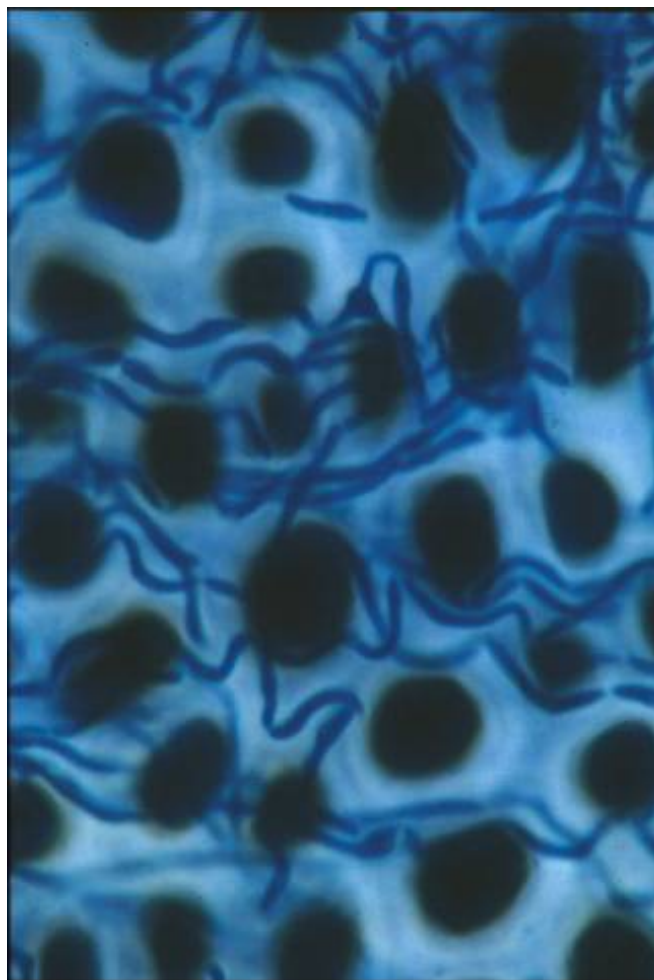


# Endofytter i rajgræs og svingel



Udarbejdet af:  
Mads Brandt  
JP03

Vejlby Landbrugsskole  
Tretommervej 31  
8240 Risskov

Afleveret 06-06-2005

# Forord

Formålet med denne opgave har været at vurdere på overlevelse og effekt af endofytter under danske forhold. Da der kun er begrænset materiale til rådighed omkring dette emne, har jeg søgt bidrag hos personer, der beskæftiger sig med dette emne i hverdagen. Jeg vil i den forbindelse derfor gerne rette en stor tak til:

Anne Mette Dahl Jensen  
Projektforsker  
Danmarks Jordbrugsforskning  
Forskningscenter Flakkebjerg  
Forsøgsvej 1  
4200 Slagelse  
Tlf: 8999 3677

Niels Roulund  
Plantbreeder Ph. D.  
DLF-Trifolium Danish Plantbreeding  
Højerupvej 31  
P. Box 19  
DK-4660 Store Heddinge  
Denmark  
tlf: 5650 3023

Torben Kastrup Petersen  
Miljøkonsulent,  
Dansk Golf Union  
Idrættens hus  
Brøndby stadion 20  
DK-2606 Brøndby  
Tlf: 43 26 2709

# Resumé

Denne opgave omhandler endofytters gode og dårlige egenskaber, hvorvidt disse kan opretholdes, og om de kommer til udtryk under danske forhold. Opgaven bygger på litteraturstudium, analyser af udenlandske og danske forsøg samt personlige kommentarer fra fagfolk.

Opgaven er opdelt i afsnit omhandlende: Teori omkring endofytter, fordele og ulemper ved deres tilstedeværelse i værtsplanten, forekomsten af endofytter i Danmark og relevansen af deres egenskaber under danske forhold.

Det konkluderes at endofytter har en række selektionsfremmende fordele for værtsplanten. Hvorvidt disse er til gavn for forbrugeren afhænger af hvad græsset benyttes til.

