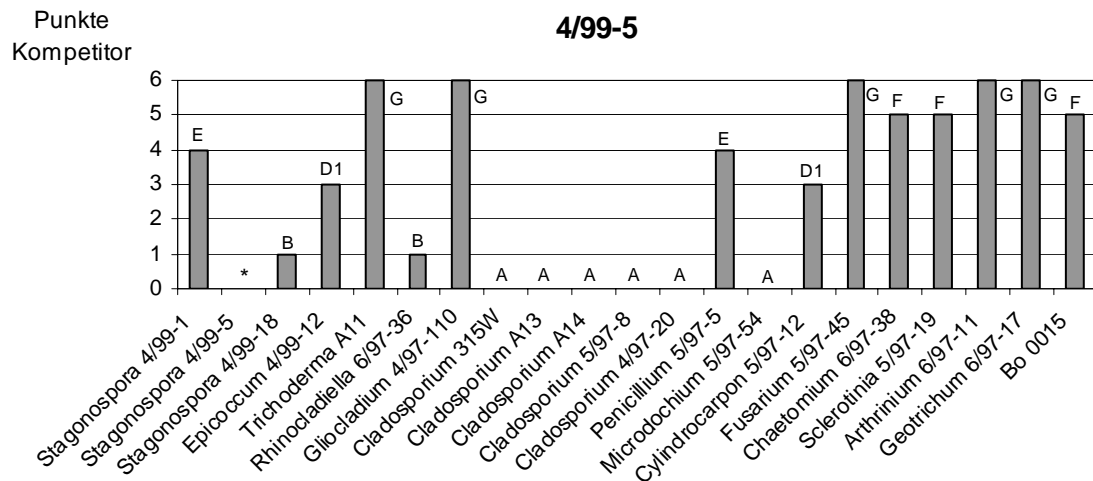
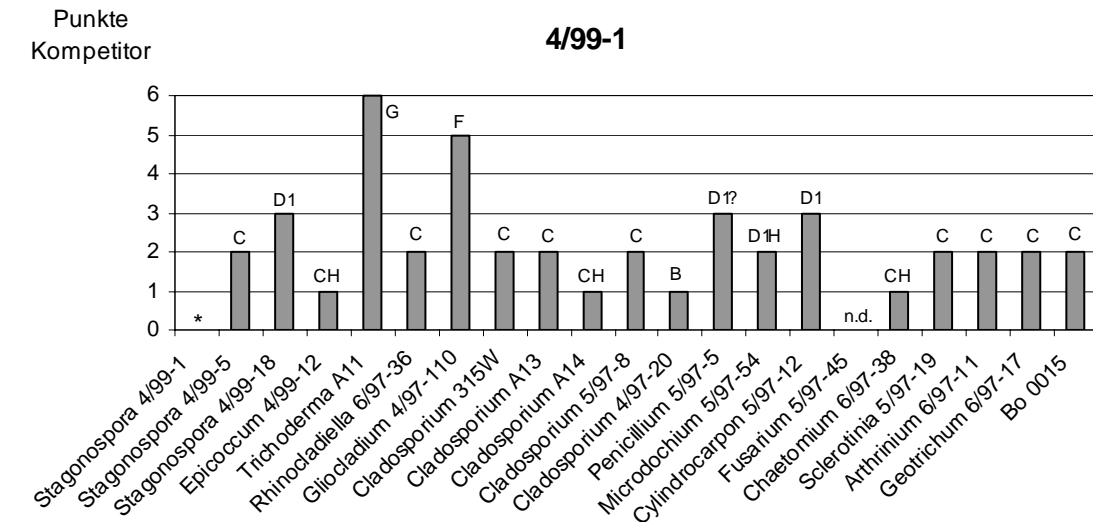


Abbildung 35: Einfluss der Kompetitoren auf *Stagonospora* auf Malzagar. Auf Basis der beobachteten Interaktion werden maximal 6 Punkte zugeordnet: > 3 Punkte = Kompetitor beeinträchtigt *Stagonospora*; 3 Punkte = neutrale Interaktion; < 3 Punkte = Kompetitor wird durch *Stagonospora* gehemmt. Über jeder Säule ist der Interaktionstyp angegeben (siehe Tabelle 3). * keine Darstellung der Interaktion mit sich selbst (= neutral, 3 Punkte). n.d. = keine Daten vorhanden.

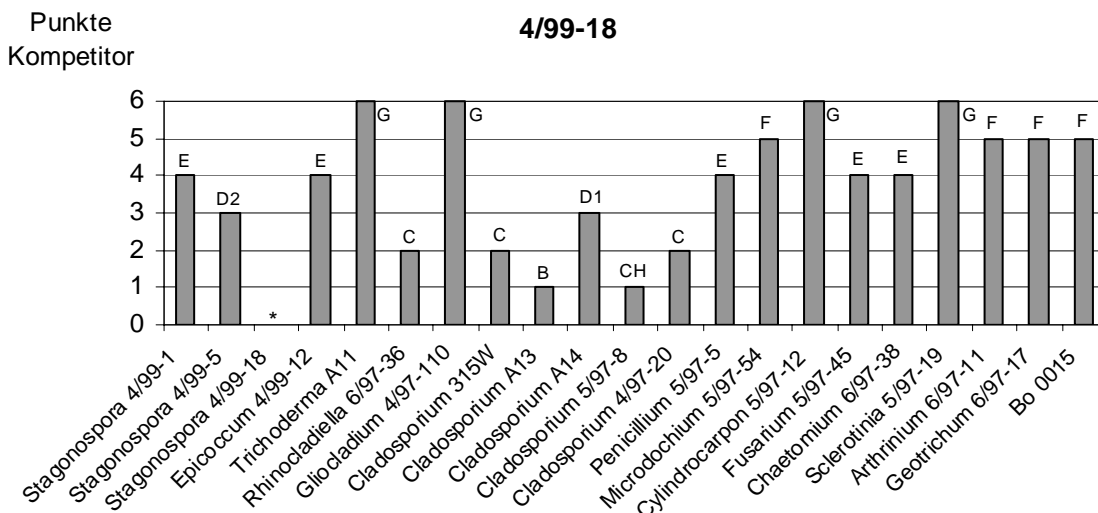
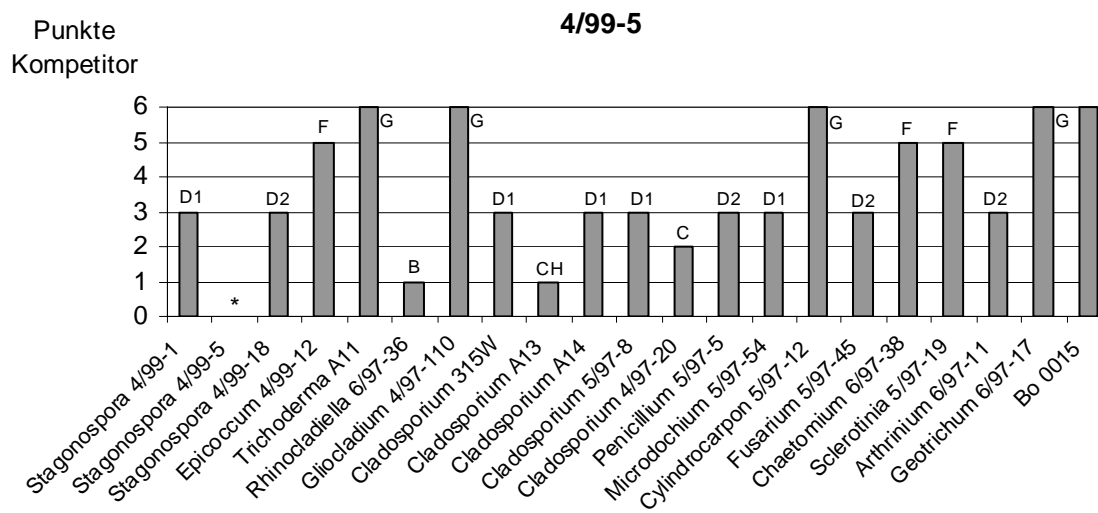
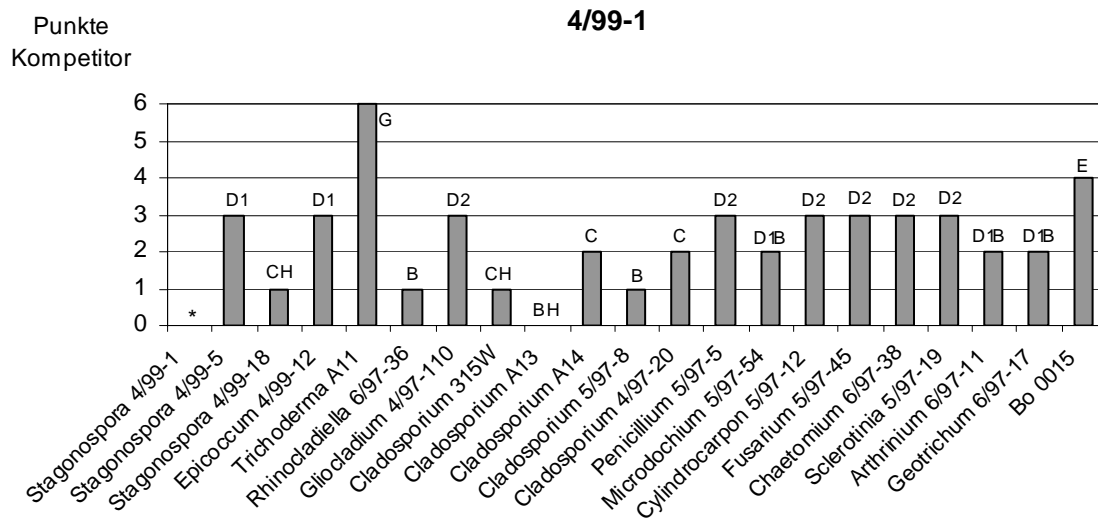


Abbildung 36: Einfluss der Kompetitoren auf *Stagonospora* auf SNA. Auf Basis der beobachteten Interaktion werden maximal 6 Punkte zugeordnet: > 3 Punkte = Kompetitor beeinträchtigt *Stagonospora*; 3 Punkte = neutrale Interaktion; < 3 Punkte = Kompetitor wird durch *Stagonospora* gehemmt. Über jeder Säule ist der Interaktionstyp angegeben (siehe Tabelle 3). * keine Darstellung der Interaktion mit sich selbst (= neutral, 3 Punkte).

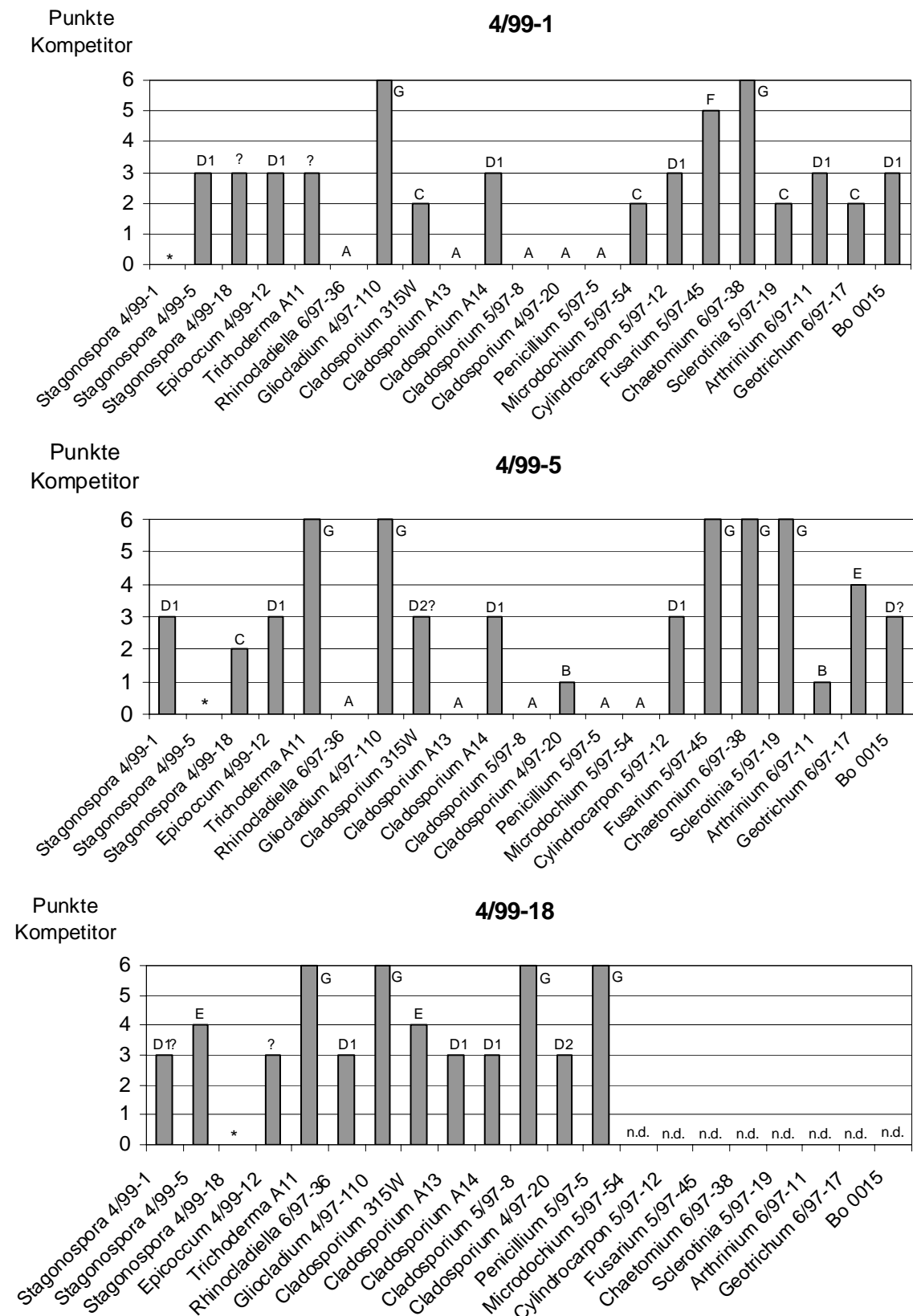


Abbildung 37: Einfluss der Kompetitoren auf *Stagonospora* auf Schilfblättern. Auf Basis der beobachteten Interaktion werden maximal 6 Punkte zugeordnet: > 3 Punkte = Kompetitor beeinträchtigt *Stagonospora*; 3 Punkte = neutrale Interaktion; < 3 Punkte = Kompetitor wird durch *Stagonospora* gehemmt. Über jeder Säule ist der Interaktionstyp angegeben (siehe Tabelle 3). * keine Darstellung der Interaktion mit sich selbst (= neutral, 3 Punkte). n.d. = keine Daten vorhanden.

Bei Betrachtung der Konkurrenz innerhalb der drei *Stagonospora*-Isolate zeigten die Isolate 4/99-1 und 4/99-5 insgesamt die gleiche Konkurrenzfähigkeit (insgesamt je 19 Punkte, Summe aus Abbildung 35, Abbildung 36, Abbildung 37). 4/99-18 war bei der gattungsinternen Konkurrenz das Isolat mit der geringsten Durchsetzungsfähigkeit (insgesamt 13 Punkte, Neutralitätsgrenze = 18 Punkte). Die aus dem Konkurrenztest erhaltenen Ergebnisse widerspiegeln hierbei auch näherungsweise die Häufigkeitsverhältnisse bei der Isolierung aus Schilfsamen (siehe Tabelle 12); das konkurrenzschwächste Isolat 4/99-18 war zugleich auch das seltenste. Die Interaktion der einzelnen Konkurrenten gegenüber *Stagonospora* zeigte bei Betrachtung ihrer Abhängigkeit von den verschiedenen Medien kein einheitliches Muster. Für einige Gattungen, wie z.B. *Cladosporium*, wurde eine deutliche, z.T. gegenläufige Variation des Verhaltens sowohl in Abhängigkeit des Mediums als auch der anwesenden *Stagonospora*-Isolate festgestellt (Abbildung 35, Abbildung 36, Abbildung 37). Unter den ausgewählten Gegenspielern erwiesen sich Vertreter der Gattungen *Trichoderma* und *Gliocladium* als besonders starke Konkurrenten; sie waren auf allen drei Medien meist deutlich dominant über alle *Stagonospora*-Isolate. Durch *Trichoderma* wurden die *Stagonospora*-Kolonien überwachsen und vollständig lysiert (siehe z.B. Abbildung 33G). Das kompetitive Verhalten von *Stagonospora* gegenüber *Microdochium* (5/97-54) wurde in den durchgeführten Tests als z.T. dominant ermittelt. Dominanz von *Stagonospora* zeigte sich bei den Isolaten 4/99-1 und 4/99-5 (6 bzw. 3 Punkte für *Microdochium*, Neutralitätsgrenze = 9 Punkte; Abbildung 35, Abbildung 36, Abbildung 37). Dagegen dominierte *Microdochium* über das Isolat 4/99-18 (9 Punkte bei Neutralitätsgrenze = 6 Punkte; Abbildung 35, Abbildung 36). Das Ergebnis passt zu dem bei 4/99-1 durch PCR nachgewiesenen, unter dem Zufalls-Erwartungswert liegendem gemeinsamen Auftreten beider Gattungen in Pflanzen im Freiland (siehe Abschnitt 3.2.2.2.5). Insgesamt zeigen die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro* Konkurrenztests, dass die Konkurrenzfähigkeit der *Stagonospora*-Arten meist nahe an bzw. unter der Neutralitätsgrenze der Interaktion lag. Lediglich für das *Stagonospora*-Isolat 4/99-1 schien ein leichter kompetitiver Vorteil zu bestehen. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Durchsetzungsfähigkeit von *Stagonospora* auch im Freiland begrenzt sein dürfte, was möglicherweise das schlechte Reisolierungsergebnis aus dem Makrokosmos erklärt (vgl. Tabelle 20, Abschnitt 3.3.3).

4. Diskussion

4.1 Isolierung und Charakterisierung von *Stagonospora* spp. als Endophyten im Schilf

4.1.1 *Stagonospora* spp. als samenbürtige Endophyten

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass samenbürtige endophytische Pilze beim Schilf vorkommen. Analog den Koch'schen Postulaten für Pathogene (Schlösser, 1997) wurde dabei für die Vertreter der Gattung *Stagonospora* die Assoziation mit dem Wirt gezeigt. Dies geschah durch die Erfüllung der in den Koch'schen Postulaten geforderten Isolierung aus dem Wirt, Haltung in Reinkultur, Re-Infektion, den Nachweis der Wirkung auf den Wirt sowie Re-Isolierung und Identitätsvergleich. Zusätzlich zu den Berichten über endophytisches Vorkommen von *Stagonospora*-Arten in Weizen (Leuchtmann, 1984; Sieber, 1985; Sieber et al., 1988) und in anderen Pflanzen (siehe unten) findet sich hierdurch ein weiterer Beleg für samenbürtig-endophytisches Vorkommen von *Stagonospora*-Arten. Es wurde deutlich, dass Vertreter der Gattungen *Stagonospora* (mit Teleomorphen in *Phaeosphaeria*), die bisher allgemein bei Monocotyledonen häufig als Pathogene angesehen wurden, darüber hinaus auch als neutrale Endophyten, und sogar als mutualistische Partner betrachtet werden können. Durch die vorliegende Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass samenbürtige mutualistische Pilze außer bei Weidegräsern, bei denen *Neotyphodium/Epichloë*-Arten als symbiontische Partner auftreten, auch bei primär nicht landwirtschaftlicher Nutzung dienenden Gräsern wie Schilf vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei *Stagonospora*-Arten von Schilf am Bodensee isoliert, deren Artzugehörigkeit nicht vollständig aufklärbar war. Auf Grund der teilweise unzureichenden Auflösung in der Phylogenie (siehe Abbildung 6) ließ sich bei den Isolattypen 4/99-5 und 4/99-18 die Artzugehörigkeit nicht eindeutig klären. Daher wurden in dieser Arbeit alle drei Typen nur als *Stagonospora* sp. bezeichnet.

Eine ähnliche Situation, in der über die ITS-Sequenzen alleine die phylogenetischen Zusammenhänge nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, fand sich bereits bei der ebenfalls im Schilf an Bodenseestandorten in mehreren Arten vorkommenden Gattung *Cladosporium* (Wirsel et al., 2002). Eine vollständige Aufklärung war hierbei erst durch die zusätzliche Erstellung einer Actin-Phylogenie und deren Kombination mit der ITS-Phylogenie möglich. Solche zusätzlichen phylogenetischen Untersuchungen an weiteren Genen für *Stagonospora* durchzuführen, wäre über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen und wurde daher nicht gemacht.

Es ist möglich, dass zwei der drei am Bodensee entdeckten *Stagonospora*-Typen neue, unbekannte Arten repräsentieren. Ihre Sequenzen sind nicht mit den ITS-Sequenzen bekannter Referenzarten identisch. Diese Entdeckung zeigt auf, dass es sich bei diesen Endophyten nicht um Varianten handelt, die sich direkt von bereits bekannten Pathogenen ableiten. Vielmehr könnte es sich um neue Arten handeln, ähnlich der Situation der endophytischen Gemeinschaft einer Kiefernart (*Pinus monticola*), welche eine bisher unbekannte Biodiversität aufzeigte (Ganley et al., 2004). Als Ursprung für die strikt asexuellen samenbürtigen Gras-

Endophyten der Gattung *Neotyphodium* wurde der spontane Verlust des sexuellen Status bzw. vegetative Hybridisierung (Anastomose) zwischen zwei Arten nachgewiesen (Moon et al., 2004; Schardl et al., 2004). Unter den Vertretern dieser Gattung wurde dabei ein Vorherrschen von Hybriden gezeigt, die alle Einzelentstehungen ohne gemeinsamen Ursprung sind. Da alle Isolate des *Stagonospora*-Sequenztyps 4/99-1 keinerlei Sporulation zeigten, ist es erwägenswert, ob dieser Typ möglicherweise ebenfalls durch derartige Vorgänge entstanden sein könnte.

Die Vertreter der Teleomorph-Gattung *Phaeosphaeria* Miyake und der dazugehörigen Anamorph-Gattung *Stagonospora* (Sacc.) Sacc. kommen überwiegend auf Blättern und Stängeln von Monocotyledonen (Einkeimblättrige Pflanzen) vor (Leuchtman, 1984; Shoemaker & Babcock, 1989). Etliche Vertreter sind Parasiten auf Getreide, Wildgräsern, Seggen und Binsen (Shoemaker & Babcock, 1989). Daneben wurde auch über saprophytisches Auftreten auf abgestorbenen Pflanzenteilen berichtet (Leuchtman, 1984). Einige Vertreter kommen aber auch als Endophyten vor. Unter diesen ist ein bekanntes Getreidepathogen, *Stagonospora nodorum* (Brönnimann, 1968; siehe auch Abschnitt 1.3.3), das bei Weizen auch endophytisch und in samenbürtiger Assoziation vorkommt (Leuchtman, 1984; Sieber, 1985; Sieber et al., 1988; Sieber, 2002). Ursache für den Wechsel zwischen beiden Verhaltensweisen dürfte ein Gleichgewicht zwischen pilzlicher Virulenz und pflanzlicher Abwehr sein. Dessen Verschiebung aufgrund von Umweltbedingungen und des Alters der Wirtspflanze kann zu erhöhter pilzlicher Virulenz bzw. geringerer pflanzlicher Abwehr und somit zum Krankheitsausbruch führen (Schulz et al., 2002). Des weiteren können die genetischen Unterschiede zwischen pathogenen und endophytisch-mutualistischen Stämmen der gleichen Art gering sein, was an einer *Colletotrichum*-Mutante gezeigt wurde (Freeman & Rodriguez, 1993; Redman et al., 1999; vgl. Abschnitt 1.3.3). Aufgrund der Definition endophytischer Pilze (siehe Abschnitt 1.3.3) ist hier nicht auszuschließen, dass es sich um eine lange Latenzphase eines prinzipiell als pathogen anzusehenden Pilzes handelt. Publikationen über die Auslösung eines der von Endophyten bekannten positiven Effekte durch *S. nodorum* bei Weizen liegen nicht vor (Sieber et al., 1988).

Endophytisches Vorkommen von *Phaeosphaeria*/*Stagonospora*-Arten ist jedoch nicht nur bei Gräsern bekannt. Auch in Farnen der tropischen und gemäßigten Zonen (Petrini et al., 1992; Fisher & Punithalingam, 1993; Fisher, 1996) und in Palmen (Rodrigues & Samuels, 1990; Taylor et al., 1999) wurde endophytisches Vorkommen von Vertretern der beiden Gattungen beschrieben.

Von den mehr als 120 Arten der Gattung *Phaeosphaeria* kommen 10 auch auf Schilf vor (Leuchtman, 1984; Shoemaker & Babcock, 1989; Camara et al., 2002). Unter diesen wiederum sind 5 Arten, die möglicherweise nur auf Schilf vorkommen. Auch für mehrere *Stagonospora*-Arten ohne bekanntes Teleomorph wurde in der Vergangenheit das saprophytische und parasitische Vorkommen auf Schilf beschrieben (z.B. Cunnell, 1957; Apinis et al., 1975; Taligoola et al., 1975; Bán et al., 2000; Engloner et al., 2000; vgl. Abschnitt 1.4). Über einen endophytischen, also symptomlosen Status von *Phaeosphaeria*- bzw. *Stagonospora*-Arten in lebendem Schilf konnten in der Literatur jedoch keine Hinweise gefunden werden.

4.1.2 Besiedelte Pflanzenteile und Besiedlungsmuster

Bei der Untersuchung vegetativer Pflanzenteile wurde *Stagonospora* im Schilf in allen Pflanzenteilen nachgewiesen, wobei in adulten Pflanzen die oberirdischen Teile deutlich bevorzugt wurden (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1). Die *Microdochium*-Arten traten dagegen v.a. in den unterirdischen Teilen auf (siehe Abschnitt 3.2.2.2.1).

Am Beispiel *Stagonospora* konnte bei adultem Schilf und natürlich besiedelten Keimlingen durch PCR das Vorkommen eines samenbürtigen Endophyten in allen Pflanzenteilen – insbesondere auch in den Wurzeln – gezeigt werden. Bei jungen Keimlingen und inokulierten sterilen Mikrokosmospflanzen lag eine sehr ausgeprägte Besiedlung der Wurzeln vor.

Das endophytische Wachstum von *Stagonospora* im Schilf konnte zusätzlich zur Reisolierung aus oberflächensterilisierten Mikrokosmospflanzen auch durch Mikroskopie bestätigt werden. Das Wachstumsmuster *in planta* zeigte dabei folgenden Befund (siehe Abschnitt 3.5 und Abbildung 29): In die Wurzel penetrierte der Pilz nur 1-2 Zellschichten tief und wuchs zwischen den Wurzelepidermiszellen und in Kontakt mit der ersten Schicht corticaler Zellen. In diesem Bereich wuchs der Pilz mit geraden Hyphen und relativ seltener Verzweigung längs der Wurzelachse. Eine Penetration der Wirtszellen wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten lichtmikroskopischen Untersuchungen nicht beobachtet. In den Halmen der Keimlinge wurden einzelne gerade Hyphen unter den epidermalen Zellen im parenchymatischen Gewebe beobachtet. In Blättern wurden einzelne lange Hyphen gefunden, die durch die Parenchyme wuchsen.

Nach Abschluss dieser Arbeit wurden weitergehende cytologische Untersuchungen des Infektionsprozesses an Schilf-Wurzeln mittels Lichtmikroskopie, cryo-Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt (Gao & Mendgen, Manuskript eingereicht). Hierbei zeigte *Stagonospora* an jungen Schilfkeimlingen nach dem Erreichen der Wurzel die Ausbildung eines Hyphennetzes auf der Wurzeloberfläche. Die Penetration in die Wurzel erfolgte direkt oder nach der Bildung Appressorien-ähnlicher Strukturen. Hierbei erfolgte keine Auflösung der Kutikula an der Penetrationsstelle. In anderen Fällen wurde eine seitliche Verdrängung der Wurzelepidermiszellen beobachtet, wobei der Pilz sich in den entstandenen Spalt zwängte. Wie bereits zuvor beobachtet, blieb das Wachstum von *Stagonospora* auf die Wände zwischen den Wurzelepidermiszellen und der ersten Schicht corticaler Zellen beschränkt. Nur wenige Hyphen drangen tiefer ein und erreichten die nächste Gewebsschicht. Durch die Anwesenheit der Pilzhyphen wurden pflanzliche Reaktionen ausgelöst. Sie bestanden in Veränderungen der Cytoplasmamembran und Ablagerungen an der Zellwand. Vereinzelt verließen Hyphen ihren Weg in der Zellwand, um ins Cytoplasma epidermaler oder corticaler Zellen zu penetrieren. Diese Penetrationsversuche wurden durch sofortige Papillenbildung von der Pflanze unterbrochen, wobei die Zellen vital blieben. Nur in seltenen Fällen wurden infolge erfolgter Penetration abgestorbene Zellen beobachtet. Die eingedrungenen Pilzhyphen blieben jedoch auf diese Zellen beschränkt und drangen nicht tiefer ins Gewebe ein (Gao & Mendgen, Manuskript eingereicht). Aus der cytologischen Untersuchung von *Stagonospora*-infizierten Schilfwurzeln ist somit ersichtlich, dass *Stagonospora* Wurzelgewebe besiedeln kann, ohne größere Schäden zu verursachen.

Die verwandte, als Getreidepathogen bekannte (Brönnimann, 1968), aber auch endophytisch vorkommende Art *Stagonospora nodorum* (Spelzenbräunerreger, Teleomorph *Phaeosphaeria nodorum*) besiedelt bei Winterweizen ebenfalls alle Teile der Pflanze. Sie war endophytisch in unteren Halmabschnitten häufiger als in Blättern, aber auch in Wurzeln von Bedeutung (Riesen, 1985; Sieber, 1985; Sieber et al., 1988; Sieber, 2002). Das endophytische Wachstum von *S. nodorum* in Weizen ähnelt bezüglich der besiedelten Organtypen jenem bei *Stagonospora* im Schilf. Das Wachstum erfolgte ebenfalls interzellulär; nach dem Erreichen der Parenchyme folgten die Hyphenstränge jedoch den pflanzlichen Gefäßgeweben (Riesen, 1985). Bei einer weiteren verwandten Art, *Stagonospora innumerosa*, welche Blätter der Flatter-Binse (*Juncus effusus*) symptomlos besiedelt, wurde eine ähnliche Beschränkung des Wachstums wie bei *Stagonospora* 4/99-1 in Schilfwurzeln beobachtet. Hierbei blieb die Besiedlung auf jeweils einzelne Blattepidermiszellen der Binse beschränkt (Cabral et al., 1993).

Durch die samenbürtigen Grasendophyten der Gattungen *Epichloë/ Neotyphodium* werden oberirdische Teile, v.a. Nodien- und basale Blattmeristeme, sowie Blattscheiden und -spreiten besiedelt. Zugleich wird allgemein ein Ausschluss der Wurzeln bei der Besiedlung der Pflanze festgestellt (Siegel et al., 1984; Hinton & Bacon, 1985; Leuchtmann & Clay, 1997; Sieber, 2002; Schardl et al., 2004). Lediglich bei einer Art dieser Gruppe wurde auch das Vorkommen in Wurzeln von Keimlingen beobachtet (Azevedo & Welty, 1995). Generell unterscheidet sich das Ausbreitungsverhalten von *Stagonospora* spp. in der Pflanze also von der Mehrheit der Arten der bisher am besten untersuchten samenbürtigen Gattung *Neotyphodium*.

Die Gattung *Epichloë* (Anamorph *Neotyphodium*) zeigt interzelluläres Wachstum im Apoplast; es werden keine intrazellulären Hyphen und keine Haustorien gebildet (Schardl, 2001; Schardl et al., 2004). Bei der Besiedlung der oberirdischen Pflanzenteile zeigten die Pilzhypen wenige Verzweigungen (Christensen et al., 2002). In Blattscheiden erfolgte auch eine Besiedlung der Gefäßbündel (Christensen et al., 2001). P-Endophyten, die zuvor auch als *Phialophora*- und *Gliocladium*-like Isolate bezeichnet wurden und ebenfalls samenbürtig sind (An et al., 1993; Siegel et al., 1995), wachsen in oberirdischen Teilen mit deutlich mehr Verzweigungen als *Epichloë* bzw. *Neotyphodium* spp. und zeigen dabei auch größere Hyphenmengen (Christensen et al., 2002).

Piriformospora indica, ein in Wurzeln wachsender Endophyt (Stamm Basidiomycota, Familie Sebacinaceae), der bei verschiedenen Pflanzengattungen über Sekundärstoffe und mykorrhizaähnliche Funktionen starke Wachsförderung hervorruft, bildete nach dem Kontakt Appressorien. Nach der anfänglich interzellulären Besiedlung zeigte er anschließend in den Cortex-Zellen auch eine intrazelluläre Besiedlung mit Hyphenknäueln und Verzweigungen in den Zellen (Varma et al., 1999).

Bei der Besiedlung von Wurzeln durch „Dark Septate Endophytes“ (DSE), z.B. *Phialocephala fortinii* in *Pinus* (Kiefer), wurde ein den Beobachtungen bei *Stagonospora* im Schilf anfänglich ähnliches Besiedlungsmuster beobachtet (Jumpponen & Trappe, 1998; Sieber, 2002): Zunächst wurde die Wurzel von einem oberflächlichen Hyphennetz überzogen, dann erfolgte eine Besiedlung zwischen den corticalen Zellen mit einer Wuchsrichtung parallel zur Hauptachse der Wurzel. Schließlich wurden corticale Zellen penetriert mit Bildung von Appressorien und intrazellulären Zellaggregaten.

Aus den Daten, die bei vegetativen Teilen des Schilf erhalten wurden, ist insgesamt zu folgern, dass es sich bei *Stagonospora* 4/99-1 offenbar um einen weiteren systemischen Pilz handelt, da alle Pflanzenteile besiedelt werden. Das Besiedlungsmuster von *Stagonospora* spp. ähnelt hierbei jenem einiger anderer Endophyten, zeigt jedoch kein völlig zu irgendeinem Typ passendes Muster. Es zeigt den DSE ähnliche Wurzelbesiedlung, während wiederum das gering verzweigte Hyphenwachstum in den oberirdischen Teilen eher *Neotyphodium* gleicht. Aber auch beim Vergleich mit Pathogenen zeigt sich, dass sich *Stagonospora* anfänglich hinsichtlich des Infektionsvorganges nicht von diesen unterscheidet (Gao & Mendgen, Manuskript eingereicht). Von pathogenen Wurzelpilzen unterscheidet sich das Wachstumsmuster von *Stagonospora* 4/99-1 schließlich durch die begrenzte Ausbreitung (Gao & Mendgen, Manuskript eingereicht) und das Fehlen makroskopisch sichtbarer Symptome (Kexiang Gao, persönliche Mitteilung), welches auch bereits in den Mikrokosmen festgestellt wurde. Das auf bestimmte Gewebe begrenzte Wachstum von *Stagonospora* in der Schilf-Pflanze deutet wie auch bei *Stagonospora innumerosa* in Binsen auf eine Regulation des Besiedlungsausmaßes durch die Wirtspflanze durch deren Abwehrreaktionen hin (Cabral et al., 1993). Hierbei könnten vom Pilz ausgeschiedene und von der Pflanzenzelle als Elicitor erkannte Moleküle einen Regulationsmechanismus darstellen (Gao & Mendgen, Manuskript eingereicht).

Für *Stagonospora* sp. 4/99-1 liegen offenbar Differenzen zwischen den Verteilungsmustern in jungen Pflanzen im Labor und jenen in adulten Pflanzen voll etablierter Bestände im Freiland vor. Beim PCR-Nachweis an Material aus adulten, also mindestens 3-jährigen Pflanzen von Seeuferbeständen wurde eine verstärkte Besiedlung oberirdischer Teile im Vergleich zu den unterirdischen Teilen festgestellt (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1). Sowohl in Mikrokosmen mit 4-5 Monate alten, also relativ jungen Pflanzen, als auch bei der Untersuchung von jungen Keimlingen aus Saatgut mit natürlicher Pilzbefruchtung wurde ein entgegengesetztes Muster festgestellt. Bei beiden wurde eine deutliche Bevorzugung der Wurzeln detektiert (Abbildung 11, Abbildung 20). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei einer der sonst nur in oberirdischen Teilen vorkommenden *Neotyphodium*-Arten gemacht. Hier konnte gezeigt werden, dass der Pilz zumindest temporär doch in Wurzeln junger Keimlinge vorkommt (Azevedo & Welty, 1995). Dabei wurde eine Abnahme der Infektionshäufigkeit mit zunehmendem Alter der Keimlinge festgestellt. Gegensätzliche Beobachtungen des Verhaltens des Pilzes in jungen und adulten Pflanzen bzw. in Mikrokosmos-Kulturen und Pflanzen im Freiland sind demnach kein Einzelfall. Sie könnten in der physiologischen Situation der Pflanze und den im Freiland hinsichtlich Sporenflug sowie Konkurrenz anderen Bedingungen begründet liegen. Trotz der gegensätzlichen Befunde bei der Wurzelbesiedlung von jungen und adulten Pflanzen wurde – sowohl in Mikrokosmen als auch in Keimlingen aus Saatgut mit natürlicher Pilzbefruchtung – auch an jungen Pflanzen das Aufsteigen von *Stagonospora* in die oberirdischen Schilf-Pflanzenteile nachgewiesen.

In Samen konnte für *Stagonospora* 4/99-1 eine natürliche Pilzbesiedlung mit einem Mittelwert von 29% bei der Untersuchung von 96 einzelnen Samen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.2.1.3.3). In Extremfällen erreichte die Besiedlungshäufigkeit Werte bis zu 86% für einzelne Standorte und Jahre. Bei Keimlingen, die aus Saatgut mit natürlicher Pilzbesiedlung angezogen wurden, widerspiegelte die Detektionshäufigkeit des Einwuchses in die

Keimlinge den kultivierungsunabhängig nachgewiesenen Besiedlungsgrad der Samen (siehe Abschnitt 3.2.1.4 und Abbildung 11). Damit wurde ein hohes Maß an Lebensfähigkeit des in den Samen befindlichen Pilzes nachgewiesen.

Die verwandte Art *Stagonospora nodorum* wurde in Winterweizensamen mit 1,7% bis 3,7%, teilweise auch mit bis zu 13% Isolierungshäufigkeit nachgewiesen (Riesen, 1985; Sieber, 1985; Sieber et al., 1988). Somit wird diese Art auf dem Weg über die Samen offenbar etwas seltener übertragen als *Stagonospora* sp. 4/99-1 beim Schilf. Hierbei ist eine begrenzte Vergleichbarkeit von Isolierung und PCR zu berücksichtigen (siehe auch Abschnitt 4.2.1). Auch für andere Gras-Endophyt-Systeme liegen Daten über das Ausmaß der samenbürtigen Besiedlung vor: An Samen von verschiedenen Arten der Gattung *Festuca* (Schwingel) aus natürlichem Vorkommen wurden maximale Pilzbesiedlungshäufigkeiten durch *Epichloë/Neotyphodium* von 32% bis 98% bzw. 82% bis 87% mit Hilfe von Mikroskopie sowie serologischen Techniken ermittelt (Saikkonen et al., 2000; Rolston et al., 2002). Außerdem konnten an *Festuca*-Keimlingen aus Samen von zuvor artifiziell inokulierten Pflanzen Besiedlungsgrade von 31% bis 100% durch verschiedene als samenbürtig bekannte Vertreter der Gattungen *Neotyphodium* (alte Bezeichnung: *Acremonium*), *Epichloë* sowie *Phialophora*- und *Gliocladium*-ähnliche Typen nachgewiesen werden (Latch & Christensen, 1985). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass eine andere Ausgangssituation vorliegt, da die artifizielle Inokulation durch Platzierung von Mycel ins Koleoptilgewebe von Sämlingen erfolgte. Aufgrund der relativ langen Zeit von der Keimung bis zur Fruktifikation der adulten Pflanze, kann daraus vermutlich dennoch das Ausmaß der prinzipiell möglichen natürlichen Verbreitungsfähigkeit dieser Pilze über Samen abgeleitet werden.

Eine pilzliche Besiedlung der Samen mit 100% Häufigkeit stellt einen Idealfall vertikaler Übertragung dar, der in natürlichen Habitaten kaum erreicht wird (Lewis et al., 1997; Ravel et al., 1997). Die tatsächlich vorkommenden Besiedlungshäufigkeiten sind meist deutlich geringer. Eine Ursache für geringere Besiedlungshäufigkeiten ist die Tatsache, dass der Pilz nicht in alle Samen einwächst. Zusätzlich unterliegen die samenbürtigen Pilze im Verlauf längerer Ruhezeiten der Samen einer Vitalitätseinbuße, die von Lagerdauer und Umwelteinflüssen abhängig ist (Leuchtmann & Clay, 1997; Ravel et al., 1997).

Trotz eventueller Fehlmengen bei der Übertragung ist die Persistenz einer samenbürtigen Pilzart in einer Pflanzenpopulation gesichert (Ravel et al., 1997; Saikkonen et al., 2002). Dies ist sogar auch dann noch möglich, wenn der Pilz auf die Pflanze überwiegend nachteilig wirkt, aber in einer bestimmten Lebensphase des Wirtes von Vorteil ist (Faeth & Sullivan, 2003). Unvollständige samenbürtige Übertragung könnte dabei teilweise durch eine auch bei asexuellen Endophyten gelegentlich vorkommende horizontale Übertragung mittels Hyphen oder Konidien sowie durch Wurzel-Wurzel-Kontakt der Wirtspflanzen ausgeglichen werden (Faeth, 2002; Faeth & Sullivan, 2003).