Det konkluderes ligeledes, at endofytter findes i højere grad end antaget i den danske flora og at infektionsraten godt kan holdes under danske forhold, hvis der holdes fokus på opbevaring og håndtering af inficerede frø.

# Indholdsfortegnelse

1	Indledning .....	1
2	Endofytter.....	3
2.1	Taxanomi .....	3
2.2	Effekt på værtsplanten .....	4
2.3	Bibeholdelse af endofytten i frøet.....	4
2.4	Forsøg med effekt på værtsplanten .....	5
2.4.1	Vurdering af forsøget.....	5
3	Fordele og ulemper ved tilstedeværelse af endofytter i græs.....	7
3.1	Insektresistens .....	8
3.1.1	Forsøg med insektresistens .....	8
3.1.2	Vurdering af forsøget.....	11
3.1.3	Europæiske forsøg med insektresistens .....	11
3.2	Resistens overfor herbivorer .....	12
3.3	Forgiftningsfarer .....	12
3.3.1	Lolitrem B .....	12
3.3.2	Ergovalin.....	12
3.4	Endofytters effekt over for skadevoldere.....	14
3.5	Non toksisk græs.....	15
4	Endofytter i Danmark.....	17
4.1	Produktion af endofytficeret rajgræs i Danmark .....	18
4.1.1	Indhold af Lolitrem B .....	19
5	Relevans af endofytter i Danmark .....	22
5.1	Lovmæssige forhold.....	22
5.2	Udvikling af robuste plænegræsser til golf og boldbaner .....	22
5.3	Perspektiver for frøfirmaet ved endofyt indhold i græsset .....	23
	Konklusion.....	1
6	Litteratur.....	2

# 1 Indledning

Dyrkning af endofytinficeret græs kan blive en oplagt mulighed for de danske frøavlere. Græs med svampe endofytter er allerede en efterspurgt vare hos mange af de lande vi leverer til og hvis ikke vi er med helt fremme på dette område, både hvad angår produktion og forskning, risikerer vi at blive hægtet af, med stor eksportnedgang til følge.

En vurdering udført på baggrund af et forskningsprojekt udført af DLF-Trifolium (DLF), Den Kongelige Veterinær og Landbohøjskole (KVL), Danmarks Jordbrugsforskning (DJF) og Danmarks Golf Union (DGU), har vist at der er potentiale for en udvidelse af det internationale frømarked med ca. 100.000 tons. Dette anslås til at betyde en udvidelse af det areal i Danmark hvorpå der dyrkes græsfrø med ca. 5-10.000 ha, hvis vi kan sætte os på 10 % af denne produktion. Denne udvidelse skyldes, at der fra mange sider er en stigende interesse for at dyrke frøgræs med endofytter, da de er en kvalitetsparameter i græsset. Desuden er der et marked for afsætning af græsfrø med endofytter, især det amerikanske, da endofytten kan påføre græsset nogle fordelagtige egenskaber.

En aftale indgået mellem kommunernes landsforening og miljø- og energiministeriet, der har til formål at sørge for at alt brug af plantebeskyttelsesmidler på offentlige arealer afvikles inden 1. januar 2003, har bevirket, at man må lede efter nye måder hvorpå f. eks. græsarealer kan vedligeholdes. Dette åbner muligheder for at endofytinficeret græs kunne være en oplagt mulighed til at erstatte de traditionelle græstyper, da de kan påføre græsset nogle fordele. De offentlige arealer med græs dækker over ca. 30.000 ha, hvilket vil sige 40 % af de danske golfbaner, ca. 6000 fodboldbaner og 20.000 ha parker og så videre. I aftalen er der i øvrigt også lagt op til, på sigt, at privatejede arealer der ikke dyrkes landbrugsmæssigt, også skal være pesticidfrie. Dette inkluderer de sidste 60 % golfbaner.