Für *Stagonospora* 4/99-1 beim Schilf wurde insgesamt ein ähnliches Ausmaß der samenbürtigen Besiedlung wie bei anderen Gras-Endophyt-Systemen ermittelt. Mögliche Erklärungen für die Persistenz des vertikal übertragenen Pilzes in den Wirtspopulationen finden sich in dessen Bedeutung für die Schilfpflanze hinsichtlich Wachsförderung (siehe Abschnitt 3.3.2.1) bzw. in einer offenbar temporär in besonderem Maße bestehenden Rolle bei den jungen Keimlingen (vgl. Faeth & Sullivan, 2003). Hier kann neben der Wachsförderung der in die-

sem Stadium empfindlichen Pflänzchen, die noch nicht mit weiteren Mikroorganismen besiedelt sind, auch zusätzlicher Schutz vor Infektion eine Rolle spielen.

4.1.3 Lebenszyklus von *Stagonospora* im Schilf

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Lebenszyklus und Verbreitungsmechanismen des Pilzes *Stagonospora* sp. Sequenztyp 4/99-1 im Schilf nicht vollständig aufgeklärt werden. Dennoch ergeben sich aus den verschiedenen Experimenten und aus der Literatur genügend Anhaltspunkte, um einen möglichen, jedoch teilweise als vorläufig zu betrachtenden Lebenszyklus zu erstellen (Abbildung 38).

Die Ergebnisse von PCR-Detektion an Freilandmaterial (Abbildung 10) sowie PCR und Mikroskopie an Keimlingen (Abbildung 11, Abbildung 29 B und C) deuten insgesamt darauf hin, dass der Pilz das ganze Jahr über in Wurzeln adulter Schilfpflanzen persistiert und sich während der Vegetationsperiode in den oberirdischen Teilen der Pflanze stark ausbreitet, d.h. in die frisch gebildeten oberirdischen Teile einwächst. In Grasendophyten-Systemen mit *Neotyphodium* konnte gezeigt werden, dass die Ausbreitung endophytischer Pilze in der Pflanze mit der Entwicklung der oberirdischen Pflanzenteile synchronisiert sein kann (Tan et al., 2001; Christensen et al., 2002). Diese Beobachtungen lassen bei *Stagonospora* einen ähnlichen Mechanismus vermuten.

Stagonospora ist im Juni in Halmen und Blättern nachweisbar und kommt somit bereits vor Beginn der von Juli/August bis September dauernden Blütezeit auch in den oberirdischen Pflanzenteilen vor (Abbildung 10). Auf dem Weg über den Stängel werden die Blüten und schließlich auch die Samen infiziert. Aus den Samen gehen wiederum infizierte Keimlinge hervor, womit der Pilz vertikal auf die nächste Wirtsgeneration übertragen worden ist. Durch PCR und Mikroskopie an Keimlingen aus Samen mit natürlicher Pilzbefruchtung konnte an einem natürlichen System die Effektivität des Pilzes bei der Samenverbreitung und dem Einwuchs in die verschiedenen Pflanzenteile, insbesondere in die Wurzeln, gezeigt werden (Abbildung 11, Abbildung 29 B und C).

Die Besiedlung der Wurzeln junger Winterweizenpflanzen mit der verwandten Art *Stagonospora nodorum* war bei Keimung aus unbehandeltem Saatgut bis zu 8x höher als bei Pflanzen aus mit Fungizid gebeiztem Saatgut (Sieber, 1985; Sieber, 2002). Dies deutet bei einer weiteren *Stagonospora*-Art die samenbürtige Übertragung auf die nächste Wirtsgeneration an. Die Daten für *Stagonospora* 4/99-1 zeigen eine mögliche vertikale Übertragung des Pilzes auf die nächste Wirtsgeneration an. Der gleiche Übertragungstyp liegt auch beim Lebenszyklus von *Neotyphodium*-Arten bzw. bei der fakultativ asexuellen, vertikalen Verbreitung mancher *Epichloë*-Arten vor (Tsai et al., 1994; Bush et al., 1997; Leuchtmann & Clay, 1997; Schardl & Clay, 1997; Schardl & Phillips, 1997; Leuchtmann & Schardl, 1998; Schardl, 2001). Im Gegensatz zu *Stagonospora*, dessen Persistenz vermutlich auf der Überwinterung in den Wurzeln basiert, ist bei *Neotyphodium* die Persistenz in der Wirtspflanze auch ohne Wurzelbesiedlung möglich. Der Pilz bleibt offenbar in meristematischen Geweben erhalten, von denen aus die sich daraus neu entwickelnden oberirdischen Abschnitte erneut infiziert werden (Hinton & Bacon, 1985). Ob *Stagonospora* zusätzlich ebenfalls in Meristemen persistiert, ist nicht bekannt.

Allgemein gilt, dass im Falle rein vertikaler Übertragung bei asexuellen Arten der Pilz sein sexuelles Rekombinationspotential und damit auch seine unabhängige Phase verloren hat; es liegt dann eine große Abhängigkeit des Pilzes von der Wirtspflanze vor (Saikkonen et al., 2004). Hierbei führt die nur noch über die Samen erfolgende Verbreitung potentiell zu einer verminderten Neuinfektion uninfizierter Pflanzen. Somit würde auch *Stagonospora* in diesem Fall (von Ausnahmen abgesehen) keine neuen, noch nicht-infizierten Pflanzen besiedeln können. Gleichzeitig wäre wegen unterschiedlicher Genflüsse bei Endophyt und Wirt wie auch bei *Neotyphodium* eine Auseinanderentwicklung der Interaktionspartner möglich (siehe auch Abschnitt 1.3.5), die zu einer Inkompatibilität zwischen beiden Organismen führen kann, wodurch dann mutualistische Effekte im Laufe der Zeit eine Abschwächung erfahren oder ganz verloren gehen könnten (Sullivan & Faeth, 2004).

Für die Infektion der nachfolgenden Pflanzengeneration über die Samen gibt es offenbar kein einheitliches Verhalten endophytischer Pilze. Für zwei *Neotyphodium*-Arten wurde eine Infektion des Embryo erst im Moment der Samenkeimung beschrieben. Bei der Keimung wuchs der Pilz entweder aus der Aleuron-Schicht des infizierten Samens bzw. aus Bereichen zwischen Endosperm und Epithelien des Scutellums in den sich entwickelnden Embryo bzw. Keimling ein (Hinton & Bacon, 1985; Schmidt, 1991). Dagegen wurde bei *N. lolii* in *Lolium* gezeigt, dass die jungen Embryonen noch ohne Mycel sind, aber schon während der Samenreifung infiziert werden. Hierbei wurde auch nachgewiesen, dass der Pilz ausschließlich durch maternales Gewebe übertragen wird (Majewska-Sawka & Nakashima, 2004). Auch bei einem samenbürtigen p-Endophyten (hier ein *Phialophora*-ähnlicher Typ) wurde eine Konzentration der Pilzhypen in Embryonen des Grases *Festuca* festgestellt (An et al., 1993). Bei der Symbiose von *Phomopsis casuarinae* in *Casuarina equisetifolia* (Kasuarbaum, Eisen-Grenadillholz) lag im Gegensatz zu den gerade beschriebenen Systemen eine pilzliche Besiedlung der inneren Samenschale vor, während der Embryo und die Keimblätter zunächst noch nicht infiziert waren (Bose, 1947). Der gleiche Entwicklungsgang wurde auch bei einem samenbürtigen pilzlichen Symbionten in der Pflanzenfamilie Cistaceae (Cistosen) festgestellt und bedeutet, dass der Embryo im ganzen Lebenszyklus das einzige Stadium ist, in welchem keine symbiontische Beziehung zwischen Pflanze und Pilz vorliegt (Bournnell, 1950). Während das Infektionsmuster je nach Art und Genotyp also zu variieren scheint, handelt es sich jedoch für jede Kombination stets um einen sehr spezifisch regulierten Vorgang (Majewska-Sawka & Nakashima, 2004). Für die Assoziation von *Stagonospora* mit den Schilfsamen liegen bezüglich der genauen Lokalisierung des Pilzes im Inneren des Samens und für den Zeitpunkt des Einwuchses in den pflanzlichen Embryo noch keine Informationen vor.

Neben der bisher beschriebenen Übertragung des Pilzes über die Samen ist ferner eine Infektion der adulten Pflanzen durch Flug von Sporen denkbar, die auf im Herbst abgestorbenen Pflanzenteilen gebildet werden (Abbildung 38). Diese Sporenverbreitung könnte zu dem beobachteten verstärkten Auftreten des Pilzes im Spätsommer, bzw. Früh-Herbst beitragen. Für die verwandte Art *Stagonospora nodorum* (Teleomorph *Phaeosphaeria nodorum*) bei Weizen wird neben deren samenbürtig-endophytischen Verbreitung eine Besiedlung neu gebildeter Blätter von der Blattoberfläche her, d.h. durch Sporenflug bzw. -Transport durch Spritzwasser vermutet (Sieber, 1985). Dabei bildet der Pilz auf abgestorbenem Pflanzen-

material, d.h. auf im Winterhalbjahr auf Weizenfeldern verbleibenden Ernteresten Asco- bzw. Pykno- sporen, von denen die Neuinfektion ausgeht (Brönnimann, 1968; Sieber, 1985). Auch für Schilf wurde die Besiedlung toter, stehender Halme durch sporulierende *Stagonospora*-Arten beschrieben (Apinis et al., 1975). Am Beispiel des Kakaobaumes wurde ebenfalls die Bedeutung lokaler Blattinfektionen durch Sporenflug – allerdings nicht-systemischer – endophytischer Pilze für die Besiedlung der Pflanze deutlich (Arnold et al., 2003). Da die Isolate des Sequenztyps 4/99-1 im Labor im Gegensatz zu den anderen *Stagonospora*-Sequenztypen nicht zum Sporulieren gebracht wurden, ist die Infektion durch Sporenflug jedoch nicht nachgewiesen. Untersuchungen diesbezüglich im Freiland wurden nicht durchgeführt. So lange hierfür kein Nachweis vorliegt, kann nicht definitiv geklärt werden, ob 4/99-1 wegen fehlender Fähigkeit zur Sporulation bzw. Konidienbildung ausschließlich rein vertikal über die Samen verbreitet wird, wie dies bei den *Neotyphodium*-Arten der Fall ist (Schardl & Phillips, 1997; Saikkonen et al., 2004). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass auch bei strikt asexuellen Pilzen horizontale Übertragung möglich ist (vgl. Abschnitt 4.1.2). Diese könnte durch Hyphen oder Wurzel-Wurzel-Kontakt der Wirtspflanzen erfolgen (Faeth, 2002; Faeth & Sullivan, 2003).

Eine weitere Möglichkeit der Infektion adulter Pflanzen ist somit die Besiedlung von Wurzeln durch vegetatives Mycelwachstum im Boden. Sie wird z.B. auch für die „Dark Septate Endophytes“ (DSE) aufgrund deren Allgegenwart im Boden diskutiert (Jumpponen & Trappe, 1998). Die Fähigkeit von *Stagonospora* zu saprophytischem Wachstum wurde durch Kulturen auf verschiedenen Medien belegt. Ebenso wurde die Fähigkeit zur Infektion der Wirtspflanze vom Erdboden aus durch die in den Mikrokosmen angewandte Inokulations-Methode auf der Erdoberfläche mit Distanz zur Pflanze und nachfolgender erfolgreicher Reisolierung nachgewiesen. Hierbei zeigte *Stagonospora* eine sehr gute Infektionsfähigkeit im Wurzelbereich, die mit dem Einwuchs in Keimlinge aus Samen mit natürlicher Pilzbefruchtung übereinstimmt (Abbildung 11, Abschnitt 3.3.2.1, Abbildung 20). Die Verfrachtung des Pilzes im Herbst zusammen mit dem seneszenten Blattmaterial auf den Boden wurde nicht durch eigene Untersuchungen belegt. Sie kann jedoch aufgrund von Beobachtungen bei der nahe verwandten Art *Stagonospora nodorum*, welche den Winter auf abgestorbenen Getreideteilen überdauert (Brönnimann, 1968; Sieber, 1985) als möglich angenommen werden. Nach Überwinterung im abgestorbenen Material könnte der Pilz im Frühjahr die Wurzeln der Schilfpflanze aufgrund der nachgewiesenen Fähigkeit zum saprophytischen Wachstum zusätzlich neu infizieren.

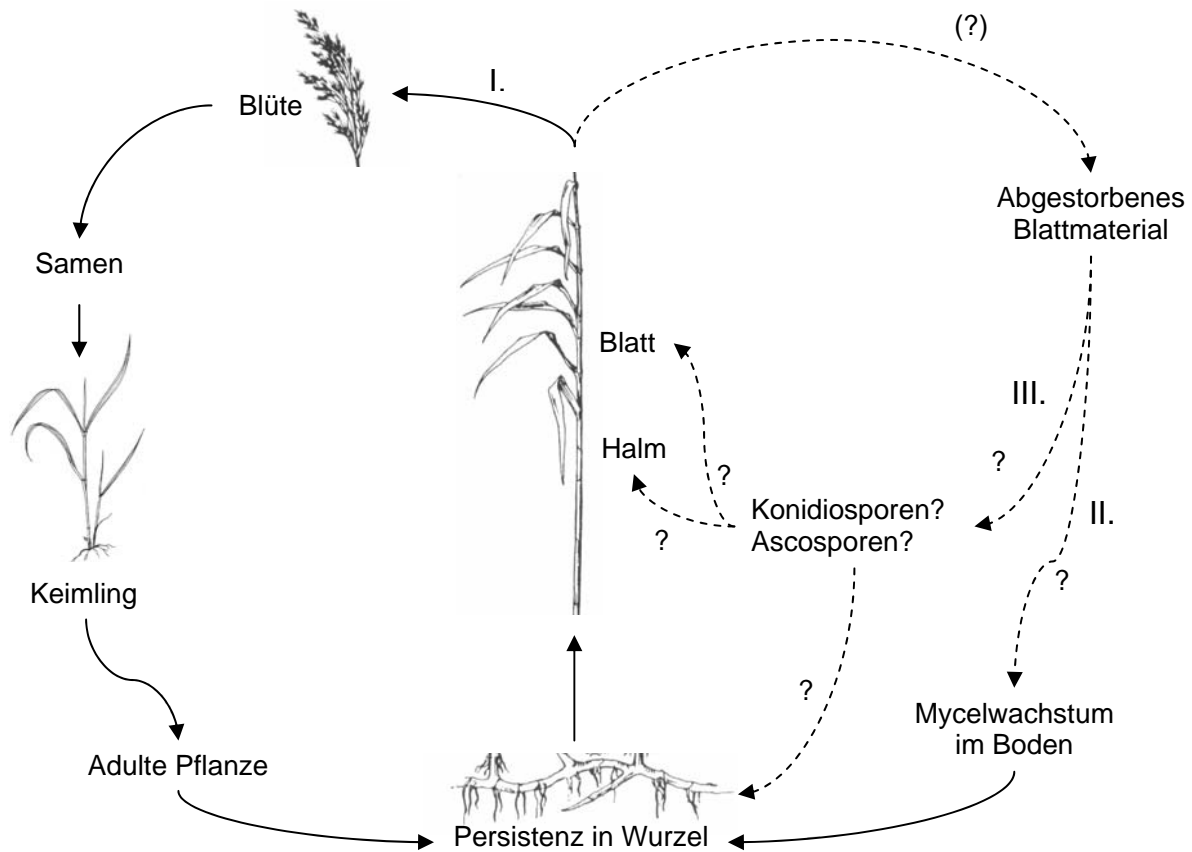


Abbildung 38: Potentieller Lebenszyklus, Verbreitungsmechanismus und Infektionswege von *Stagonospora* sp. 4/99-1 im Schilf. Linker Zyklus (vertikale Übertragung, vegetativer Teil I): Der Pilz persistiert in den Wurzeln adulter Pflanzen, steigt während der Vegetationsperiode in die oberen Teile auf und wächst über die Blüte in die Samen ein. Bei der Samenkeimung wächst der Pilz in den sich entwickelnden Keimling ein und persistiert in der adulten Pflanze. Rechter Zyklus: Vegetativer Teil II: Aus seneszenten abgefallenen Blatt- und Halmteilen wächst Pilzmycel in den Boden ein und infiziert von dort aus die Wurzel. Generativer Teil (III): Paarung, Meiose und Sporulation des Pilzes finden auf abgestorbenen Pflanzenteilen im Winterhalbjahr statt. Durch die Ascosporen bzw. durch asexuell gebildete Konidien werden die Wurzeln und die oberirdischen Teile der Pflanze erneut infiziert. Nicht sicher belegte Verbindungen wurden mit einem Fragezeichen und gestrichelten Pfeilen versehen.

4.1.4 Vertreter der Gattungen *Microdochium* und *Trichoderma* als Endophyten

Vertreter der Gattung *Microdochium* sind als Pathogene unterschiedlicher Bedeutsamkeit an Getreide bekannt (Fitt & Hornby, 1978; Parry et al., 1995; Simpson et al., 2004). Einige Arten (*M. bolleyi*, *M. nivale*) treten an Weizen jedoch auch als symptomlose Wurzelendophyten auf, ferner kommen sie mit geringerer Häufigkeit als endophytische Besiedler oberirdischer Abschnitte der Weizenpflanzen vor (Sieber, 1985; Sieber et al., 1988; Sieber, 2002). Für die Art *Microdochium bolleyi* ist zusätzlich auch die Wirkung als Biokontrollpilz bei Getreide bekannt (Kirk & Deacon, 1987; Douglas & Deacon, 1994).

Arten der Gattung *Trichoderma* sind allgemein als saprophytische bodenbürtige Biokontrollpilze (Kredics et al., 2003) bekannt. Berichte über endophytisches Vorkommen von Vertretern dieser Gattung sind relativ selten. Beispiele sind aus *Eucalyptus*-Schösslingen, sowie aus Nelken bekannt (Bettucci & Saravay, 1993; Carver et al., 1996). Durch die Untersuchungen am Schilf, einschließlich der Reisolierung aus oberflächensterilisierten Wurzeln (siehe Abschnitt 3.3.2.2, Abbildung 23), wurde für beide Gattungen ein zusätzlicher Nachweis für deren endophytisches Auftreten erbracht.

4.2 Vorkommen von Endophyten in natürlichen Habitaten

4.2.1 Vergleich von klassischen und molekularen Nachweismethoden

Bei Untersuchungen beim Schilf am Bodensee wurden, wie zuvor schon in anderen Arbeiten gezeigt, durch kultivierungsabhängige und -unabhängige Nachweisverfahren unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften des natürlichen Habitates erfasst (vgl. Borneman & Hartin, 2000; Viaud et al., 2000; Hunt et al., 2004).

Beim Nachweis von *Stagonospora* spp. durch Isolierung und PCR aus Schilfbeständen am Bodensee wichen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse von jenen einer zuvor an insgesamt 12 Pflanzen durchgeführten Isolierungskampagne vom April/Mai 1997 ab (Wirsel et al., 2001). Während durch nested PCR weite Verbreitung von *Stagonospora* sp. 4/99-1 gezeigt wurde (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1), wurden in der Isolierungskampagne keine *Stagonospora*-Arten nachgewiesen. Für diesen Unterschied sind folgende mögliche Ursachen anzuführen:

In der Isolierungskampagne wurden die vegetativen Pflanzenteile Blatt, Halm und Wurzel, jedoch keine Samen untersucht. Die Beprobung dieser Teile fand im Frühjahr zu einer Jahreszeit statt, in der *Stagonospora* mit PCR in oberirdischen Abschnitten gar nicht oder nur in geringer Häufigkeit nachzuweisen war (Abbildung 10). Das persistente Vorkommen in Wurzeln weist in der PCR eine permanent geringere Häufigkeit im Vergleich zu den Werten oberirdischer Abschnitte im Sommer auf. Diese geringere Besiedlung der Wurzeln senkte ebenfalls die Wahrscheinlichkeit, daraus Isolate zu erhalten. Neben weniger häufigem Vorkommen können das langsame Wachstum als Ursache für Überwachsen durch schneller wachsende Arten, die teilweise geringe Kompetitionsfähigkeit auf dem verwendeten Medium (Malzagar, vgl. Abbildung 35) sowie eventuell auch die fehlende, bzw. geringe Sporulation der *Stagonospora*-Arten die Gründe sein, dass diese nicht entdeckt wurden.

Auch zwischen der Isolierung und dem PCR-Nachweis aus Samen liegen deutliche Differenzen vor. Durch PCR wurde eine deutlich höhere Pilzbesiedlungsquote nachgewiesen. Dieses Ergebnis kann in der verwendeten scharfen Oberflächensterilisation bei der Isolierung des Pilzes aus dem Saatgut begründet sein. Diese bedingt, dass nur Pilze aus tieferen Schichten auswachsen. Ebenso hängt der erfolgreiche Auswuchs des Pilzes von der Vitalität und optimalen Umgebungsbedingungen, wie z.B. der Wahl des Mediums, Temperatur und pH-Wert ab. Dagegen können bei den an nicht oberflächensterilisiertem Material durchgeführten PCR-Tests auch weniger tief eingedrungene und fest an der Pflanzenoberfläche haftende Pilze und Sporen erfasst werden. Bei der PCR ist auch Amplifikation aus toten Zellen prinzipiell möglich (Bridge, 2002). Daher kann eine weitere Ursache für die bei der Untersuchung des *Stagonospora*-Isolates 4/99-1 in Schilfsamen vom überschwemmten Reichenauer Standort von

1998 festgestellte Differenz (vgl. Tabelle 12, Tabelle 16) die Mortalität des Pilzes während der Lagerung des Saatgutes sein (vgl. Abschnitt 4.1.2). Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass für die PCR-Analyse vegetativer Teile Material aus anderen Jahren verwendet wurde, so dass Schwankungen zwischen den Jahren einen zusätzlichen Faktor darstellen können. Ebenso sind auch starke Schwankungen der Pilzbesiedlung einzelner Wirtspflanzen zu berücksichtigen. Diese wurden mit molekularen Methoden bei der Analyse der Pilzdiversität zwischen gleichzeitig untersuchten Schilf-Pflanzen des selben Standortes festgestellt (K. Neubert, persönliche Mitteilung). Diese stellen neben jahreszeitlichen und mehrjährigen Schwankungen einen weiteren Faktor der Variabilität dar.

Die Nachweisgrenze der PCR ist ein weiterer entscheidender Faktor: Mit der PCR wurde eine sehr empfindliche Methode für den Nachweis von Organismen in Umweltproben angewandt. Deren Sensitivität wurde durch eine 2-stufige nested PCR zusätzlich erhöht (Jackson et al., 1991). Die Sensitivität eines PCR-Nachweises hängt von der Kopienzahl der ausgewählten Zielsequenz ab. In Eukaryonten liegen meist mehrere hundert Kopien des rDNA-Genclusters vor (Singer & Berg, 1992). Unter den gegebenen Voraussetzungen von Genomgröße und Kopienzahl (siehe Abschnitt 3.2.1.2) ergibt sich, dass die bei etwa 4 fg *Stagonospora*-DNA liegende Nachweisgrenze deutlich weniger als einem Zellkern entspricht (ca. 1/10 Kern; siehe Abschnitt 3.2.1.2, Abbildung 9).

Am Kartoffelfäuleerreger *Phytophthora infestans* wurde in PCR-Systemen mit ITS-Primern eine Nachweisgrenze von 1 pg ermittelt. Durch die Wahl einer anderen Zielsequenz mit höherer Kopienzahl konnte die Nachweisgrenze bei *Phytophthora* um den Faktor 100 verbessert und mittels nested PCR zusätzlich auf 0,1 fg gesenkt werden (Judelson & Tooley, 2000). In dem bei *Stagonospora* angewandten nested PCR-System wurde somit eine gute Nachweisgrenze erreicht, deren Empfindlichkeit jedoch von anderen Systemen noch übertroffen wird.

Durch Klonierung von PCR-Produkten aus Gewebeproben von drei Schilfpflanzen des Standortes Mainau zur molekularen Untersuchung der Pilzdiversität im Schilf wurde der *Stagonospora*-Typ 4/99-1 nicht nachgewiesen, der Typ 4/99-18 jedoch immerhin mit 2,2% Häufigkeit (Neubert et al., Manuskript eingereicht). Die Schwierigkeiten, *Stagonospora* 4/99-1 mit semi-quantitativen Methoden in einem geringen Stichprobenumfang nachzuweisen, deuten auf eine relativ geringe tatsächlich vorhandene Mycelmasse hin.

Der Typ 4/99-1 konnte dennoch durch eine spezielle Isolierungstechnik aus gesunden, symptomfreien Wurzeln adulter Pflanzen des Standortes Mainau im Juni 2004 isoliert werden (K. Neubert, persönliche Mitteilung). Diese Isolierung erfolgte unter Verwendung sehr kleiner Probengrößen („Salami-Technik“), was zur Vermeidung von Überwachsen durch konkurrierende Pilze diente. Sie bestätigt das durch nested PCR nachgewiesene Vorkommen von *Stagonospora* sp. 4/99-1 in Wurzeln von Pflanzen im Freiland. Gleichzeitig wird dadurch das Vorkommen tatsächlich vitaler *Stagonospora*-Vertreter nicht nur in den Wurzeln junger, sondern auch in jenen adulter Pflanzen bestätigt.

Insgesamt lässt sich aus den Daten der molekularen Methoden nested PCR bzw. Klonierung von PCR-Produkten und der Isolierung eine weite Verbreitung von *Stagonospora* sp. 4/99-1 bei relativ geringer Mycelkonzentration unterstellen.

Bei der Untersuchung der *Microdochium*-Arten wurden ebenfalls Differenzen zwischen den Nachweisverfahren ermittelt. Für die beiden untersuchten *Microdochium*-Arten wurde durch Isolierung eine Bevorzugung überschwemmter Habitats bei der Besiedlung unterirdischer Pflanzenteile (Wurzeln) festgestellt (Wirsel et al., 2001). Die Überprüfung dieses Ergebnisses durch die kultivierungsunabhängige PCR-Technik ergab ein differenziertes und zum Teil gegensätzliches Bild (siehe Abschnitte 3.2.2.2.1 und 3.2.2.2.3). Für diesen Vergleich wurden die durch Wirsel et al. (2001) festgestellten Häufigkeiten der verschiedenen Isolatgruppen gemäß ihrer Sequenztypen zusammengefasst.

Für *Microdochium* sp. Sequenztyp 5/97-16-like wurde das Ergebnis der Isolierungskampagne mit einem Häufigkeitsverhältnis von 10:1 Isolaten für Wurzeln von überschwemmten Habitats im Vergleich zu trockenen Habitats durch den kultivierungsunabhängigen Nachweis tendenziell bestätigt. Hierbei betrug das Verhältnis detektierter PCR-Signale 2,6:1. Für *Microdochium bolleyi* ergab die Isolierung ein Häufigkeitsverhältnis von 3:1 Isolaten für Wurzeln von überschwemmten Habitats im Vergleich zu trockenen Habitats. Dieses Ergebnis konnte durch die kultivierungsunabhängige PCR-Technik nicht bestätigt werden. Hier betrug das Verhältnis 1:3,1. Es zeigt somit eine nicht erwartete bevorzugte Besiedlung von Wurzeln in trockenen Habitats an. Die Bevorzugung der Wurzeln gegenüber den oberirdischen Pflanzenteilen konnte dagegen für beide Arten bestätigt werden. Der hier vorliegende scheinbare Widerspruch kann ebenfalls in den bereits oben angeführten Unterschieden der Analysetechniken begründet sein.

Microdochium-Vertreter konnten bei der Untersuchung der Pilzdiversität durch Klonierung von PCR-Produkten aus Gewebeproben von drei Schilfpflanzen des Standortes Mainau nicht nachgewiesen werden (K. Neubert, persönliche Mitteilung). Aus den nested PCR-Ergebnissen können dagegen beide *Microdochium*-Typen als am Bodensee weit verbreitet angesehen werden. In der Isolierungskampagne waren sie ebenfalls häufig, was an einer besonders guten Isolierbarkeit liegen könnte. Die angewandte nested PCR-Methode ist sehr sensitiv. Die PCR-Detektionshäufigkeit erlaubt jedoch keine quantitative Schlussfolgerung, da auch sehr geringe Pilzmengen in der Pflanze erfasst werden. Die erhaltenen Ergebnisse lassen daher – wie bei *Stagonospora* – insgesamt vermuten, dass für diese Pilze trotz des verbreiteten Nachweises möglicherweise ebenfalls eine relativ geringe tatsächlich vorhandene Mycelkonzentration bzw. Mycelmasse anzunehmen ist.

4.2.2 Bevorzugung bestimmter Habitats durch Endophyten

Für *Stagonospora* wurde eine Bevorzugung des Reichenauer Standortes gegenüber Mainau festgestellt. Dabei wurde deutlich, dass dieser Unterschied aus den Differenzen zwischen den überschwemmten Habitats beider Standorte resultiert (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1). Hierbei zeigte *Stagonospora* eine Bevorzugung für Pflanzen des etwas gesünderen überschwemmt stehenden Bestandes im Vergleich zu dem stark geschädigten am Mainauer Standort und den gesunden trocken stehenden Habitats beider Standorte.

Für die beiden *Microdochium*-Typen nahm das Habitat Mainau-überschwemmt ebenfalls Extremwerte ein: Klade I (*M. sp. 5/97-16-like*) wies auf diesem Standort die höchste Detektions-

häufigkeit auf, während es sich für Klade II (*M. bolleyi*) um den Standort mit dessen geringster Detektionshäufigkeit handelte (siehe Abschnitt 3.2.2.2.1 und Tabelle 17). Somit zeigte die eine *Microdochium*-Art bevorzugtes Auftreten in dem nach dem Hochwasser von 1999 als stark geschädigt klassifizierten Schilfbestand, während die andere diesen möglicherweise mied, da sie in gesünderen Beständen häufiger und gleichmäßiger auftrat.

Bei Schilfbeständen in Ungarn wurde eine Abhängigkeit des Befalls mit pathogenen Pilzen von der gegebenen Qualität der Schilfbestände festgestellt (Bán et al., 2000). Für eine obligat biotrophe Art (*Puccinia phragmitis*) wurde dabei ein verstärkter Befall in qualitativ besseren Beständen beobachtet. Dies wurde durch die für den Pilz günstigere Nahrungsverfügbarkeit erklärt.

Ob die beobachteten Differenzen der Besiedlungshäufigkeit am Bodensee Folge der an beiden überschwemmten Standorten unterschiedlichen vorliegenden Schädigungsgrade der Schilfbestände (siehe Abschnitt 2.1.1) oder eine Ursache dafür sind (z.B. durch selteneres Vorkommen eines positiv wirkenden Pilzes), oder ob ganz andere Faktoren als Ursache vorliegen, kann hier nicht geklärt werden.

Außer den Standortbevorzugen wurden noch weitere Präferenzen festgestellt:

Vertreter der Gattung *Microdochium* zeigten im Gegensatz zu *Stagonospora* (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1) eine Bevorzugung bestimmter Habitatstypen (siehe Abschnitte 3.2.2.2.3 und 4.2.1). Hierbei bevorzugte die PCR-Klade I signifikant die Schilf-Wurzeln überschwemmter Habitate, während für die restlichen Pflanzenteile ein solcher Unterschied zwischen überschwemmtem und trockenem Habitat nicht vorliegt. PCR-Klade II zeigte im Gegensatz dazu eine signifikante Bevorzugung von Wurzeln in trockenen Habitaten. Für die übrigen Pflanzenteile lag hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Habitatstypen vor. Beide zeigten somit eine gegensätzliche Habitatsbevorzugung, die auf der Besiedlung der Wurzeln basiert. Diese bevorzugte Besetzung verschiedener, räumlich getrennter Nischen ist hier aber nicht als gegenseitige Vermeidung beider Arten infolge eines direkten Antagonismus zwischen Vertretern beider PCR-Kladen zu deuten, da ein gemeinsames Vorkommen beider Pilze in der gleichen Probe statistisch signifikant begünstigt ist (positive Korrelation, siehe Abschnitte 3.2.2.2.4 und 4.4.1).

Für die festgestellte gegensätzliche Bevorzugung sind zunächst mehrere mögliche Gründe anzuführen. Denkbar sind unterschiedliche Substratnutzung bzw. -verfügbarkeit, der Vitalitätszustand der Pflanzen, andere vorherrschende Temperaturen in den Habitaten sowie die potentielle Empfindlichkeit mancher Pilze gegen anoxische Bedingungen.

Für Schilfpflanzen wurde eine Abhängigkeit des Aminosäure- bzw. Kohlenhydratgehaltes vom Habitat gezeigt (Koppitz, 2004). Basalinternodien von Pflanzen aus gefluteten Habitaten wiesen dabei einen höheren gesamten Aminosäuregehalt und einen verminderten gesamten Kohlenhydratgehalt im Vergleich zu Pflanzen aus trockenen Habitaten auf. Ebenso variieren Inhaltsstoffe zwischen gesunden und durch Hochwasser geschädigten Schilfpflanzen (Koppitz, 2004; Koppitz et al., 2004).

Bei gemeinsam in der gleichen Schilfpflanze endophytisch vorkommenden Vertretern der Gattung *Cladosporium* wurden Unterschiede im Kohlenstoff-Katabolit-Spektrum als trennender Faktor gezeigt; d.h. das Vorkommen war sympatrisch (Wirsel et al., 2002). Daher war für

die *Microdochium*-Arten zu prüfen, ob ebenfalls Unterschiede im Substratnutzungsmuster im Zusammenhang mit habitats- und vitalitätsabhängigem Nährstoffgehalt der Wirtspflanze als trennender Faktor in Frage kamen.

Für die *Microdochium*-Arten scheint dem Substratnutzungsmuster jedoch keine entscheidende Bedeutung zuzukommen. Zwischen den am Bodensee vorkommenden *Microdochium*-Arten wurden teilweise Unterschiede bei der Fähigkeit zur Nutzung von Aminosäuren bzw. Kohlenhydraten festgestellt (K. Neubert, pers. Mitteilung). Beide Typen wuchsen gleich gut auf der Aminosäure Asparagin, die in Schilfpflanzen von überfluteten Standorten in höherer Konzentration als auf trockenen Standorten vorkommt (Koppitz, 2004). Auch für Gamma-Aminobuttersäure, die in durch Hochwasser extrem geschädigtem Schilf im Vergleich zu gesünderen Pflanzen stark erhöht vorkommt (Koppitz, 2004; Koppitz et al., 2004), zeigten die beiden Haupttypen keine wesentlichen Unterschiede. Die Durchschnittswerte für die Substrate schwankten teilweise innerhalb einer PCR-Klade stärker als zwischen den beiden Kladen. Lediglich bei wenigen Substanzen (Phenylethylamin, Malonsäure, Lactulose, D-Melibiose, D-Raffinose) liegen statistisch signifikante Unterschiede vor (K. Neubert, pers. Mitteilung). Dies zeigt trotz der überwiegend einheitlichen Substratnutzungsmuster auf, dass dennoch physiologische Unterschiede zwischen beiden Arten bestehen. Für die Bedeutung dieser Substanzen im Schilf, bzw. deren Konzentrationen in Abhängigkeit der Umweltbedingungen konnten in der Literatur keine Daten ausfindig gemacht werden.

Die aus der Bevorzugung gegensätzlicher Habitate resultierende Besetzung unterschiedlicher Nischen zeigt eine auffällige Korrelation zum Temperaturoptimum der beiden *Microdochium*-Arten (siehe Abschnitt 3.6.1.2 und Abbildung 32). Hierbei zeigt die PCR-Klade mit Vertretern mit dem niedrigeren Temperaturoptimum (Klade I) eine Bevorzugung überschwemmter Habitate und jene mit dem höheren Optimum (Klade II) eine Bevorzugung trocken liegender Bereiche des Schilfgürtels. Vorläufige Temperaturmessungen im Uferbereich des Standortes Mainau im Bodensee während der Vegetationsperiode haben ergeben, dass die Temperaturen des überschwemmten Gewässersediments und der trockenliegenden Uferböschung im Bereich der untersuchten Wurzeltiefe des Schilfes (ca. 20 cm tief) nicht wesentlich voneinander verschieden sind (K. Neubert & Dr. Jan Nechwatal, Konstanz, unveröffentlichte Daten). Sie sind im Gewässersediment aber tendenziell etwas höher als im trocken liegenden Bereich. Des Weiteren liegen die Werte in einem Bereich, der die Arten kaum voneinander trennen kann (20-23°C im Juni/Juli). Daher scheidet die Bodentemperatur als Ursache der beobachteten Habitatsbevorzugung offenbar aus. Zusätzlich ist ein Bezug zum Bodenfeuchtegehalt nicht auszuschließen. In diesem Zusammenhang wäre ein Vergleich zwischen heißen und kühleren Sommern interessant. Aus dem vorhandenen Datensatz ist jedoch infolge zu geringen Probenumfanges mancher Jahre und ungeeigneter Vergleichsjahre kein statistisch sinnvoller Vergleich möglich.

Beide Kladen zeigten in den warmen Sommermonaten eine deutlich geringere Detektionshäufigkeit, als während der kühleren Monate im Frühjahr und Spätherbst (Abschnitt 3.2.2.2.2, Abbildung 15). Damit zeigten sie ein ähnliches saisonales Verhalten, trotz der gleichzeitig bestehenden Unterschiede bei Temperaturoptimum und Habitatsbevorzugung. Die Abnahme der Detektionshäufigkeit ist jedoch bei der temperaturempfindlicheren Klade I etwas ausgeprägter als bei Klade II, was mit den jeweiligen Temperaturoptima erklärt werden kann.

Dass bei der Besiedlung der oberirdischen Pflanzenteile für keinen der beiden Pilze eine Habitatsbevorzugung erkennbar war, könnte darin begründet sein, dass diese in beiden Habitattypen ähnlichen äußeren Bedingungen unterworfen sind. Da Isolate der jeweils gleichen Art trotz Herkunft aus verschiedenen Habitattypen übereinstimmende Temperaturoptima und -sensitivität aufwiesen, scheint dies genetisch und nicht durch die Umwelt bedingt zu sein.

Ein weiterer, die Habitate unterscheidender Faktor ist die Sauerstofflimitierung in den Sedimenten überfluteter Standorte. Für die Klade II (Typ *M. bolleyi*-like) wurde durch PCR eine Vermeidung überfluteter Habitate bzw. damit einhergehend die Bevorzugung trockener, gut durchlüfteter Böden festgestellt. Daraus könnte unterstellt werden, dass die Vertreter dieser Gruppe eine verminderte Fähigkeit zum Wachstum oder Überleben unter sauerstofflimitierten Bedingungen aufweisen. Tatsächlich ist *M. bolleyi* strikt aerob (Damm et al., 2003), was aber auch für die Vertreter des Typs *M. sp. 5/97-16*-like gilt (U. Damm, pers. Mitteilung). Außerdem scheint dies nicht der entscheidende Faktor zu sein, da durch Damm et al. (2003) die Fähigkeit von *M. bolleyi* zur Konidienkeimung an der oxisch-anoxischen Grenzfläche nahe der Schilfwurzel und die Infektion submerser Wurzeln gezeigt wurde. Ermöglicht wird dies durch den Sauerstoffgradienten, der infolge von Verlusten aus der Wurzel im anoxischen Milieu entsteht (vgl. Abschnitt 1.1.3). Ob Unterschiede zwischen beiden Kladen hinsichtlich der mikro-oxischen Infektionsfähigkeit vorliegen oder diese sich im Sauerstoffbedarf unterscheiden, ist nicht bekannt.

Insgesamt ist zu folgern, dass die festgestellte Tendenz der räumlichen Trennung beider Arten offenbar nicht Folge eines direkten Antagonismus, unterschiedlicher Substratnutzung oder -verfügbarkeit und der in den Habitaten herrschenden Bodentemperaturen ist. Unterschiede in der Empfindlichkeit der Pilze gegenüber anoxischen Bedingungen konnten ebenfalls nicht als Ursache nachgewiesen werden. Damit konnte bisher die Ursache der unterschiedlichen Habitatsbevorzugung nicht aufgeklärt werden. Es bleibt offen, welche weiteren Faktoren Ursache für das beobachtete Verhalten sind. Denkbar sind die hier nicht untersuchte Anwesenheit konkurrierender Pilze, die Bevorzugung für den einen oder anderen Habitattyp zeigen; bisher nicht erkannte habitatsabhängige Abweichungen der pflanzlichen Inhaltsstoffverteilung und Unterschiede in der Vitalität der Wirtspflanzenbestände.

Durch Isolierung (Wirsel et al., 2001) wurde auch für *Trichoderma* sp. endophytisches Vorkommen in Schilf mit einer fast ausschließlichen Bevorzugung von Schilfwurzeln in trocken liegenden Uferzonen festgestellt. Das durch die PCR erhaltene Ergebnis widerspiegelt und bestätigt somit den kultivierungsabhängigen Nachweis durch Isolierung (siehe Abschnitt 3.2.3).

Vergleichbare Habitatsbevorzugungen von *Microdochium*- bzw. *Trichoderma*-Arten konnten in der Literatur nicht aufgefunden werden. Für *Microdochium nivale*-Varietäten wurde jedoch bei Wettbewerbsversuchen eine temperaturabhängige unterschiedliche Wirtspräferenz zwischen Weizen- und Roggenpflanzen festgestellt (Simpson et al., 2004). Dies belegt variables Verhalten von eng verwandten Arten dieser Gattung in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen. Phänomene, die der Habitatsbevorzugung durch Schilfendophyten vergleichbar sind, wurden z.B. von pathogenen *Armillaria*-Arten (Hallimasch) bekannt (Blodgett & Wor-

rall, 1992). Hier zeigte eine der Arten unabhängig von der Wirtsverfügbarkeit bzw. -art Präferenz für trockene Standorte.

4.3 Einfluss von Endophyten auf die Pflanze

4.3.1 Eigenschaften von Mikrokosmen

Eine Pflanze kann gleichzeitig durch mehrere mutualistische und/oder pathogene Pilzarten besiedelt werden, zwischen denen antagonistische und/oder synergistische Wechselwirkungen bestehen können. Daher war ein Ausschluss weiterer Pilze zur störungsfreien Untersuchung der Interaktion von zwei Organismen bzw. der Auswirkungen ihrer Interaktion nötig. Infolge der Verwendung von axenischen Wirtspflanzen, autoklavierter Erde und sterilen Wachstumsbedingungen konnten auch das Ergebnis möglicherweise beeinflussende weitere Organismen wie Herbivoren, Insekten und Nematoden ausgeschlossen werden. Die angewandte Mikrokosmen-Methodik simulierte eine Situation mit Besiedlung der Pflanze durch Pilze vom Boden aus. Es konnte durch dieses Inokulationssystem gezeigt werden, dass der Pilz vom entfernten Inokulumspunkt zur Pflanze wuchs und diese besiedelt hat. Da eine künstliche Verletzung der Pflanze zum Zweck der erleichterten Besiedlung vermieden wurde und stattdessen der Pilz aktiv auf die Pflanze zuwachsen musste, darf das gewählte Inokulationssystem als sehr naturnah betrachtet werden.