Endofytinficeret græs har i forsøg vist potentiale for en række egenskaber der kan være med til at gøre det nemmere at opfylde kravene i denne aftale

- **Ukrudtsbekæmpelse:** Da plante og svamp lever i et symbioseforhold hvor planten bl.a. forsynes med vand og beskyttes mod insekter og andre patogener svampe, må der ligge en hel klar konkurrencemæssig fordel frem for ukrudtet.
- **Insektresistens:** Insektresistensen er betinget af, at der i forbindelse med svampens ophold i planten udskilles sekundære metabolitter der enten virker toksiske eller repellerende over for insekterne. Dette er der dog talrige forsøg der beviser. Således er det på New Zealand og i Australien en forudsætning at rajgræs er endofytinficeret hvis det skal kunne modstå angreb af den argentinske snudebille.
- **Danske undersøgelser** har vist at græsset bliver mere slidstærkt.
- **Persistens:** Foreløbige undersøgelser har vist at, svampens tilstedeværelse har en positiv effekt på fotosyntesen i planten, hvilket blandt andet kommer til udtryk i indlejringen af kulhydrater, der er med til at forbedre græssernes vinterfæstethed.
- **Tørkeresistens:** Tilstedeværelsen af endofytterne har også den effekt at planterne bliver mindre modtagelige overfor tørkestress, i det svampen har en god vandholdende evne. I Australien og USA er endofytter en forudsætning for at rajgræs kan overleve de lange tørre somre.

Desværre har de gode egenskaber man opnår i endofytinficeret græs også en uheldig sidegevinst. Blandt de toksiner der udskilles fra svampen, har især to af dem (ergovalin og lolitrem B) en særdeles uheldig virkning på dyr hvis de indtages i for store mængder. Indtagelse af disse kan medføre produktionsnedgang, nedsat tilvækst og reproduktionsproblemer. Derfor er der stor værdi i at få

fremstillet lav-toksinholdige endofytgræsser der kan bruges til foder. Dette er især vigtigt for at sikre vores eksport af fodergræsfrø hvor DLF Trifolium i øjeblikket sidder på 30 % af det europæiske marked.

***Jeg vil i denne opgave evaluere hvor god effekt endofytterne har. Kan der opnås egenskaber, der giver planten selektionsfordele i form af reduceret tørkestress, forstærket vinterfasthed, øget plantefitness og beskyttelse mod insekter? I så fald, vil endofytternes egenskaber da kunne udnyttes og opretholdes under danske forhold og er der interesse fra aftagere til et sådant produkt?***

Opgaven henvender sig først og fremmest til fagfæller, men er også rettet mod landmænd og private forbrugere af græsfrø, med interesse for symbioseforholdet mellem endofytter og græs. Målet er at give et nuanceret billede af de fordele og ulemper der ligger i at dyrke endofytinficeret græs. Der er i opgaven først og fremmest fokuseret på rajgræs og svingel, da udenlandske forsøg herom, i et vist omfang, må vurderes at kunne overføres til danske forhold.

Opgaven bygger på litteraturstudium af forsøg fra udlandet og enkelte danske undersøgelser. Da der kun er begrænset materiale til rådighed omkring endofytters betydning under danske forhold, er der derfor også foretaget interviews med personer, der arbejder med dette emne til hverdag. I den forbindelse har jeg besøgt Danmarks Jordbrugsforskning, Forskningscenter Flakkebjerg for at få et indtryk af, hvordan den danske forskning foregår og hvor langt de er.