Die aus den axenischen Mikrokosmen erhaltenen Ergebnisse haben jedoch nur eine begrenzte Vergleichbarkeit mit der Situation im Freiland. Die in dieser Arbeit vorgestellten Mikrokosmen wurden bei einer Lichtintensität von $55\text{-}60 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$ kultiviert. Dieser Wert kennzeichnet Schwachlicht, ist jedoch mit den experimentellen Bedingungen einiger anderer Mikrokosmen mit Gras-/Mikroorganismen-Interaktionen vergleichbar. In diesen wurden Lichtintensitäten von 86, 110, 318 bis zu $450 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$ eingesetzt (Cheplick et al., 1989; Meharg & Killham, 1995; Malinowski et al., 1997b; Newsham, 1999). Im Freiland liegt dagegen mit $500\text{-}1000 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$ eine höhere Lichtintensität vor, unter der die Photosysteme der Pflanze und somit die Produktivität anderen Bedingungen unterliegen. Weitere Unterschiede sind im Freiland im Jahresverlauf wechselnde Tag-Nacht-Längen, Temperaturschwankungen im Tages-, Wochen- und Monatsverlauf sowie die größere Substratmenge und die standortabhängige Variation von deren Qualität. Im Freiland besteht außerdem eine Konkurrenz vieler Pilz- und Bakterienarten an, bzw. in der gleichen Pflanze. Dadurch können die durch einen Interaktionspartner bedingten Auswirkungen, z.B. eine Förderung der Biomasseproduktion, durch direkte Wechselwirkungen mit anderen Mikroorganismen bzw. durch Überlagerung gegenteiliger Effekte kompensiert werden (vgl. Abschnitt 4.4.2).

4.3.2 Wuchseffekte durch symbiontische Pilze

Mit Ausnahme der Gattung *Neotyphodium* (siehe Abschnitt 1.3.5) und ihrer Verwandten ist relativ wenig über die funktionellen Beiträge samenbürtiger Endophyten bekannt. Über eventuelle positive Wirkungen der samenbürtigen *Stagonospora*-Art und anderer Endophyten in Weizen ist nichts bekannt (Sieber et al., 1988).

Neben den Beobachtungen an *Neotyphodium*-/Gras-Interaktionen wurde bei *Casuarina equisetifolia* und bei *Helianthemum chamaecistus* (Zwerg-Heideröschen) das Vorkommen samenbürtiger Pilze beobachtet. Bei beiden Systemen wurde eine durch die Anwesenheit des Pilzes gesteigerte Vitalität der Keimlinge festgestellt (Bose, 1947; Bournsnel, 1950).

Durch Inokulation axenischer Schilf-Pflanzen mit *Stagonospora* und den Nachweis der Etablierung einer engen Assoziation durch Reisolierung und Mikroskopie konnte in der vorliegenden Arbeit ein eindeutiger Bezug zwischen der Anwesenheit des Pilzes und einer physiologischen Antwort des Wirtes dargestellt werden.

Dieser weitere Nachweis für die Existenz mutualistischer samenbürtiger Endophyten lässt vermuten, dass diese eine größere ökologische Bedeutung haben als bisher allgemein angenommen.

Durch symbiontische endophytische Pilze bedingte Wuchssteigerungen sind z.T. sehr variabel. Die Effekte sind oft nicht nur spezifisch für die Wirtsart (siehe Abschnitt 1.3.5), sondern können auch von den Kulturbedingungen wie z.B. Temperatur und Nährstoffgehalt, bzw. der leichten oder schwereren Aufschließbarkeit vorhandener Nährstoffe abhängig sein (Marks & Clay, 1996; Malinowski & Belesky, 1999; Sieber, 2002). Des Weiteren kann auch der Genotyp der Wirtspflanze innerhalb der gleichen Art einen Einfluss auf die Auswirkung der Interaktion haben (Marks & Clay, 1996; Malinowski & Belesky, 1999; Malinowski et al., 2000; Cheplick & Cho, 2003).

Verschiedentlich finden sich Hinweise auf für die Pflanze zusätzlich auftretende metabolische Kosten durch eigentlich symbiontisch-wuchsfördernde Pilze. Diese verborgenen Kosten fallen prinzipiell immer an, u.a. dadurch, dass der Pilz im Inneren der Pflanze von deren Photosynthese lebt (Faeth & Sullivan, 2003). Unter Nährstoffbegrenzung können sie bedeutsam werden (Cheplick et al., 1989; Malinowski & Belesky, 1999). Sie äußern sich dann in einer geringeren Biomasseproduktion Endophyten-infizierter Pflanzen. Dieses Phänomen kann infolge der Konkurrenz zwischen Pilz und Pflanze um die wenigen verfügbaren Nährstoffe oder Photosynthate (Cheplick et al., 1989) oder auch durch erhöhten Energieverbrauch infolge pflanzlicher Abwehrreaktion (Sieber et al., 1988) auftreten. Für bisher generell als mutualistisch angesehene asexuelle Endophyten wird aus den genannten Beobachtungen unterstellt, dass diese zumindest unter bestimmten Umständen parasitische Wechselwirkungen mit ihren Wirten haben können (Faeth, 2002; Faeth & Sullivan, 2003). Auch für Mykorrhiza-Pilze wurde ein solches Kontinuum zwischen mutualistisch und parasitisch in Abhängigkeit der Umweltbedingungen festgestellt (Johnson et al., 1997).

Bei *Stagonospora* und *Microdochium* sind in dieser Arbeit diese zusätzlichen Kosten infolge der Überlagerung durch die deutliche Wuchsförderung verborgen geblieben. Es kann aber aufgrund der aus der Literatur bekannten Phänomene nicht pauschal davon ausgegangen werden, dass die positiven Effekte der in dieser Arbeit untersuchten Pilze auch unter allen anderen möglichen Umweltbedingungen bestehen bleiben.

4.3.3 Mögliche Ursachen der durch Endophyten ausgelösten Wuchseffekte

Die Ursachen der bei Endophyten beobachteten wuchsfördernden Wirkung auf die Wirtspflanze können vielfältig sein. Mögliche Ursachen sind die Bildung von Hormonen, eine eventuell von weiteren Sekundärstoffen ausgelöste allgemeine Anregung der Pflanze, Übernahme einer Mykorrhiza-ähnlichen Funktion durch den Pilz und auch die Bildung bzw. der Transport von Vitaminen durch den Pilz zur Pflanze.

In einigen Fällen wurden von Pilzen produzierte Phytohormone, wie Auxine, Cytokinine, bzw. Gibberelline für die pflanzenwuchsfördernde Wirkung verantwortlich gemacht (Newsham, 1999; Tudzynski & Sharon, 2002). Bei dem Wurzelendophyten *Piriformospora indica* liegt eine Wuchsförderung durch auch in Flüssigkulturen gebildete Sekundärstoffe vor, die auf verschiedene Pflanzenarten wirken (Varma et al., 1999). Für eine *Phaeosphaeria*-Art (*P. sp.* L487) wurde Gibberellin-Produktion nachgewiesen (Kawaide et al., 1995; Kenmoku et al., 2001; Tudzynski & Sharon, 2002), was belegt, dass Vertreter dieser, das Teleomorph zu *Stagonospora* darstellenden Gattung prinzipiell als Hormonproduzenten in Frage kommen können.

Tests der Flüssigkultur-Überständen von *Stagonospora*-Arten auf Gibberellin-Gehalte zeigten nur bei einem *Stagonospora*-Isolat (4/99-18) einen schwachen Effekt auf junge Reispflanzen (siehe Abbildung 28), der auf schwache Gibberellin-Produktion schließen lässt. Der Flüssigkultur-Extrakt aus 4/99-1, welcher in Schilf-Mikrokosmen ebenfalls eine Wuchssteigerung hervorrief, zeigte bei Reis keine Wirkung (siehe Abschnitt 3.4). Flüssigkultur-Extrakte des Hormonproduktion zeigenden Isolates 4/99-18 ergaben in Abhängigkeit der verwendeten Medien unterschiedliche Wirkung, d.h. in einem Medium erfolgte keine Hormonproduktion, im anderen eine schwache Produktion.

Es sollte daran erinnert werden, dass das verwendete Testsystem nur den Nachweis von Gibberellinsäure, jedoch nicht von anderen Hormonen wie Cytokinin erlaubt. Wäre Hormonproduktion die wesentliche Ursache für die beim Schilf beobachtete Wuchssteigerung, so wäre die Produktion von Cytokinin als wahrscheinlicher anzunehmen als Gibberellinproduktion (B. Tudzynski, Westfälische Wilhelmsuniversität Münster, pers. Mitteilung).

Neben dem eingeschränkten Nachweisbereich des verwendeten Testsystems besteht die Möglichkeit, dass *Stagonospora* nur wenig Gibberellin bzw. auf den verwendeten Medien überhaupt keine Hormone produziert. Auf eine solche Variabilität weisen auch die oben beschriebenen Befunde des Isolates 4/99-18 hin. Für die oben erwähnte Art *Phaeosphaeria sp.* L487 wurde Gibberellin-Produktion in Flüssigkulturen nachgewiesen (Kawaide et al., 1995; Kenmoku et al., 2001), was eine prinzipielle Hormonproduktion dieser Gattung auch *in vitro* belegt. Da durch Endophyten bedingte Wuchseffekte oft als genotyp- bzw. wirtsartabhängig beschrieben wurden (siehe Abschnitte 1.3.5 und 4.3.2), ist es dennoch nicht auszuschließen, dass eine signifikante Hormonproduktion in manchen Fällen nur im Kontakt mit einer Wirtspflanze erfolgt. Bisher ist nicht bekannt, ob die in dieser Arbeit verwendeten *Stagonospora*-Arten Gene für die Gibberellinsynthese haben oder nicht. Infolge der verschiedenen in Frage kommenden Hormongruppen und einer umgebungsabhängigen Hormonproduktion durch den Pilz kann auf Basis des bisher erhaltenen Ergebnisses keine definitive Aussage getroffen wer-

den, ob Hormone für den durch *Stagonospora* bedingten Wuchseffekt ursächlich sind oder nicht.

Eine weitere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Möglichkeit ist der Transport bzw. die Produktion von Vitaminen durch den Pilz. Vitaminproduktion durch Pilze ist bekannt und wird auch industriell genutzt (Stahman, 2002). Diese Möglichkeiten wurden bereits bei früheren Arbeiten über die Wirkung samenbürtiger Pilze als wuchsfördernd in Betracht gezogen (Bose, 1947; Bournell, 1950). Aktuelle Angaben zur Produktion von Vitaminen durch endophytische Pilze oder dadurch ausgelöste Vitalitätssteigerung des Wirtes konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Daher sind diese Vermutungen mit Vorsicht zu betrachten und wahrscheinlich nicht Ursache des beim Schilf beobachteten Effektes.

Eine Mykorrhiza-ähnliche Funktion ist bei Endophyten, insbesondere bei wurzelbesiedelnden Arten wie den DSE, als direkter Wirkmechanismus für die Wachsförderung der Wirtspflanze ebenfalls in Betracht zu ziehen (Bose, 1947; Jumpponen & Trappe, 1998; Newsham, 1999; Jumpponen, 2001). Für *Piriformospora indica* wurde neben der oben erwähnten Produktion von Sekundärstoffen ebenfalls eine solche Mykorrhiza-ähnliche Funktion als Ursache der beobachteten Wachsförderungen der Wirtspflanzen ermittelt (Singh et al., 2003). Bei einer derartigen Funktion führt der Pilz über in das umliegende Substrat einwachsende Hyphen der Pflanze Nährstoffe zu. Diese erhöhte Nährstoffaufnahme könnte auch mit der Mobilisierung schwer aufschließbarer mineralischer und organischer Komplexe durch den Pilz einhergehen, wie es bei Mykorrhiza bereits gezeigt wurde (Hodge et al., 2001; Landeweert et al., 2001).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mikrokosmos-System lag eine Substrat-Limitierung vor, da durch die Düngung von nicht-inokulierten Kontrollpflanzen eine Wachstumssteigerung erzielt wurde. Dieser Effekt gibt einen Hinweis auf eine Mykorrhiza-ähnliche Funktion der Schilf-assoziierten Pilze, welche hier als Wirkmechanismus zugrunde liegen könnte. Auch die ausgeprägte Besiedlung der Wurzeln durch *Stagonospora* legt dies nahe (vgl. Abbildung 11; Abbildung 20).

Trifft diese Folgerung zu, so ist es möglich, dass für den beschriebenen Wuchseffekt eine Abhängigkeit vom Boden-Substrat vorliegen kann. Bei leicht aufschließbaren bzw. gut löslichen und im Überschuss vorhandenen Mineralien bringen Mykorrhizapilze häufig keinen Vorteil mehr (Johnson et al., 1997); bei sehr starker Nährstofflimitierung wiederum kann durch die metabolischen Kosten, die Endophyten verursachen, der Wuchsertrag der Pflanze gemindert werden (siehe Abschnitt 4.3.2).

Neben der hormonell bedingten Wachsförderung und dem direkten Mechanismus einer mykorrhizaähnlichen Funktion gibt es bei Endophyten noch einen weiteren Wirkmechanismus: Durch blattbesiedelnde Endophyten der Gattung *Neotyphodium* konnte eine verstärkte Mineralstoffaufnahme im Vergleich zu nicht-infizierten Pflanzen festgestellt werden (Malinowski & Belesky, 1999; Malinowski et al., 2000). Hierbei genügt die Endophytenaktivität in den oberirdischen Pflanzenteilen, um eine Veränderung von Stoffwechselaktivität, Exsudation und Morphologie im Wurzelbereich auszulösen (Sieber, 2002). Ein Hinweis auf diesen Mechanismus wurde in dieser Arbeit nicht gefunden, da *Stagonospora* v.a. die Wurzeln besiedelte. Insgesamt ist aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eine mykorrhizaähnliche Funktion von *Stagonospora* als wahrscheinlichste Ursache des beobachteten Wuchseffektes anzunehmen.

4.4 Gegenseitige Beeinflussung endophytischer Pilze

4.4.1 Gemeinsames Auftreten verschiedener Arten

Im allgemeinen wird eine Pflanze nicht nur durch eine Endophytenart besiedelt, die alle anderen Pilze ausschließt. Mehrere Arten einschließlich pathogener Pilze können gleichzeitig auftreten. Samenbürtige Gras-Endophyten kommen oft in mehreren eigenständigen Genotypen in der gleichen Wirtsart vor (Scharndl et al., 2004). Bei *Epichloë/Neotyphodium*-Arten wurde ein co-symbiontisches Auftreten zusammen mit p-Endophyten nachgewiesen, die ebenfalls samenbürtig übertragen werden (An et al., 1993; Siegel et al., 1995). Die verschiedenen Pilzarten kommen dabei auch zusammen im selben Samen vor. Ob die im Bodensee-Schilf vorkommenden drei verschiedenen samenbürtigen *Stagonospora*-Arten auch gemeinsam in der gleichen Pflanze auftreten, bzw. im gleichen Samen übertragen werden können, kann aufgrund der vorhandenen Daten nicht beurteilt werden. Dies begründet sich darin, dass die Isolate jeweils von separaten Samen und mehreren Blüten stammten, sowie in der Tatsache, dass für die Sequenztypen 4/99-5 und 4/99-18 kultivierungsunabhängige Daten für Samen gänzlich fehlen. Auch für vegetative Pflanzenteile (vgl. Abschnitt 4.2.1) liegen nur sehr wenige Daten vor.

An Schilf wurde eine hohe Endophytendiversität beobachtet (Wirsel et al., 2001). Eine mögliche Ursache für diese Vielfalt ist die Vermeidung von Konkurrenz durch Nutzung verschiedener Substrate, d.h. pflanzlicher Metabolite oder auch zeit-räumlicher Nischen innerhalb der Wirtspflanze. Die aus dem gleichen Probenmaterial durchgeführten nested PCR-Tests ermöglichen eine Analyse des gemeinsamen Vorkommens verschiedener Pilzarten:

Bei der Betrachtung der Wechselwirkung zwischen den beiden untersuchten *Microdochium*-Kladen wurde trotz deren gegensätzlicher Habitatspräferenz (siehe Abschnitte 3.2.2.2.3 und 4.2.2) für das gemeinsame Vorkommen in der gleichen Probe eine statistisch signifikante Begünstigung (positive Korrelation) festgestellt (siehe Abschnitt 3.2.2.2.4). Die Ursache hierfür könnte möglicherweise ein Schilfgenotyp sein, der von *Microdochium*-Arten generell bevorzugt oder leichter infiziert wird.

Das gemeinsame Vorkommen von *Stagonospora* 4/99-1 mit beiden *Microdochium*-Arten lag im Schilf von Bodenseestandorten in der Gesamtheit aller Pflanzenteile jeweils unter dem theoretischen Erwartungswert einer Zufallsverteilung (siehe Abschnitt 3.2.2.2.5). Hierdurch wird eine Tendenz der gegenseitigen Vermeidung beider Arten angezeigt. Diese schwach negative Korrelation für das gemeinsame Vorkommen ist jedoch nicht statistisch signifikant. Die Ergebnisse der *in vitro* Konkurrenztests (siehe Abschnitt 3.6.2) zeigen an, dass im Schilf eine – zur Zeit nicht klarer herausstellbare – gegenseitige Vermeidung infolge der leichten Dominanz von *Stagonospora* 4/99-1 vorliegen könnte (siehe auch Abschnitt 4.4.2).

Für die verwandte Art *Stagonospora nodorum* wurde an Winterweizen auf Basis der Isolierung aus den Pflanzen eine deutliche negative Korrelation des gemeinsamen Auftretens mit *Microdochium bolleyi* beschrieben (Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest; Sieber, 1985; Sieber, 2002). Hierbei war das gemeinsame Vorkommen in Wurzeln nur etwa halb so häufig, wie aus einer Zufallsverteilung zu erwarten gewesen wäre; d.h. die Arten scheinen sich gegenseitig zu vermeiden. Diese negative Beziehung wurde außer für die Wurzeln auch für oberirdische

Pflanzenteile (Halme) gezeigt. Im weiteren wurde eine zeitliche Sukzession der Besiedlung festgestellt. *Stagonospora nodorum* dominierte bei der Weizenentwicklung in den Wurzeln die frühen Sukzessionsstadien, *Microdochium bolleyi* dagegen die späten Stadien. Unklar blieb bei diesen Untersuchungen, ob ein echter Antagonismus vorlag oder lediglich eine vom Sukzessionsstadium abhängige Dominanz (Sieber, 2002). In einer weiteren Arbeit an Weizen wurde – ebenfalls nach Isolierung – in 3,1% aller *Stagonospora (Phaeosphaeria) nodorum*-Vorkommen ein gemeinsames Auftreten mit *M. bolleyi* ermittelt (Riesen, 1985). Dabei wurde jedoch nur eine Abhängigkeit von der Pilz-Häufigkeit an einem Standort, ohne erkennbare gegenseitige Wechselwirkung vermutet. Auch von Schilf wurde eine negative Korrelation des Vorkommens von *Stagonospora* sp. und weiterer Pilze berichtet (Bán et al., 2000). Es handelt sich hierbei v.a. um das gemeinsame Vorkommen mit dem Rostpilz *Puccinia phragmitis*.

Bei der statistischen Betrachtung der in dieser Arbeit erhaltenen PCR-Daten ist generell folgendes zu beachten: Die für jede Probe einzeln durchgeführten, sehr sensitiven PCR-Tests waren nicht quantitativ, sondern gaben eine alles-oder-nichts-Antwort (siehe Abschnitt 2.5.7). Damit lieferten sie keine Information über eine eventuelle unterschiedliche Gewichtung der Mycelmasse zweier in der gleichen Probe vorkommenden Arten. Für Untersuchungen hinsichtlich positiver oder negativer Korrelation des gemeinsamen Vorkommens zweier Pilzarten und Schlußfolgerungen hinsichtlich Konkurrenz bzw. Antagonismus muss zusätzlich die zugrunde liegende Probengröße berücksichtigt werden. Der Umfang des für die DNA-Präparation eingesetzten Probenmaterials war mit mehreren Teilen des gleichen Organtyps bzw. mehrere cm langen Probestücken im Vergleich zu Pilzhyphen relativ groß (vergleiche Abschnitt 2.4.2). Selbst bei Verwendung von nur einem Probestück ist bei einer Größe von mehreren Zentimetern eine vollständige räumliche Trennung zweier Pilzarten denkbar. Dies würde noch verstärkt gelten, wenn diese unterschiedliche Gewebsschichten bevorzugen. Somit ist es möglich, dass eventuelle grundsätzlich vorhandene antagonistische Effekte, Konkurrenz um Metabolite bzw. Raum oder die Besetzung verschiedener kleinräumiger Nischen nicht ermittelt werden konnten. Das Vorhandensein solcher kleinräumigen Nischen bzw. das Verteilungsmuster der Pilze wurde z.B. an Douglasien-Nadeln (*Pseudotsuga menziesii*) deutlich (Carroll, 1995).

4.4.2 Konkurrenz

Die für Schilf festgestellte hohe Diversität assoziierter Endophyten bedingt, dass neben der Vermeidung von Konkurrenz durch Nutzung unterschiedlicher Substrate oder räumlicher Nischen auch Konkurrenz um Raum oder Pflanzenmetabolite stattfinden kann. Mittels Konkurrenztests wurden Wechselwirkungen von *Stagonospora* mit anderen Pilzen *in vitro* untersucht. Das Ziel hierbei war, die Durchsetzungsfähigkeit des auf Schilf positiv wirkenden *Stagonospora* zu ermitteln.

Bei der Interpretation von *in vitro*-Testergebnissen ist allgemein zu berücksichtigen, dass sie die Situation *in vivo* nur teilweise widerspiegeln können. Bei Untersuchungen der kompetitiven Wechselwirkungen zwischen *Microdochium* spp. und *Fusarium* sp. wurde eine begrenzte Übertragbarkeit von *in vitro*-Ergebnissen auf die Situation *in planta* festgestellt (Simpson et al., 2004). *In vivo* liegt eine andere physiologische Situation vor, aufgrund derer ein anderes

Verhalten des Pilzes möglich ist. *In vitro*-Ergebnisse sind daher nur begrenzt repräsentativ für die Situation im Freiland (Sieber, 2002). Ferner werden bei *in vitro* Tests allgemein die Interaktionspartner zur Vermeidung zu vieler Variablen paarweise zusammengesetzt; dagegen ist im Freiland, bzw. in einer Wirtspflanze die Anzahl der wechselwirkenden Interaktionspartner deutlich höher. Bei *in vitro*-Tests erwies sich bereits die Prognose für drei-Arten-Systeme auf der Basis von zwei-Arten-Systemen als nicht zuverlässig durchführbar (Sturrock et al., 2002), was die Problematik der Übertragbarkeit ins Freiland deutlich werden lässt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kompetitionstests nur bei einer einheitlichen Temperatur durchgeführt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Verhältnisse der Wuchsgeschwindigkeiten infolge unterschiedlicher Temperaturoptima (siehe auch Abbildung 32) und das Verhalten bei höheren oder niedrigeren Temperaturen anders sein können (Sturrock et al., 2002). Ein technisches Problem liegt in der unterschiedlichen Wuchsgeschwindigkeit der Kompetitoren. Dies kann die Interpretation erschweren, da ein rasch wachsender Kompetitor stets eine Tendenz hat, die Kolonie eines langsamwüchsigen zu umwachsen und damit überlegen zu erscheinen, ohne dass eine echte antagonistische Wirkung vorliegt. Durch vorgezogene Inokulation des langsamer wachsenden *Stagonospora*-Isolates 4/99-1 wurde versucht, diesem Phänomen entgegenzuwirken. Diese Vorgehensweise wurde z.B. auch von Yuen et al. (1999) angewandt.

Die Kompetitionsfähigkeit der *Stagonospora*-Arten lag insgesamt meist nahe an bzw. unter der Neutralitätsgrenze (= Gleichwertigkeit der Kompetitoren) der Interaktion. Lediglich für das *Stagonospora*-Isolat 4/99-1 schien ein leichter kompetetiver Vorteil zu bestehen (siehe Abschnitt 3.6.2 und Abbildung 34). Aus den erhaltenen Daten lässt sich insgesamt ersehen, dass die Durchsetzungsfähigkeit von *Stagonospora* im Freiland möglicherweise begrenzt ist. Als besonders starke Kompetitoren, gegen die sich *Stagonospora* nicht durchsetzen kann, erwiesen sich Vertreter der Gattungen *Gliocladium* und *Trichoderma* (siehe Abbildung 35, Abbildung 36, Abbildung 37). Diese sind in der Literatur aufgrund ihrer ausgeprägten antagonistischen Wirkung gegen andere Mikroorganismen als Biokontrollpilze bekannt geworden (Papavizas, 1985; Kredics et al., 2003). Das Verhältnis von *Stagonospora* 4/99-1 gegenüber *Microdochium* 5/97-54 wurde in den durchgeführten Tests (siehe Abschnitt 3.6.2) als leichte Dominanz von *Stagonospora* über *Microdochium* ermittelt. Dieses Ergebnis wieder spiegelt auch die durch PCR festgestellte schwach negative Korrelation beim gemeinsamen Auftreten in der Pflanze im Freiland (siehe Abschnitte 3.2.2.2.5 und 4.4.1).

Aus der vorhandenen Literatur ist eine gewisse Kompetitionsfähigkeit *in vivo* von *Stagonospora* spp. gegenüber anderen Pilzen ersichtlich: In Weizen wurde eine antagonistische Beziehung zwischen *S. nodorum* und *Microdochium bolleyi* beschrieben, bei der die Pilze offenbar Raumkonkurrenten sind und keine absolute Dominanz der einen über die andere Art besteht (Sieber, 1985). Die Grundlage dieser negativen Beziehung beider Arten konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden (Sieber, 2002; siehe auch Abschnitt 4.4.1). Ebenso wurde bei Weizen eine Verhinderung der Ausbreitung einer *Epicoccum*-Art durch die Anwesenheit von *S. nodorum* festgestellt (Sieber, 1985). *Stagonospora*-Arten sind auch als Hyperparasiten auf verschiedenen, u.a. pathogenen Pilzen an Eiche (*Quercus* sp.) bekannt geworden (Vajna, 2003). *Stagonospora* zeigte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Tests hinsichtlich Kompetition und negativer Korrelation des Auftretens zusammen mit *Microdochium* im Freiland

somit insgesamt ein ähnliches Verhalten, wie es an anderen Systemen ebenfalls beschrieben wurde.

Folgende weitere Anhaltspunkte für die mögliche begrenzte *in vivo*-Kompetitionsfähigkeit des in dieser Arbeit ausführlicher untersuchten *Stagonospora*-Isolates 4/99-1 ergeben sich aus den Mikro- und Makrokosmos-Experimenten: Beim Einwuchs in Schilf-Keimlinge aus Saatgut mit natürlicher Pilzbefruchtung zeigten sich Differenzen zwischen der Besiedlung der Wurzeln bei der unbehandelten bzw. der oberflächensterilisierten Variante (siehe Abschnitt 3.2.1.4 und Abbildung 11). Dies kann auf die unterschiedlichen Bedingungen zurückgeführt werden, denen *Stagonospora* ausgesetzt war: Bei der oberflächensterilisierten Variante war er weniger dem Konkurrenzdruck solcher Pilzarten ausgesetzt, die sich auf der Oberfläche des nicht behandelten Materials befinden. Somit könnte dem geringeren Besiedlungserfolg an den Wurzeln offenbar ein kompetitiver Nachteil zugrunde liegen, der sich auch im gleichzeitigen verstärkten Ausweichen des Pilzes in die oberirdischen Abschnitte widerspiegelt (vgl. Abbildung 11).

Ein weiterer Hinweis auf die *in vivo*-Kompetitionsfähigkeit ergibt sich aus dem im Freiland angesetzten Schilf-Makrokosmos. Hier konnte bereits drei Monate nach dem Auspflanzen *Stagonospora* mikrobiologisch nicht mehr nachgewiesen werden, obwohl der Pilz während der gesamten Vorkultivierungsphase nachweisbar war (siehe Abschnitt 3.3.3). Mit der Abwesenheit oder dem eventuell nur noch geringen Vorkommen des Pilzes fällt auch das Ausbleiben der in den Mikrokosmen beobachteten Wuchssteigerung zusammen. Dieser Beobachtung liegt offenbar ein Verdrängungsprozess durch andere die Wurzeln ebenfalls besiedelnde Pilzarten zugrunde. Ähnliche Vorgänge wurden bei DSE (Dark Septate Endophytes) an vitalen Kiefernssämlingen während deren Anzucht in Baumschulen beobachtet. Hier wurden die während der ganzen Anzuchtdauer persistenten Pilze nach der Auspflanzung durch Mykorrhizapilze verdrängt (Sieber, 2002).

Hierzu ist nochmals zu bemerken, dass der Pilz in der früheren Isolierungskampagne (Wirsel et al., 2001; vgl. Abschnitt 4.2.1) nicht gefunden wurde, obwohl er gemäß dem PCR-Nachweis (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1) regelmäßig – wenn auch mit einer möglicherweise geringen Mycelmasse – in den Schilfbeständen am Bodensee vorkommt. Somit ist neben einer vollständigen Verdrängung durch andere Pilze also auch ein schlechtes Auswachsen infolge einer Konkurrenzsituation bei der Reisolierung, besonders bei stark verminderter Häufigkeit, denkbar. PCR-Daten, die eine weitergehende Aussage hinsichtlich Restvorkommen von *Stagonospora* sp. 4/99-1 erlauben würden, liegen jedoch nicht vor.

Entgegen der *in vitro* festgestellten, insgesamt im neutralen Bereich liegenden – also begrenzten – Kompetitionsfähigkeit und der beim Freilandversuch beobachteten offensichtlichen Verdrängung durch andere Pilze kommt *Stagonospora* im Schilf am Bodensee verbreitet, wenn auch mit möglicherweise nur geringer Konzentration (vgl. Abschnitt 4.2.1) vor. Offenbar kann sich der Pilz unter geeigneten, noch nicht bekannten und im Freilandversuch nicht bereitgestellten Bedingungen trotzdem gegen andere Konkurrenten durchsetzen oder mit ihnen koexistieren. Möglicherweise liegt dies an der Besetzung kleiner räumlicher bzw. ökologischer Nischen.

In dem an Bodenseestandorten vorliegenden Fall einer Koexistenz mit weiteren Pilzen kann durch diese eine Überlagerung des von *Stagonospora* ausgelösten Wuchseffektes stattfinden. Damit ist es möglich, dass dieser samenbürtigen symbiontischen Gattung eine bedeutsame Rolle nur temporär in der frühen Phase der Etablierung neuer Schilfbestände aus Keimlingen zukommt, während andere Pilze die jungen Pflanzen noch nicht besiedelt haben. Diese temporäre Bedeutung liefert gleichzeitig eine mögliche Erklärung für die Persistenz dieses vertikal übertragenen Pilzes in den Wirtspopulationen (vgl. Faeth & Sullivan, 2003; Abschnitt 4.1.2).

Über diese sich an nicht-überfluteten Standorten vollziehende Keimlingsentwicklung des Schilfes (siehe Abschnitte 1.1.1 und 1.1.2) hinaus könnte die Bedeutung von *Stagonospora* habitatsabhängig sein. Überflutete und somit extreme Habitate, sind für die an Schilf auf trockenen Standorten vorkommenden arbuskulären Mykorrhiza-Pilze nicht geeignet (Wirsal, 2004). In solchen Habitaten ist eine Übernahme der nährstofftransportierenden und nischenbesetzenden Funktion derselben durch endophytische Pilze bei manchen Pflanzenarten möglich (Thormann et al., 1999; Sieber, 2002). Hinweise auf einen derartigen Ersatz von Mykorrhiza durch Endophyten finden sich auch in anderen extremen Habitaten, z.B. arktischen und alpinen kalten Standorten, sowie in Halophyten auf Standorten mit hoher Salzkonzentration (Sieber, 2002). Hier fehlt ebenfalls die arbuskuläre Mykorrhiza, während Wurzelendophyten vorhanden sind.

Allgemein ist ein Vorteil endophytischer Pilze im Freiland gegenüber saprophytischen bei der Nützung des pflanzlichen Materials als Substrat zu erwarten. Dieser begründet sich darin, dass die Endophyten beim Abbau des seneszenten Materials im Herbst bereits in den Pflanzenteilen anwesend sind und damit einen Vorsprung haben, während reine Saprobier diese erst von außen besiedeln und eindringen müssen (Sieber, 1985; vgl. Hudson, 1968).

Abschließend lässt sich feststellen, dass unter den zahlreichen mit der Schilf-Pflanze assoziierten Pilzen mutualistische Endophyten vorkommen, die über die Samen übertragen werden können. Diese können in Abhängigkeit der Umweltbedingungen der Pflanze einen Vitalitätsvorteil verleihen. Sie scheinen v.a. temporär bei der Etablierung junger Keimlinge von besonderer Bedeutung zu sein. Durch die erbliche Assoziation haben die Pflanzen einen Vorteil von Anfang an, während Keimlinge aus endophytenfreiem Saatgut erst aus der Umgebung besiedelt werden müssten, um einen durch den Pilz vermittelten Vorteil zu nutzen.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit erfolgte eine konzentrierte Bearbeitung einiger weniger Gruppen aus der großen Vielfalt schilfassoziierter Pilze. Trotz der Beschränkung auf wenige Pilze konnten nicht alle Fragestellungen beantwortet werden, bzw. sind während der Arbeit neue Perspektiven aufgetreten. Deshalb sollen abschließend noch ungeklärt gebliebene und neue interessante Fragen und künftige mögliche Arbeitsfelder angesprochen werden.

Teile des Lebenszyklus, der Infektionswege und der Verbreitungsmechanismen von *Stagonospora* im Freiland sind noch nicht sicher ermittelt (siehe Abbildung 38). Zur Aufklärung

des Infektionsweges über die Wurzeln könnte hier die Beprobung abgestorbener Pflanzenteile im Freiland während des Winters, sowie die Entnahme von Bodenproben in der Nähe der Pflanzen beitragen. Über die Isolierung aus diesen Materialien und die Beobachtung von Sporulation wären das Vorkommen und die Vitalität des Pilzes in der Umgebung ohne direkten Kontakt zur Pflanze nachweisbar. Durch die Aufstellung von Sporenfallen im Frühjahr, bzw. Sommer würde man Aufschluß bekommen, ob der Pilz im Freiland sporuliert und dadurch mit einer zusätzlichen Infektion der Schilfpflanzen durch Sporenflug zu rechnen ist.

Durch die Isolierung, bzw. den PCR-Nachweis von *Stagonospora* aus scharf oberflächensterilisierten Schilfsamen wurde nachgewiesen, dass sich der Pilz im Inneren der Samen befindet. Über die genaue Lokalisierung des Pilzes in den verschiedenen Schichten des Schilf-Samens und den Zeitpunkt der Infektion des pflanzlichen Embryos ist jedoch noch nichts bekannt. Immunfluoreszenzmikroskopie an keimenden Samen mit natürlicher Pilzbefruchtung könnte hier hilfreich sein.

Die optimalen Infektions-, bzw. Durchsetzungsbedingungen von *Stagonospora* sind eine weitere offene Frage. An jungen Schilfkeimlingen wurde bei den verwendeten Mikrokosmossystemen eine gute Infektionsfähigkeit von *Stagonospora* festgestellt. Für manche endophytische Pilze wurde bei artifizieller Inokulation eine Alters-, Umgebungs- und Methodenabhängigkeit der erfolgreichen Infektion festgestellt (Latch & Christensen, 1985). Dementsprechend kann auch bei *Stagonospora* mit einer von den Bedingungen abhängigen Infektionsfähigkeit gerechnet werden. Hierbei wäre es interessant zu wissen, ob nicht nur die mechanisch weniger festen Wurzeln junger Keimlinge, sondern auch jene älterer Pflanzen infiziert werden können, bzw. bis zu welchem Alter der Wurzelabschnitte Infektion erfolgen kann.

Für die Durchsetzungsfähigkeit von *Stagonospora in vivo* sind neben den idealen Bedingungen bei der Interaktion mit der Wirtspflanze Wechselwirkungen mit anderen Pilzen und deren Optimalbedingungen von Bedeutung. Die durchgeführten *in vitro*-Kompetitionstests wurden auf unterschiedlichen Substraten, aber bei einer einheitlichen Temperatur angesetzt. Das Wuchsverhalten der Pilze ist jedoch stark temperaturabhängig, so dass das Ergebnis der Interaktion einer Pilzkombination mit der Temperatur variieren kann. Bei einer Fortführung von *in vitro*-Studien ist daher die Einbeziehung verschiedener Temperaturen sinnvoll. In diesem Zusammenhang können auch Anhaltspunkte für molekulare Mechanismen beobachteter Interaktions-Phänomene wie Hemmhofbildung oder Lyse gewonnen werden. Dies könnte durch die Applikation von Flüssigkulturüberständen auf die Kolonie eines der Kompetitoren erfolgen. Kompetitionstests *in vivo* durch Inokulation von Mikrokosmospflanzen mit zwei Pilzarten würden authentischer als *in vitro* Tests die mikroskopische Beobachtung von deren Ausbreitungsverhalten gestatten. Zusätzlich würde dieses Testsystem die Untersuchung des Gesamteffektes antagonistisch bzw. synergistisch wirkender Pilze auf die Pflanze im Vergleich zu den durch die Pilze bedingten Einzeleffekten erlauben.

Über die Analyse der Konkurrenz endophytischer Pilze *in vivo* hinaus ist es untersuchenswert, ob Schilfendophyten ebenso, wie teilweise von anderen Endophyten berichtet (Arnold et al., 2003; siehe auch Abschnitte 1.3.5 und 1.3.6), ihrer Wirtspflanze einen Schutz vor pathogenen Pilzen, z.B. Oomyceten wie *Phytophthora*- oder *Pythium*-Arten, vermitteln. Dieser könnte bei *Stagonospora*-Arten, die infolge der Samenbürtigkeit bereits in den jungen Keim-

lingen anwesend sind, von besonderer Bedeutung während dieser empfindlichen Phase sein. Wissenswert wäre auch, ob ein möglicher Schutz systemisch oder lokal ist, ob er auf Raum- und Nahrungskonkurrenz oder auf direktem Antagonismus beruht und ob er von einer Vorbesiedlung durch den Endophyten abhängt oder auch nach Infektion durch Verdrängung des Pathogens erfolgen kann (vgl. Clay, 2004).

Die Mechanismen, die der Wachsförderung zugrunde liegen, konnten in dieser Arbeit nicht sicher aufgeklärt werden. Im Falle einer hormonal bedingten Förderung konnten zwar Gibberelline als entscheidender Mechanismus offenbar ausgeschlossen werden. Für weitere Hormongruppen ist dies jedoch noch nicht geklärt, da diese nicht untersucht wurden. Ebenso ist die Möglichkeit einer vom Medium abhängigen Hormonproduktion eine offene Frage. Zur Klärung einer Mykorrhiza-ähnlichen Funktion und deren Leistungsfähigkeit wäre eine Untersuchung verschiedener Pflanzsubstrate mit variablem Nährstoffgehalt zweckmäßig. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Schilfendophyten Mykorrhiza-Funktionen an überschwemmten Standorten, auf denen arbuskuläre Mykorrhiza-Pilze nicht vorkommen, übernehmen können (vgl. Abschnitt 4.4.2). Dieser Ersatz von Mykorrhiza könnte durch die Inokulation von Schilf-Mikrokosmen mit Kombinationen von Endophyten und Mykorrhizapilzen unter Variation der Feuchtebedingungen untersucht werden. Das Besiedlungsausmaß und der Einfluss auf den Wuchs der Pflanzen würden hierbei den Nutzen der Pilze in Abhängigkeit der Habitats aufzeigen. In diesem Zusammenhang wäre nicht nur der Einfluss der Pilze auf äußere Wachstumsparameter, sondern auch auf den Nährstoff- und Chlorophyllgehalt der Pflanzen zu untersuchen, da dieser u.U. auch bei identischen Biomasseparametern variieren kann.

Da für viele endophytische Pilze ein Kontinuum zwischen latentem Parasitismus und Mutualismus besteht (vgl. Abschnitt 1.3.3), was in ähnlicher Weise auch für Mykorrhiza-Pilze existiert (Johnson et al., 1997), bleibt zu klären, ob die in dieser Arbeit festgestellte positive Wirkung von *Stagonospora* allgemein stabil ist, oder ob bei Verschiebung der äußeren Bedingungen der Pilz auch negative Effekte haben kann. Im weiteren ist auch nicht bekannt, ob die bearbeiteten *Stagonospora*-Isolate nur Schilf als alleinige Wirtspflanze haben oder ob sie auch auf anderen Pflanzen mutualistisch sein können oder sonstigen Einfluss nehmen.

Abschließend bleibt zu klären, welche Rolle die während der ganzen Vegetationsperiode und offenbar auch während der ganzen Lebensdauer des Schilfes vom Keimling an gegenwärtigen und fördernden Pilze beim Eintritt der Seneszenz im Herbst spielen und wieviel sie zum Abbau des toten Materials beitragen.

5. Zusammenfassung

Von oberflächensterilisierten Schilf-Samen (*Phragmites australis*) vom Bodensee wurden endophytische Pilze isoliert, die mittels klassischer und molekularer Taxonomie identifiziert wurden. Die meisten dieser Isolate wurden als drei verschiedene *Stagonospora*-Arten identifiziert. Damit wurde gezeigt, dass in Schilf mehrere Arten samenbürtiger Endophyten vorkommen. Der häufigste Typ (Sequenztyp 4/99-1) hatte innerhalb der aus Samen erhaltenen Isolate einen Anteil von 46%. Er weist eine mit dem Stamm *Stagonospora neglecta* var. *colorata* CBS 343.86 übereinstimmende ITS-Sequenz auf.