## 2 Endofytter

Endofytter er en fællesbetegnelse for svampe, der lever i planter. Svampene kan enten eksistere som enkeltcelle infektioner eller som nogle der vokser systemisk mellem plantens celler. De fleste græsser, både de der dyrkes som landbrugsafgrøder og lignende, samt de der vokser vildt, indeholder svampe af slægten *Neotyphodium* (endofytter). Plante og svamp lever i et symbioseforhold, hvor svampen modtager beskyttelse, næring og hvor planten hjælper svampen med at blive spredt. Til gengæld kan planten opnå resistens mod en række skadedyr og stressfaktorer som eksempelvis tørke og kulde. Svampen lever ved systemisk vækst inde i planten, og planten viser ingen ydre tegn på svampens tilstedeværelse. I modsætning til andre svampe produceres der i vækstsæsonen hverken kønnede eller ukønnede sporer, hvilket betyder, at svampen ikke kan spredes fra plante til plante. Den eneste måde svampen kan spredes på er gennem frøene på værtsplanten, der indeholder mycelium fra svampen. Spredningen foregår ved, at svampehyfer vokser op gennem frøstænglen og ud i frøet, mens dette er under udvikling, og der er ikke nogen synlige tegn på at planten bliver påvirket af dette (Niell, J.C., 1940). Der er dog enkelte undtagelser fra dette, eksempelvis *Balansia*-endofytter i familien *Clavicipitaceae*. Hos denne dannes der et egentligt frugtlegete, sædvanligvis samtidigt med blomstring hos værtsplanten, hvilket ofte vil kunne ses umiddelbart som deformiteter på planten eller blomsterstanden (Clay, K., 1995).

Nyere tids forskning har tydeligt vist, at der er en mutualistisk association mellem en af vores mest kendte plantefamilier, græsserne, og endofyttiske svampe. I modsætning til de mere kendte plante-svampe symbioser, som eksempelvis træer og mycorrhizia, kan disse græsendofyttiske svampe, der optræder intercellulært i blade, stængler og reproduktive organer i græsset, have en meget stor effekt på både den økologiske, fysiologiske og reproduktive biologi hos værtsplanten. Gennem en produktion af toksiske alkaloider, hvoraf flere ikke kan relateres til andre kendte toksiner produceret af planter eller svampe (Schardl, Christopher L., Phillips, Timothy D., 1997), beskytter endofytterne deres værter mod en række insekter samt større herbivorer. Dette har også givet sig til udtryk i den forskning der har været hidtil, der først og fremmest har fokuseret på forgiftning af husdyr ved fodring med græs indeholdende endofytter. Hos flere af de undersøgte endofyttyper er der dog også tegn på, at de producerer, (eller er med til at inducere en produktion) en række andre metabollitter og plantelignene hormoner, inklusiv auxin og cytokinin, der er med til at stimulere plantens vækst (Clay, K., 1990).

Endofytter gror som lange indkapslede hyfer med ganske få forgreninger, gennem de intercellulære rum, langs med midteraksen på blade og stængler (Clay, K., 1995). Den største forekomst af endofytterne findes ved bladbaserne rundt om meristemet. Endofytterne er i stand til at absorbere næringsstoffer fra de tilgængelige materialer der kan findes i det åbne intercellulære rum i planten, og nedbryde disse så de kan udnyttes som energikilder.

### 2.1 Taxanomi

Endofytsvampene er medlem af *Clavicipitaceae* (Ascomycetes). De opdeles sædvanligvis i 5 hovedordener (*Atkinsonella*, *Balansia*, *Balansiopsis*, *Epichlöe* og *Myriogenospora*), indeholdende tilsammen ca. 30 underarter. *Balansia* er den største med i alt 15-20 underarter.

De endofytter der optræder i rajgræs (og muligvis også svingel, Clay, K., 1985), er af underarten *Neotyphodium*. I de senere år er denne endofyt blevet omdøbt til *Neotyphodium*, men den refereres ofte stadig til som *Neotyphodium* i litteraturen, benævnelsen *Neotyphodium* vil dog blive benyttet i denne tekst. Denne endofyt er meget tæt beslægtet med *Balancia*, men undergår i modsætning til denne ikke den perfekte kønnede formering. Hyferne løber intercellulært i værtsplanten, men i

modsatning til *Balansia* produceres der ikke ascosporer ligesom der ikke produceres egentlige frugtleger på værtsplanten.

De fleste af de endofytter man har isoleret hidtil er af Ascomycotina ordenen (sæksporesvampe), som oftest på konidieform, og uden den kønnede formering. Dette kunne indikere at symbioseforholdet mellem endofytter og værtsplanten kan opstartes på forskellige udviklingsstadier hos planten (Clay, K., 1990).

## 2.2 Effekt på værtsplanten

Græsplanter der er inficeret af endofytter adskiller sig ikke på nogen måde fra planter der ikke er. Der er dog en tendens til at inficerede planter udvikler flere blomster og frø end ikke inficerede, hvilket skyldes en større vegetativ kraft, skabt af endofytterne. Rajgræsfrø fra inficerede planter spirer hurtigere end frø fra ikke-inficerede under væksthushold (Clay, K., 1990).

Den mest dramatiske effekt af endofyting kan ses hos græsser inficeret med endofytter af typen *Balansieae*, der danner frugtleger på værtsplanten. Her går endofytten ind og tvinger planten til vegetativ reproduktion, i det, svampens frugtleger indkapsler blomsterdannelsen på et tidligt tidspunkt i udviklingen.

Da græsplanten lever med en heterotrofisk symbiot, hvilket vil sige at den primære energikilde er organisk bundet kulstof, kunne det forventes, at hvis omstændighederne var ens, ville græs uden endofytter have en vækstmæssig fordel frem for endofythyldige græsser. Væksthushold har imidlertid vist at der, i hvert fald uden indflydelse af herbivorer, er en signifikant højere vækstrate hos endofytinginficerede planter i forhold til ikke-inficerede (Clay, K., 1987). Disse forsøg er dog udført på enkeltplanteniveau og det er derfor lidt svært at overføre til markniveau.

Det virker dog usandsynligt at græsserne ville huse disse endofytter under naturlige forhold hvis ikke der var en gavnlige effekt af dem (Clay, K., 1990).

Indholdet af endofytter øges i takt med alderen af permanente græsarealer og slætgræsarealer (eksempelvis rajgræs og svingel) der typisk huser endofytter. Eksempelvis er indholdet af endofytter langt højere i vilde populationer og ældre afgræsningsarealer, frem for kommercielt dyrkede arealer indeholdende samme græstyper i Europa.

## 2.3 Bibeholdelse af endofytten i frøet

Ved opbevaring af græsfrø med endofytter skal man være opmærksom på, at endofytten sætter større krav til korrekt opbevaring. Endofytten dør oftest før spireevnen hos frøet mistes ved forkert opbevaring. Et vandindhold i frøet på mere end 11,5 % og temperaturer over 5° C resulterer i et komplet tab af endofytterne på 2 år (Hare et al., 1990, C. F. Rolston, M. P., år ukendt). Frø fra forældreplanterne og forædlerens frø bør opbevares ved -15° C (Rolston, M. P., år ukendt). Dette faktum er et af problemerne ved at fremavle endofythyldige græsser, i det, det er utroligt vigtigt at mellemhandleren har høj fokus på opbevaringen af frøet, da man ellers mister en andel af endofytterne og dermed ikke længere har den vare man garanterer for.

Udsæd uden endofytter kan altså fremstilles ved tilstrækkelig lang opbevaring af frøene. Moderne landbrugsmetoder og opbevaring af frøene kan altså være en af grundene til at græsser uden endofytter er ligeså udbredt, eller mere, som græs med endofytter i Europa, i hvert fald når det gælder de kommercielt dyrkede sorter. Æld gamle græspopulationer med et naturligt højt niveau af beskyttelse fra endofytter kan derfor højst sandsynligt være ganske velsmagene og næringsfulde uden endofytten, hvilket kunne indikere at nogle arter sandsynligvis kun eksisterer på grund af deres endofytindhold.



## 2.4 Forsøg med effekt på værtsplanten

For at undersøge effekten af endofytter under europæiske forhold er der i 1990 lavet forsøg med rajgræs i Frankrig. Disse blev sat i værk for yderligere, at undersøge engelske forsøg der havde påvist, at der var et udbyttømæssigt potentiale ved tilstedeværelsen af endofytter, men at der dog tilsyneladende samtidig kunne være en skadelig effekt af endofytterne under visse forhold.