Für *Stagonospora* 4/99-1 wurden auf Basis der Variabilität der internal transcribed spacer (ITS) der ribosomalen DNA spezifische PCR-Primer entwickelt. Nested PCR-Analysen zeigten, dass diese Art in Samen je nach Standort und Jahr mit einer Häufigkeit von bis zu ca. 80% vorkommt. Es wurde an Mikrokosmen mit Keimlingen, die aus Samen mit natürlicher Endophytenbefruchtung angezogen wurden, gezeigt, dass der Pilz in Wurzeln und oberirdische Teile der sich entwickelnden Keimlinge einwuchs und somit erfolgreich auf die nächste Wirtsgeneration übertragen wurde.

Das Vorkommen dieser Art wurde an vier Bodensee-Standorten über eine Zeitspanne von drei Jahren durch nested PCR an insgesamt 252 Proben verschiedener Organe von 66 Pflanzen, sowie zusätzlich an Samen untersucht. Die Ergebnisse zeigen an, dass *Stagonospora* 4/99-1 in Wurzeln und Rhizomen in niedriger Häufigkeit persistiert, während der Vegetationsperiode in den wachsenden Halm aufsteigt, wo er ebenso wie in Blättern im Spätsommer in höherer Häufigkeit vorkommt. Er wächst vermutlich in die Samenanlage ein, um so auf die Nachfolgegeneration übertragen zu werden („vertikale Transmission“).

Zur Untersuchung des Einflusses Schilf-assoziiierter Pilze auf den Wirt wurden Methoden zur Gewinnung axenischer Keimlinge aus Samen entwickelt. In solchen Mikrokosmen wurde ein signifikant verstärktes Wachstum von Schilf nach Inokulation mit *Stagonospora* und *Microdochium* über einen Zeitraum von 4-5 Monaten festgestellt. Dies zeigt, dass auch bei Schilf mutualistische Pilze vorkommen, für die eine erbliche Assoziation mit ihrer Wirtspflanze besteht.

Pflanzen aus Mikrokosmen und Keimlinge aus Samen mit natürlicher Pilzbefruchtung wurden zur genauen Lokalisierung des Pilzes immunofluoreszenzmikroskopisch mit einem gegen *Stagonospora* gerichteten Antikörper untersucht. Die Pilzhyphe wuchsen v.a. zwischen den Epidermiszellen der Wurzeln und in Kontakt mit der ersten Schicht kortikaler Zellen. In Blättern und Halmen von Keimlingen wurde in Parenchym-Geweben das Vorkommen einzelner Hyphe beobachtet. Durch die Lokalisierung im gesunden Pflanzengewebe wurde der endophytische Status des Pilzes bestätigt. Ergebnisse aus *in vitro*-Kompetitionstests zeigten eine begrenzte Konkurrenzfähigkeit der *Stagonospora*-Isolate gegen andere Schilf-assoziierte Pilze.

Die erhaltenen Daten deuten insgesamt darauf hin, dass samenbürtige *Stagonospora*-Arten v.a. bei Schilfkeimlingen eine besondere, möglicherweise temporäre Bedeutung haben. Hierbei können sie aufgrund einer mykorrhizaähnlichen Funktion den jungen, noch nicht durch andere Pilze infizierten Keimlingen bei der Besiedlung neuer Standorte Vorteile verschaffen.

Für weitere Endophyten, *Microdochium* spp. und *Trichoderma* sp., wurde an Wurzelproben durch nested PCR eine spezifische Bevorzugung überschwemmter bzw. trockener Habitate gezeigt. Für zwei Vertreter der Gattung *Microdochium* wurde hierbei eine entgegengesetzte Bevorzugung der unterschiedlichen Habitate gezeigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich diese nahe verwandten Arten auch hinsichtlich ihrer optimalen Wachstumstemperatur unterscheiden.

6. Anhang

6.1 Herkunft der Chemikalien

Die verwendeten Standardchemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad. Sie wurden, sofern in der unten aufgeführten Liste nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

Agar (Agar-Agar)	Serva, Heidelberg
Agarose (Neeo)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Na-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA, USA
BSA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Chelex 100	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
dNTP's	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gerstenmalzextrakt	Biomalt Kraftnahrung, Villa Natura Gesundheitsprodukte GmbH, Kirn
MgCl ₂	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
NucleoSpin Plant Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
PCR-Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Reaktionspuffer für PCR	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bzw. MWG-Biotech AG, Ebersberg
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Taq DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bzw. MWG-Biotech AG, Ebersberg
Triforin („Saprol neu“)	Cyanamid Agrar GmbH & Co. KG, Schwabenheim
V8-Gemüsesaft	Campbell Grocery Products Ltd., Norfolk, England

6.2 Abkürzungen

Annealing	Anlagerung der Primer
BSA	Rinderserum-Albumin (Bovine serum albumin)
ca.	circa
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande
cfu	Colony forming units
cm	Zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat(gemisch)
DSE	Dark septate endophytes

EtOH	Ethanol
fg	Femto-Gramm, 10^{-15} g
g	Gramm
g	Erdbeschleunigungsfaktor = $9,81 \text{ m/s}^2$ (nur für Zentrifugation)
GA ₃	Gibberellinsäure
H ₂ O	Wasser
l	Liter
leg.	legit = gesammelt von (Person)
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	millimolar
μ	mikro
μE	Mikro-Einstein
Na	Natrium
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaOCl	Natriumhypochlorit, „Chlorbleichlauge“
ng	Nano-Gramm, 10^{-9} g
(NH ₃) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
p.a.	Für Analyse
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Piko-Gramm, 10^{-12} g
pH	potentia Hydrogenii
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg, Sedimentationskoeffizient
sec	Sekunde
SNA	Synthetischer Nährstoffarmer Agar
Std.	Stunden
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
w/v	weight/volume, d.h. Gewicht pro Volumen

7. Literatur

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.
- An, Z.-Q., Siegel, M. R., Hollin, W., Tsai, H.-F., Schmidt, D. & Schardl, C. L. (1993): Relationships among non-*Acremonium* sp. fungal endophytes in five grass species. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (5), 1540-1548.
- Apinis, A. E., Chesters, C. G. C. & Taligoola, H. K. (1972a): Colonisation of *Phragmites communis* leaves by fungi. *Nova Hedwigia: Zeitschrift für Kryptogamenkunde* **23**, 113-124.
- Apinis, A. E., Chesters, C. G. C. & Taligoola, H. K. (1972b): Microfungi colonizing submerged standing culms of *Phragmites communis* Trin. *Nova Hedwigia: Zeitschrift für Kryptogamenkunde* **23**, 473-480.
- Apinis, A. E., Chesters, C. G. C. & Taligoola, H. K. (1975): Microfungi colonizing nodes and internodes of aerial standing culms of *Phragmites communis* Trin. *Nova Hedwigia: Zeitschrift für Kryptogamenkunde* **26**, 495-507.
- Applied Biosystems (2000): ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kits. Original and Version 2.0 (Protocol), PE (Perkin-Elmer) Corporation/ Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.
- Arachevaleta, M., Bacon, C. W., Hoveland, C. S. & Radcliffe, D. E. (1989): Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy Journal* **81**, 83-90.
- Armstrong, J. & Armstrong, W. (1988): *Phragmites australis* - A preliminary study of soil-oxidizing sites and internal gas transport pathways. *New Phytologist* **108**, 373-382.
- Armstrong, J. & Armstrong, W. (1990): Light-enhanced convective throughflow increases oxygenation in rhizomes and rhizosphere of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *New Phytologist* **114**, 121-128.
- Armstrong, J., Armstrong, W. & Beckett, P. M. (1992): *Phragmites australis*: Venturi- and humidity-induced pressure flows enhance rhizome aeration and rhizosphere oxidation. *New Phytologist* **120**, 197-207.
- Armstrong, J., Afreen-Zobayed, F. & Armstrong, W. (1996a): *Phragmites* die-back: sulphide- and acetic acid-induced bud and root death, lignifications, and blockages within aeration and vascular systems. *New Phytologist* **134**, 601-614.
- Armstrong, J., Armstrong, W., Armstrong, I. B. & Pittaway, G. R. (1996b): Senescence, and phytotoxin, insect, fungal and mechanical damage: factors reducing convective gas-flows in *Phragmites australis*. *Aquatic Botany* **54**, 211-226.
- Armstrong, J. & Armstrong, W. (1999): *Phragmites* die-back: toxic effects of propionic, butyric and caproic acids in relation to pH. *New Phytologist* **142**, 201-217.

- Armstrong, W., Cousins, D., Armstrong, J., Turner, D. W. & Beckett, P. M. (2000): Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany* **86**, 687-703.
- Arnold, A. E., Mejia, L. C., Kyllö, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N. & Herre, E. A. (2003): Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **100** (26), 15649-15654.
- Azevedo, M. D. & Welty, R. E. (1995): A study of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in the roots of tall fescue seedlings. *Mycologia* **87** (3), 289-297.
- Bán, R., Fischl, G. & Virányi, F. (1996): A spatio-temporal analysis of fungal pathogens on reed in natural habitats. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **31** (3-4), 219-227.
- Bán, R., Engloner, A. I. & Virányi, F. (2000): Occurrence of fungal pathogens in relation to reed quality / Das Vorkommen von Pilzkrankheiten an Rohr (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) im Zusammenhang mit der Qualität. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/ Journal of Plant Diseases and Protection* **107** (3), 258-266.
- Bertness, M. D., Ewanchuk, P. J. & Silliman, B. R. (2002): Anthropogenic modification of New England salt marsh landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **99** (3), 1395-1398.
- Bettucci, L. & Saravay, M. (1993): Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study. *Mycological Research* **97** (6), 679-682.
- Bills, G. F. (1996): Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: Redlin, S. C. & Carris, L. M. (Hrsg.): Endophytic fungi in grasses and woody plants. Systematics, ecology and evolution. APS Press, St. Paul, Minnesota, 31-65.
- Blodgett, J. T. & Worrall, J. J. (1992): Site relationships of *Armillaria*-spp. in New York. *Plant Disease* **76** (2), 170-174.
- Böcker, R., Schmieder, K., Ostendorp, W. & Dienst, M. (2001): Auswirkungen des Extremhochwassers von 1999 auf die Uferöhrichte des Bodensees. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS am 28. Februar und 1. März 2001 im Forschungszentrum Karlsruhe. Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS). Land Baden-Württemberg.
- Böcker, R., Schmieder, K., Ostendorp, W. & Dienst, M. (2002): Auswirkungen des Extremhochwassers von 1999 auf die Uferöhrichte des Bodensees. 2. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS am 26. und 27. Februar 2002 im Forschungszentrum Karlsruhe. Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS). Land Baden-Württemberg.
- Böcker, R., Schmieder, K., Ostendorp, W. & Dienst, M. (2003): Auswirkungen des Extremhochwassers von 1999 auf die Uferöhrichte des Bodensees. 3. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS am 11. und 12. März 2003 im Forschungs-

- zentrum Karlsruhe. Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS). Land Baden-Württemberg.
- Borneman, J. & Hartin, R. J. (2000): PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (10), 4356-4360.
- Bose, S. R. (1947): Hereditary (seed-borne) symbiosis in *Casuarina equisetifolia* Forst. *Nature* **159**, 512-514.
- Bournsnell, J. G. (1950): The symbiotic seed-borne fungus in the Cistaceae. *Annals of Botany* **14**, 217-243.
- Bridge, P. (2002): The history and application of molecular mycology. *Mycologist* **16** (3), 90-99.
- Bridge, P. D., Roberts, P. J., Spooner, B. M. & Panchal, G. (2003): On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist* **160** (1), 43-48.
- Britschgi, T. B. & Giovannoni, S. J. (1991): Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **57** (6), 1707-1713.
- Brix, H. (1988): Light-dependent variations in the composition of the internal atmosphere of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Aquatic Botany* **30**, 319-329.
- Brix, H. (1989): Gas exchange through dead culms of reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Aquatic Botany* **35**, 81-98.
- Brönnimann, A. (1968): Zur Kenntnis von *Septoria nodorum* Berk., dem Erreger der Spelzenbräune und einer Blattdürre des Weizens. *Phytopathologische Zeitschrift* **61** (2), 101-146.
- Bruce, K. D., Hiorns, W. D., Hobman, J. L., Osborn, A. M., Strike, P. & Ritchie, D. A. (1992): Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (10), 3413-3416.
- Bursche, E.-M. (1980): Wasserpflanzen. Eine kleine Botanik der Wassergewächse. Neumann, Leipzig, Radebeul.
- Bush, L. P., Wilkinson, H. H. & Schardl, C. L. (1997): Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology* **114**, 1-7.
- Cabral, D., Stone, J. K. & Carroll, G. C. (1993): The internal mycobiota of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. *Mycological Research* **97** (3), 367-376.
- Cairney, J. W. G. (2000): Evolution of mycorrhiza systems. *Naturwissenschaften* **87** (11), 467-475.
- Camara, M. P. S., Palm, M. E., Berkum, P. v. & O'Neill, N. R. (2002): Molecular phylogeny of *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria*. *Mycologia* **94** (4), 630-640.
- Carroll, G. (1995): Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany* **73** (Suppl. 1), S1316-S1324.

- Carroll, G. C. (1986): The Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema, N. J. & van den Heuvel, J. (Hrsg.): Microbiology of the phyllosphere. Cambridge University Press, Cambridge, 205-222.
- Carroll, G. C. (1988): Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **69** (1), 2-9.
- Carver, C. E., Pitt, D. & Rhodes, D. J. (1996): Aetiology and biological control of Fusarium wilt of pinks (*Dianthus caryophyllus*) using *Trichoderma aureoviride*. *Plant Pathology* **45** (4), 618-630.
- Cheplick, G. P., Clay, K. & Marks, S. (1989): Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *New Phytologist* **111**, 89-97.
- Cheplick, G. P. & Cho, R. (2003): Interactive effects of fungal endophyte infection and host genotype on growth and storage in *Lolium perenne*. *New Phytologist* **158**, 183-191.
- Christensen, M. J., Bennett, R. J. & Schmid, J. (2001): Vascular bundle colonisation by *Neotyphodium* endophytes in natural and novel associations with grasses. *Mycological Research* **105** (10), 1239-1245.
- Christensen, M. J., Bennett, R. J. & Schmid, J. (2002): Growth of *Epichloë/Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycological Research* **106** (1), 93-106.
- Chung, K.-R. & Schardl, C. L. (1997): Vegetative compatibility between and within *Epichloë* species. *Mycologia* **89** (4), 558-565.
- Clay, K. (1990a): Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**, 275-297.
- Clay, K. (1990b): Insects, endophytic fungi and plants. In: Burdon, J. J. & Leather, S. R. (Hrsg.): Pests, Pathogens and Plant Communities. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 111-130.
- Clay, K. (1992): Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. *Natural Toxins* **1**, 147-149.
- Clay, K. & Holah, J. (1999): Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* **285**, 1742-1744.
- Clay, K. (2004): Fungi and the food of the gods. *Nature* **427**, 401-402.
- Cunfer, B. M. & Ueng, P. P. (1999): Taxonomy and identification of *Septoria* and *Stagonospora* species on small grain cereals. *Annual Review of Phytopathology* **37**, 267-284.
- Cunnell, G. J. (1957): *Stagonospora* spp. on *Phragmites australis* Trin. *Transactions of the British Mycological Society* **40** (4), 443-455.
- Damm, U., Brune, A. & Mendgen, K. (2003): In vivo observation of conidial germination at the oxic-anoxic interface and infection of submerged reed roots by *Microdochium bolleyi*. *FEMS Microbiology Ecology* **45**, 293-299.

- de Bary, A. (1866): Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. In: Hofmeister, W. (Hrsg.): Handbuch der Physiologischen Botanik. Engelmann, Leipzig. Bd. 2.
- Douglas, L. I. & Deacon, J. W. (1994): Strain variation in tolerance of water stress by *Idriella (Microdochium) bolleyi*, a biocontrol agent of cereal root and stem base pathogens. *Biocontrol Science and Technology* **4** (239-249).
- Engloner, A. I., Bán, R., Sugár, E. & Virányi, F. (2000): Effects of fungal pathogens on the element content of reed leaf blades. / Die Wirkung von Pilzerregern auf den Gehalt von Elementen in Schilfblattflächen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection* **107** (6), 627-636.
- Ernst, M., Mendgen, K. W. & Wirsal, S. G. R. (2003): Endophytic fungal mutualists: Seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16** (7), 580-587.
- Faeth, S. H. (2002): Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos* **98**, 25-36.
- Faeth, S. H. & Sullivan, T. J. (2003): Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *The American Naturalist* **161** (2), 310-325.
- Fisher, P. J. & Punithalingam, E. (1993): *Stagonospora pteridiicola*, new species, a new endophytic coelomycete in *Pteridium aquilinum*. *Mycological Research* **97** (6), 661-664.
- Fisher, P. J. (1996): Survival and spread of the endophyte *Stagonospora pteridiicola* in *Pteridium aquilinum*, other ferns and some flowering plants. *New Phytologist* **132** (1), 119-122.
- Fitt, B. D. L. & Hornby, D. (1978): Effects of root-infecting fungi on wheat transport processes and growth. *Physiological Plant Pathology* **13**, 335-346.
- Freeman, E. M. (1903): The seed-fungus of *Lolium temulentum* L., the darnel. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Ser. B* **196**, 1-27.
- Freeman, S. & Rodriguez, R. J. (1993): Genetic conversion of a fungal pathogen to a non-pathogenic, endophytic mutualist. *Science* **260**, 75-78.
- Freund, J. & McDermott, K. (1942): Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **49**, 548-553.
- Ganley, R. J., Brunfeld, S. J. & Newcombe, G. (2004): A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **101** (27), 10107-10112.
- Gao, K. & Mendgen, K.: Seed transmitted beneficial endophytic *Stagonospora* sp. can penetrate the walls of the root epidermis, but not deep into the cortex of reed. Manuskript eingereicht.
- Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**, 113-118.

- Groppe, K., Steinger, T., Sanders, I., Schmid, B., Wiemken, A. & Boller, T. (1999): Interaction between the endophytic fungus *Epichloë bromicola* and the grass *Bromus erectus*: effects of endophyte infection, fungal concentration and environment on grass growth and flowering. *Molecular Ecology* **8**, 1827-1835.
- Grosser, S., Pohl, W. & Melzer, A. (1997): Untersuchung des Schilfrückganges an bayerischen Seen. Forschungsprojekt des Bayerischen Staatsministeriums für Landesentwicklung und Umweltfragen. Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, Heft 141. München.
- Guérin, P. (1898): Sur la présence d'un champignon dans l'Ivraie. *Journal de Botanique* **12**, 230-238.
- Hadjiolov, A. A. (1985): The nucleolus and ribosome biogenesis. Springer Verlag, Wien - New York.
- Hallmann, J. & Sikora, R. A. (1996): Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 155-162.
- Hampp, R. & Schaeffer, C. (1999): Mycorrhiza - Carbohydrate and energy metabolism. In: Varma, A. & Hock, B. (Hrsg.): Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg, 273-303.
- Hernandez, A., Martinez, J. L. & Mellado, R. P. (1999): Detection of fungal spores from contaminated surfaces by the polymerase chain reaction. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **15** (1), 39-42.
- Hesse, U. (2002): Untersuchungen zur Endophytbesiedlung von Gräserökotypen und zu Symbioseeffekten durch *Neotyphodium lolii* in *Lolium perenne*-Genotypen hinsichtlich Stresstoleranz und Ertragsmerkmale. Dissertation. Landwirtschaftliche Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle/Saale.
- Hinton, D. M. & Bacon, C. W. (1985): The distribution and ultrastructure of the endophyte of toxic tall fescue. *Canadian Journal of Botany* **63**, 36-42.
- Hirsch, G. & Braun, U. (1992): Communities of parasitic microfungi. In: Winterhoff, W. (Hrsg.): Fungi in vegetation Science. Kluwer Academic, Dordrecht. Vol. 19, 225-250.
- Hodge, A., Campbell, C. D. & Fitter, A. H. (2001): An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* **413**, 297-299.
- Honsell, M. (1879): Der Bodensee und die Tieferlegung seiner Hochwasserstände. Eine hydrologische Studie. Verlag Konrad Wittwer, Stuttgart.
- Hudson, H. J. (1968): The ecology of fungi on plant remains above the soil. *New Phytologist* **67**, 837-874.
- Hunt, J., Boddy, L., Randerson, P. F. & Rogers, H. J. (2004): An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Microbial Ecology* **47**, 385-395.