Forsøgene blev anlagt som 7 markforsøg placeret i det centrale og nordlige Frankrig, med fire forskellige geografiske oprindelser af de anvendte rajgræstyper (dog stadig indsamlet i Frankrig). Tilsvarende blev samme forsøg udført på et mindre forsøgsareal hvor forholdene var nemmere at kontrollere. Forsøgene blev hver især tildelt 100 kg ha<sup>-1</sup> af henholdsvis N, P og K i det tidlige forår og yderligere tildelt 60 kg ha<sup>-1</sup> efter hvert slæt. I hvert forsøg blev græsserne tildelt en karakter for:

- Modstandsdygtighed mod kronrust det første år
- Forårsvækst i det efterfølgende år
- Sommervækst det efterfølgende år
- Efterårsvækst det efterfølgende år
- Frosttolerance det 2. år
- Forårsvækst det 2. år efter såning

Karaktererne blev givet på en skala fra 1-9, hvor 1= svag og 9= kraftig. Karaktererne for modtageligheden af kronrust og tolerance for frost blev givet ud fra samme skala hvor 1= tolerant og 9= intolerant.

Signifikante forskelle kunne observeres mellem endofytingficerede og ikke-inficerede planter, for 4 af de egenskaber der var vurderet på i 4 ud af de 7 markforsøg. Det var især vækst i foråret og efteråret der viste positiv effekt af infektion, hvorimod der tilsyneladende ikke var nogen større effekt mod kronrust eller påvirkning af væksten i sommeren året efter såning.

I de tilsvarende nedskalerede forsøg var der dog signifikante forskelle og især udbyttet ved første slæt hvert år.

### 2.4.1 Vurdering af forsøget

I alle forsøgsserierne var der signifikante forskelle at finde mellem inficerede og ikke-inficerede græsplanter (Ravel, C., Charmet, G., Balfourier, F., 1995). Inficerede planter havde væsentligt højere karakterer for de forskellige bedømmelser. Derfor blev det vurderet at endofytterne havde en positiv effekt på rajgræsset, og ingen tegn på en skadelig effekt i kontrast til de engelske forsøg.

Da ikke alle de 4 rajgræs typer var repræsenteret på hver af lokaliteterne var det svært at identificere de forhold der især var med til at forbedre rajgræsset, men der var en klar tendens til at det især var i tørkestressramte områder der var effekt.

Generelt blev udbytterne forbedret i de endofytingficerede i første slæt i foråret, men også i sommer og efterårsslættet var der fremgang i forhold til det ikke-inficerede. Tørkeresistens kunne muligvis forklare sommer og efterår, men der var dog ikke erfaringer med vandmangel i forårsmånederne i nogen af de implicerede områder.

Da første slæt i rajgræs typisk tages omkring det tidspunkt hvor græsset er i gang med at sætte skud, kunne der muligvis ligge en forklaring der. Amerikanske forsøg har før indikeret, at der blev produceret flere fertile skud i endofytingficeret strandsvingel (Rice, J. S., et al., 1990, C.F. Clay, K., 1995), så det samme kunne meget vel gælde for rajgræs.

Forøget udbytter i forbindelse med de første slæt, der ofte ensileres, ville være en stor gevinst for landmænd. Samtidig ville forbedret vækst gennem sommermånederne, som følge af bedre mod-

stand mod tørkestress, også være en gevinst i forbindelse med afgræsning. Dette kan dog medføre problemer i forbindelse med giftstoffer (Lolitrem B) der produceres under varme forhold, hvilket man naturligvis bør få undersøgt hvis man påtænker afgræsning.

Fra resultaterne af dette forsøg kan det konkluderes at endofytinficeret rajgræs vil have en fordel frem for ikke-inficeret under stressende forhold. Rajgræs produktionen i Europa udføres dog sjældent under specielt stressende forhold.

I områder hvor der ikke er nogen stressfaktorer der kan påvirke græsset har endofytinficeret græs muligvis ikke nogen selektionsfordel frem for ikke-inficeret, hvilket kunne forklare hvorfor der i Europa er en lige så stor mængde ikke-inficeret græs i naturlige afgræsningsarealer.

### 3 Fordele og ulemper ved tilstedeværelse af endofytter i græs

Der er en række fordele og ulemper forbundet med tilstedeværelsen af endofytter i græs. I 2000 er der således blevet foretaget en række analyser på alm. rajgræs inficeret med endofytter af typen *Neotyphodium lolii*, på Forskningscenter Flakkebjerg (DJF), med fokus på kvælstofudnyttelsen, fotosyntesen og de udbyttedannende komponenter. Testmaterialet bestod af klonede rajgræs planter, hvoraf halvdelen blev behandlet med et svampedræbende middel for, med ens materiale som udgangspunkt, at vise reaktioner på en given behandling. Formålet med disse undersøgelser var at undersøge om erfaringer med forøget udbyttepotentiale, gjort i USA med endofytingficeret strandsvingel, umiddelbart kunne overføres til danske forhold. Disse udbyttepotentialer kommer bl.a. til udtryk ved:

- En større biomasseproduktion
- Bedre genvækst
- Større rodareal
- Flere frø pr. plante og blomsterstand
- Højere spiringsprocent ved inficerede frø
- Bedre vækst under stressede forhold

Om endofytterne kan give udslag i ovennævnte forhold afhænger i høj grad af genotypeforholdene mellem plante og svamp. Således er der stor forskel på forskellige græsplanters opførsel selvom de er inficeret med den samme endofytttype. Det er dog ikke før undersøgt om disse egenskaber kan opnås under danske klima- og dyrkningsforhold og hvorvidt de vil give ændringer i græsserne udbytter og karaktertræk.

Foreløbige resultater i denne forsøgsserie har vist, at der i de dyrkede danske plantegenotyper, er forskel i udførelsen af fotosyntese blandt inficerede og ikke-inficerede planter under væksthushold. Dette kan umiddelbart aflæses ved målinger af fotosyntesen, og giver potentiale for større biomasse produktion ved reducerede kvælstoftilførsler.

Da der den senere tid er opstået stadig strengere krav til udnyttelse af kvælstof, og restriktioner på pesticidanvendelser, er det oplagt at få undersøgt disse egenskaber meget nøje, og om muligt få dem implementeret på bedst mulig vis.

Der blev i forsøgsserien benyttet to sorter rajgræs, Delaware og Achiever, og disse blev begge udsat for forskellige mængder kvælstof: uden, normalt niveau og højt tilførselsniveau.

Ved dyrkningsforhold der simulerede ingen eller normalt kvælstoftilførselsniveau var der en signifikant forskel i fotosynteseproduktionen hos de endofytingficerede genotyper af Achiver frem for de ikke-inficerede, mens der ikke var nogen synlig effekt hos de endofytingficerede Delaware græsser. Ved den høje kvælstoftilførsel var det dog det modsatte billede der var tilfældet (Jensen A. M. D., Deleuran, L. C., 2001)

Af andre egenskaber der giver endofytingficeret græs en fordel kan blandt andet nævnes insektresistens og muligvis også en effekt over for andre nogle svampe. Der er dog desværre ikke lavet forsøg af denne type i Danmark endnu.

### 3.1 Insektresistens

Insektresistensen opstår fordi der ved, svampens tilstedeværelse i planten danner nogle sekundære metabolitter, der kan virke enten repellerende eller direkte toksiske overfor insekter (lolin, peramin og til dels også ergovalin). Endofyтинficeret græs indeholder en række alkaloider der ikke findes i de ikke-inficerede tilsvarende græsser. Udover peramin og lolin findes der også ergot alkaloider og lolitrem (Dahlman, D. L., Eichenseer, H., Siegel, M. R. 1990 C. F. Clay, K., 1995). Mængden af disse giftstoffer varierer indenfor både værtsplanten, dele af planten (løvblade, blomsterstanden osv.), forskellige aldersstadier indenfor samme del af planten, perioder af vækstsæsonen og afhængig af gødningstildelinger og afgræsningsperioder i løbet af vækstsæsonen (Bacon, C. W., Lyons, P. C., Porter, J. K., Robbins, J. D, 1986 C. F. Clay, K., 1990. Jensen, A. M. D., 2004 ). I strandsvingel har undersøgelser vist at koncentrationen af alkaloider er højst i frøene, hvilket kunne betyde at endofytternes rolle i denne symbiose er beskyttelse mod prædation af frøene (Cheplick, G. P., Clay, K., 1988). I disse undersøgelser har det også vist sig at koncentrationen af alkaloider generelt er højere i de yngre dele af plant, hvilket korrelerer med at koncentrationen af endofythyfer er højst i disse dele, hvor den ernæringsmæssige værdi for endofytten også er højst (Hardy, T. N., Clay, K., Hammond., A. M. Jr., 1986).