- Hürlimann, H. (1951): Zur Lebensgeschichte des Schilfs an den Ufern der Schweizer Seen. Verlag Hans Huber, Bern.
- Isaac, S. (1992): Fungal-plant interactions. Chapman & Hall, London.
- Jackson, D. P., Hayden, J. D. & Quirke, P. (1991): Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In: McPherson, M. J., Quirke, P. & Taylor, G. R. (Hrsg.): PCR: A practical approach. IRL Press, at Oxford University Press, S. 29-50.
- Jackson, M. B. & Armstrong, W. (1999): Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology* **1**, 274-287.
- Jakobsen, I. (1999): Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhizas. In: Varma, A. & Hock, B. (Hrsg.): Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg, 305-332.
- Johnson, N. C., Graham, J. H. & Smith, F. A. (1997): Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**, 575-585.
- Johnson-Cicalese, J., Secks, M. E., Lam, C. K., Meyer, W. A., Murphy, J. A. & Belanger, F. C. (2000): Cross species inoculation of chewings and strong creeping red fescues with fungal endophytes. *Crop Science* **40**, 1485-1489.
- Judelson, H. S. & Tooley, P. W. (2000): Enhanced polymerase chain reaction methods for detecting and quantifying *Phytophthora infestans* in plants. *Phytopathology* **90** (10), 1112-1119.
- Jumpponen, A. & Trappe, J. M. (1998): Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* **140**, 295-310.
- Jumpponen, A. (2001): Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* **11**, 207-211.
- Kageyama, K., Komatsu, T. & Suga, H. (2003): Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *Journal of General Plant Pathology* **69** (3), 153-160.
- Kawaide, H., Sassa, T. & Kamiya, Y. (1995): Plant-like biosynthesis of gibberellin A1 in the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. *Phytochemistry* **39** (2), 305-310.
- Kenmoku, H., Oozono, T., Sugai, T. & Sassa, T. (2001): Mass production of pure gibberellin A1 by *Phaeosphaeria* sp. L487 and the fungal preparation of [U-13C]gibberellin A1. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* **65** (9), 2095-2097.
- Kirk, J. J. & Deacon, J. W. (1987): Control of the take-all fungus by *Microdochium bolleyi*, and interactions involving *M. bolleyi*, *Phialophora graminicola* and *Periconia macrospinoso* on cereal roots. *Plant and Soil* **98**, 231-237.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A. (2001): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9. Auflage. CAB International, Wallingford.
- Ko, W. H., Chang, H. S. & Su, H. J. (1978): Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. *Transactions of the British Mycological Society* **71**, 496-499.

- Konold, W. (2000): Die Regulierung des Bodensees: eine alte Geschichte. Alte und aktuelle Probleme mit dem Hochwasser. *Der Bürger im Staat. Herausgegeben von der Landeszentrale für politische Bildung Baden-Württemberg* **50. Jahrgang** (Heft 2), 82-86.
- Koppitz, H., Kühl, H., Hesse, K. & Kohl, J.-G. (1997): Some aspects of the importance of genetic diversity in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel for the development of reed stands. *Botanica Acta* **110**, 1-7.
- Koppitz, H. & Kühl, H. (2000): To the importance of genetic diversity of *Phragmites australis* in the development of reed stands. *Wetlands Ecology and Management* **8**, 403-414.
- Koppitz, H. (2004): Effects of flooding on the amino acid and carbohydrate patterns of *Phragmites australis*. *Limonologica* **34**, 37-47.
- Koppitz, H., Dewender, M., Ostendorp, W. & Schmieder, K. (2004): Amino acids as indicators of physiological stress in common reed *Phragmites australis* affected by an extreme flood. *Aquatic Botany* **79** (4), 277-294.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F. & Nagy, E. (2003): Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential (Review). *Food Technol. Biotechnol.* **41** (1), 37-42.
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R. D., Kuyper, T. W. & van Breemen, N. (2001): Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 248-254.
- Latch, G. C. M., Christensen, M. J. & Samuels, G. J. (1984): Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. *Mycotaxon* **20** (2), 535-550.
- Latch, G. C. M. & Christensen, M. J. (1985): Artificial infection of grasses with endophytes. *Annals of Applied Biology* **107**, 17-24.
- Latch, G. C. M., Hunt, W. F. & Musgrave, D. R. (1985): Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **28**, 165-168.
- Leuchtmann, A. (1984): Über *Phaeosphaeria* MIYAKE und andere bitunicate Ascomyceten mit mehrfach querseptierten Ascosporen. *Sydowia* **37**, 75-194.
- Leuchtmann, A. (1985): Kulturversuche mit einigen Arten der Gattung *Lophiostoma* Ces. & de Not. *Sydowia, Annales Mycologici Ser. II.* **38**, 158-170.
- Leuchtmann, A. & Clay, K. (1997): The population biology of grass endophytes. In: Carroll, G. C. & Tudzynski, P. (Hrsg.): *The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. V. Plant relationships, Teil A*, 185-202.
- Leuchtmann, A. & Schardl, C. L. (1998): Mating compatibility and phylogenetic relationships among two new species of *Epichloë* and other congeneric European species. *Mycological Research* **102** (10), 1169-1182.
- Lewis, F. J. (1924): An endotrophic fungus in the Coniferae. *Nature* **114**, 860.

- Lewis, G. C., Ravel, C., Naffaa, W., Astier, C. & 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. *Annals of Applied Biology* **130**, 227-238.
- Luther, H. (1950): Beobachtungen über die fruktifikative Vermehrung von *Phragmites communis* Trin. *Acta Botanica Fennica* **46**, 1-18.
- Majewska-Sawka, A. & Nakashima, H. (2004): Endophyte transmission via seeds of *Lolium perenne* L.: immunodetection of fungal antigens. *Fungal Genetics and Biology* **41**, 534-541.
- Malinowski, D., Leuchtman, A., Schmidt, D. & Nösberger, J. (1997a): Growth and water status in meadow fescue is affected by *Neotyphodium* and *Phialophora* species endophytes. *Agronomy Journal* **89**, 673-678.
- Malinowski, D., Leuchtman, A., Schmidt, D. & Nösberger, J. (1997b): Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* endophyte may increase the competitive ability of meadow fescue. *Agronomy Journal* **89**, 833-839.
- Malinowski, D. P. & Belesky, D. P. (1999): *Neotyphodium coenophialum*-endophyte infection affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus. *Journal of Plant Nutrition* **22** (4 & 5), 835-853.
- Malinowski, D. P., Alloush, G. A. & Belesky, D. P. (2000): Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. *Plant Soil* **227**, 115-126.
- Malinowski, D. P. & Belesky, D. P. (2000): Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance (Review). *Crop Science* **40** (4), 923-940.
- Marks, S. & Clay, K. (1996): Physiological responses of *Festuca arundinacea* to fungal endophyte infection. *New Phytologist* **133**, 727-733.
- Matthews, J. & Clay, K. (2001): Influence of fungal endophyte infection on plant-soil feedback and community interactions. *Ecology* **82** (2), 500-509.
- Mauchamp, A., Blanch, S. & Grillas, P. (2001): Effects of submergence on the growth of *Phragmites australis* seedlings. *Aquatic Botany* **69**, 147-164.
- Mauchamp, A. & Mésleard, F. (2001): Salt tolerance in *Phragmites australis* populations from coastal Mediterranean marshes. *Aquatic Botany* **70**, 39-52.
- Meharg, A. A. & Killham, K. (1995): Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of micro-organisms. *Plant and Soil* **170**, 345-349.
- Miles, C. O., di Menna, M. E., Jacobs, S. W. L., Garthwaite, I., Lane, G. A., Prestidge, R. A., Marshall, S. L., Wilkinson, H. H., Schardl, C. L., Ball, O. J.-P. & Latch, G. C. M. (1998): Endophytic fungi in indigenous australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (2), 601-606.
- Minchinton, T. E. (2002): Precipitation during El Niño correlates with increasing spread of *Phragmites australis* in New England, USA, coastal marshes. *Marine Ecology Progress Series* **242**, 305-309.

- Mönninghoff, H. (1987): Naturnahe Abwasserreinigung. Energie- und Umweltzentrum am Deister e.V., Ökobuch, Freiburg.
- Moon, C. D., Craven, K. D., Leuchtmann, A., Clement, S. L. & Schardl, C. L. (2004): Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses. *Molecular Ecology* **13**, 1455-1467.
- Murrin, F., Holtby, J., Nolan, R. A. & Davidson, W. S. (1986): The genome of *Entomophaga aulicae* (Entomophorales, Zygomycetes): Base composition and size. *Experimental Mycology* **10**, 67-75.
- Nestler, A. (1898): Über einen in der Frucht von *Lolium temulentum* L. vorkommenden Pilz. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **16**, 207-214.
- Neubert, K., Mendgen, K., Brinkmann, H. & Wirsal, S. G. R.: Only few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with common reed. Manuskript eingereicht bei *Applied and Environmental Microbiology*.
- Newsham, K. K. (1999): *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*. *New Phytologist* **144**, 517-524.
- Nirenberg, H. (1976): Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Berlin Dahlem* **169**, 1-117.
- Omacini, M., Chaneton, E. J., Ghersa, C. M. & Müller, C. B. (2001): Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature (London)* **409** (6816), 78-81.
- Ostendorp, W. (1989): "Die-back" of reeds in Europe - a critical review of literature. *Aquatic Botany* **35**, 5-26.
- Ostendorp, W. (1990): Die Ursachen des Röhrichrückganges am Bodensee-Untersee. *Carolina* **48**, 85-102.
- Ostendorp, W. (1991): Zur Geschichte der Uferröhrichte des Bodensee-Untersees. *Schriften des Vereins für Geschichte des Bodensees und seiner Umgebung* **109**, 215-233.
- Ostendorp, W. (1993): Schilf als Lebensraum. *Beihefte zu den Veröffentlichungen für Naturschutz und Landschaftspflege in Baden-Württemberg* **68**, 173-280.
- Papavizas, G. C. (1985): *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* **23**, 23-54.
- Parry, D. W., Jenkinson, P. & McLeod, L. (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology* **44**, 207-238.
- Peláez, F., Collado, J., Arenal, F., Basilio, A., Cabello, A., Díez Matas, M. T., García, J. B., González del Val, A., González, A., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Martín, I., Platas, G. & Vicente, F. (1998): Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research* **102** (6), 755-761.

- Petrini, O. (1986): Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema, N. J. & van den Heuvel, J. (Hrsg.): *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, 175-187.
- Petrini, O. (1991): Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J. H. & Hirano, S. S. (Hrsg.): *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York, 179-197.
- Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L. & Viret, O. (1992): Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* **1**, 185-196.
- Petrini, O. (1996): Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi. In: Redlin, S. C. & Carris, L. M. (Hrsg.): *Endophytic fungi in grasses and woody plants. Systematics, ecology and evolution*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 87-100.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D. & Bufton, A. W. J. (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* **5**, 141-238.
- Rao, P. S. & Niederpruem, D. J. (1969): Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (sensu Buller). *J. Bacteriol.* **100**, 1222-1228.
- Ravel, C., Michalakakis, Y. & Charmet, G. (1997): The effect of imperfect transmission on the frequency of mutualistic seed-borne endophytes in natural populations of grasses. *Oikos* **80** (1), 18-24.
- Rayner, A. D. M. & Webber, J. F. (1984): Interspecific mycelial interactions - an overview. In: Jennings, D. H. & Rayner, A. D. M. (Hrsg.): *The ecology and physiology of the fungal mycelium*. Cambridge University Press, Cambridge, 383-417.
- Redman, R. S., Ranson, J. C. & Rodriguez, R. J. (1999): Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12** (11), 969-975.
- Redman, R. S., Dunigan, D. D. & Rodriguez, R. J. (2001): Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* **151**, 705-716.
- Riesen, T. K. (1985): Endophytic fungi in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). A comparison between four wheat cultivars with different resistance to *Phaeosphaeria nodorum* (Müller) Hedjaroude. Dissertation, ETH Zürich, **No. 7689**. Zürich.
- Robinson, C. H., Dighton, J. & Frankland, J. C. (1993): Resource capture by interacting fungal colonizers of straw. *Mycological Research* **97** (5), 547-558.
- Rodewald-Rudescu, L. (Hrsg., 1974): Das Schilfrohr *Phragmites communis* Trinius. In: Elster, H.-J. & Ohle, W. (Hrsg.): *Die Binnengewässer. Einzeldarstellungen aus der Limnologie und ihren Nachbargebieten, XXVII*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart.
- Rodrigues Costa Pinto, L. S., Azevedo, J. L., Pereira, J. O., Vieira, M. L. C. & Labate, C. A. (2000): Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. *New Phytologist* **147**, 609-615.
- Rodrigues, K. F. & Samuels, G. J. (1990): Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research* **94** (6), 827-830.

- Rolston, M. P., Stewart, A. V., Latch, G. C. M. & Hume, D. E. (2002): Endophytes in New Zealand grass seeds: occurrence and implications for conservation of grass species. *New Zealand Journal of Botany* **40**, 365-372.
- Rood, S. B., Larsen, K. M., Mander, L. N., Abe, H. & Pharis, R. P. (1986): Identification of endogenous gibberellins from *Sorghum*. *Plant Physiology* **82**, 330-332.
- Rood, S. B., Kaufman, P. B., Abe, H. & Pharis, R. P. (1987): Gibberellins and gravitropism in maize shoots: Endogenous gibberellin-like substances and movement and metabolism of [³H]gibberellin A₂₀. *Plant Physiology* **83**, 645-651.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M. & Sullivan, T. J. (1998): Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 319-343.
- Saikkonen, K., Ahlholm, J., Helander, M., Lehtimäki, S. & Niemeläinen, O. (2000): Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. *Ecography* **23** (3), 360-366.
- Saikkonen, K., Ion, D. & Gyllenberg, M. (2002): The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society of London/ B* **269**, 1397-1403.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M. & Faeth, S. H. (2004): Evolution of endophyte-plant symbioses (Opinion). *Trends in Plant Science* **9** (6), 275-280.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001): *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3. Auflage, Band 1, Kapitel 5. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nickler, S. & Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **74**, 5463-5467.
- Sanger, F. (1981): Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**, 1205-1210.
- Schardl, C. L. & Clay, K. (1997): Evolution of mutualistic endophytes from plant pathogens. In: Carroll, G. C. & Tudzynski, P. (Hrsg.): *The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. V. Plant relationships, Teil B, 221-238.
- Schardl, C. L. & Phillips, T. D. (1997): Protective grass endophytes. Where are they from and where are they going? *Plant Disease* **81** (5), 430-438.
- Schardl, C. L. (2001): *Epichloë festucae* and related mutualistic symbionts of grasses (Review). *Fungal Genetics and Biology* **33**, 69-82.
- Schardl, C. L., Leuchtman, A. & Spiering, M. J. (2004): Symbioses of grasses with seed-borne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 315-340.

- Schlösser, E. (1997): Allgemeine Phytopathologie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schmidt, D. (1991): Les endophytes de la fétuque des prés. *Revue suisse d'agriculture* **23** (6), 369-375.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K. & Krohn, K. (2002): Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites (Review). *Mycological Research* **106** (9), 996-1004.
- Schübler, A., Schwarzott, D. & Walker, C. (2001): A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105** (12), 1413-1421.
- Sharma, S., Madan, M. & Vasudevan, P. (1997): Biology and applications of mycorrhizal fungi (Minireview). *Microbiología SEM* **13**, 427-436.
- Shaw, D. S. (1991): Genetics. In: Ingram, D. S. & Williams, P. H. (Hrsg.): Advances in plant pathology. Volume 7: *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press, London, 131-170.
- Shoemaker, R. A. & Babcock, C. E. (1989): Phaeosphaeria. *Canadian Journal of Botany* **67**, 1500-1599.
- Sieber, T., Riesen, T. K., Müller, E. & Fried, P. M. (1988): Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ. = *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *J. Phytopathology* **122**, 289-306.
- Sieber, T. N. (1985): Endophytische Pilze von Winterweizen (*Triticum vulgare* Vill.). Ein Vergleich zwischen Weizen aus gebeiztem und solchem aus ungebeiztem Saatgut. Dissertation, ETH Zürich, No. 7725. Zürich.
- Sieber, T. N. (2002): Fungal root endophytes. In: Waisel, Y., Eshel, A. & Kafkafi, U. (Hrsg.): Plant Roots. The hidden half. Marcel Dekker, New York - Basel, 887-917.
- Siegel, M. R., Johnson, M. C., Varney, D. R., Nesmith, W. C., Buckner, R. C., Bush, L. P., Burrus II, P. B., Jones, T. A. & Boling, J. A. (1984): A fungal endophyte in tall fescue: Incidence and dissemination. *Phytopathology* **74** (8), 932-937.
- Siegel, M. R., Schardl, C. L. & Phillips, T. D. (1995): Incidence and compatibility of non-clavicipitaceous fungal endophytes in *Festuca* and *Lolium* grass species. *Mycologia* **87** (2), 196-202.
- Simpson, D. R., Thomsett, M. A. & Nicholson, P. (2004): Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and in vitro. *Environmental Microbiology* **6** (1), 79-87.
- Singer, S. & Berg, P. (1992): Gene und Genome. Aus dem Amerikanischen übersetzt von I. Haüßer-Siller, D. Horn, I. Raschke und S. Vogel. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin - New York.
- Singh, A., Singh, A., Kumari, M., Rai, M. K. & Varma, A. (2003): Biotechnological importance of *Piriformospora indica* Verma et al. - A novel symbiotic mycorrhiza-like fungus: An overview. *Indian Journal of Biotechnology* **2** (1), 65-75.

- Stahman, K.-P. (2002): Vitamins. In: Osiewacz, H. D. (Hrsg.): *The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. X. Industrial Applications*, 231-246.
- Stone, J. K., Bacon, C. W. & White Jr., J. F. (2000): An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. In: Bacon, C. W. & White Jr., J. F. (Hrsg.): *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 3-29.
- Strobel, G. & Daisy, B. (2003): Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67** (4), 491-502.
- Strobel, G. A. & Long, D. M. (1998): Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *ASM News (American Society for Microbiology)* **64** (5), 263-268.
- Sturrock, C., Ritz, K., Samson, W. B., Bown, J. L., Staines, H. J., Palfreyman, J. W., Crawford, J. W. & White, N. A. (2002): The effects of fungal inoculum arrangement (scale and context) on emergent community development in an agar model system. *FEMS Microbiology Ecology* **39**, 9-16.
- Sullivan, T. J. & Faeth, S. H. (2004): Gene flow in the endophyte *Neotyphodium* and implications for coevolution with *Festuca arizonica*. *Molecular Ecology* **13**, 649-656.
- Swofford, D. L. (2000): PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- Taligoola, H. K., Apinis, A. E. & Chesters, C. G. C. (1975): Microfungi colonizing the inflorescence of *Phragmites communis* Trin. *Nova Hedwigia: Zeitschrift für Kryptogamenkunde* **26**, 483-494.
- Tan, Y. Y., Spiering, M. J., Scott, V., Lane, G. A., Christensen, M. J. & Schmid, J. (2001): *In planta* regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (12), 5377-5383.
- Taylor, J. E., Hyde, K. D. & Jones, E. B. G. (1999): Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist* **142** (2), 335-346.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997): The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25** (24), 4876-4882.
- Thormann, M. N., Currah, R. S. & Bayley, S. E. (1999): The mycorrhizal status of the dominant vegetation along a peatland gradient in southern boreal Alberta, Canada. *Wetlands* **19** (2), 438-450.
- Tsai, H.-F., Liu, J.-S., Staben, C., Christensen, M. J., Latch, G. C. M., Siegel, M. R. & Schardl, C. L. (1994): Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **91** (7), 2542-2546.
- Tudzynski, B. & Sharon, A. (2002): Biosynthesis, biological role and application of fungal phytohormones. In: Osiewacz, H. D. (Hrsg.): *The Mycota. A comprehensive treatise*

- on fungi as experimental systems for basic and applied research. X. Industrial Applications, 183-212.
- Vajna, L. (2003): Hyperparasitic *Stagonospora* sp. on *Botryosphaeria stevensii*. *Forest Pathology* **33** (6), 375-382.
- Varma, A., Savita, V., Sudha, Sahay, N., Bütchorn, B. & Franken, P. (1999): *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (6), 2741-2744.
- Viaud, M., Pasquier, A. & Brygoo, Y. (2000): Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological Research* **104** (9), 1027-1032.
- Vilgalys, R. (2003): Taxonomic misidentification in public DNA databases (Commentary). *New Phytologist* **160** (1), 4-5.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10** (4), 506-513.
- Wennström, A. (1994): Endophyte: the misuse of an old term. *Oikos* **71**, 535-536.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (Hrsg.): PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, New York, NY, USA, 315-322.
- Wilson, D. (1995): Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73** (2), 274-276.
- Wirsel, S. G. R., Leibinger, W., Ernst, M. & Mendgen, K. (2001): Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytologist* **149** (3), 589-598.
- Wirsel, S. G. R., Runge-Froböse, C., Ahren, D. G., Kemen, E., Oliver, R. P. & Mendgen, K. W. (2002): Four or more species of *Cladosporium* sympatrically colonize *Phragmites australis*. *Fungal Genetics and Biology* **35** (2), 99-113.
- Wirsel, S. G. R. (2004): Homogenous stands of a wetland grass harbour diverse consortia of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* **48** (2), 129-138.
- Yue, Q., Johnson-Cicalese, J., Gianfagna, T. J. & Meyer, W. A. (2000): Alkaloid production and chinch bug resistance in endophyte-inoculated chewings and strong creeping red fescues. *Journal of Chemical Ecology* **26** (1), 279-292.
- Yuen, T. K., Hyde, K. D. & Hodgkiss, I. J. (1999): Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microbial Ecology* **37**, 257-262.