Nyere studier viser at endofytterne også kan have en gavnlig effekt overfor angreb af nematoder (Clay K, 1988).

#### 3.1.1 Forsøg med insektresistens

I et forsøg på at vise effekten af endofytter mod insekter er der ved Louisiana State University, USA blevet lavet forsøg med udviklingen af *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm), og hvorvidt denne planteæder påvirkes ved indhold af endofytter i føden. I forsøget blev der benyttet strandsvingel og alm. rajgræs, hvor det blev vurderet at endofyttypen der findes i rajgræs, og sædvanligvis henvises til som "Lolium endofyt", er næsten ens, eller muligvis identisk med den der findes i strandsvingel (Clay, K., 1985). Disse to græsser blev sammenlignet med tre andre typer græsser der kan forefindes i det centrale USA, nemlig *Stipa leucotricha* (Texas vintergrass), *Cenchrus echinatus* (Dalissgrass) og *Paspalum dilatatum* (sandbur). Disse er henholdsvis naturligt inficeret med endofytter af typen *Atkinsonella*, *Balancia* og *myriogenospora*. I modsætning til endofytterne hos rajgræs og strandsvingel undergår endofytterne i disse græsser kønnet formering hvor der produceres både konidier og ascosporer fra frugtlegermer. Dette fører ofte til at individer i disse græstyper er sterile. Hvordan disse planter bliver inficeret er ukendt, men infektionen opstår muligvis når konidier spirer på græsstigmaet og gennemtrænger ovulen på samme måde som det foregår med pollen (Clay, K., 1988).

Frø fra alm. rajgræs fra både inficerede og ikke-inficerede voksne planter blev indkøbt fra et komercielt frøfirma. Fra strandsvingel blev de indhentet fra Fescue Diagnostic Center, Auburn University. De andre græsser, både inficerede og ikke-inficerede, blev indsamlet fra naturlige populationer i Texas og Louisiana. Alle planter blev efterfølgende dyrket i væksthuse, hvor de blev vandet og gødet jævnlige. Der blev på intet tidspunkt benyttet insekticider. Tilsvarende blev der sået frø af rajgræs og svingel ud på et udendørs område.

Herefter blev der opsat 6 fodringsforsøg hvor der blev benyttet rajgræs og strandsvingel fra det udendørs område og rajgræs, Texas vintergrass, dalissgrass og sandbur fra væksthuset. Selve fodringsforsøgene forgik på laboratoriebasis over en 9 måneders periode, hvor der blev benyttet flere separate generationer af fall armyworm, hvorfor der ikke umiddelbart kan sammenlignes i forsøgene med statistisk sikkerhed.

Der blev benyttet 200 larver til hvert fodringsforsøg; 100 blev fodret med inficeret materiale og 100 blev fodret med ikke-inficeret materiale. Larverne blev fodret ad libitum og ikke ædt materiale blev fjernet løbende. Dødeligheden blandt larverne blev registreret for hver gang der blev tilført nye blade. Alle larver blev vejjet på den 8. dag af forsøgsrækken og igen en eller to gange yderligere afhængig af vækstraten under forsøget. Ligeledes blev det registreret når larverne forpuppede sig og disse pupper blev vejjet når de var en dag gamle. Ydermere blev det registreret hvor længe der gik fra forpupningen til de voksne møl klækkedes. Derved kunne der også måles på forskellen i overlevelse i forpupningsperioden blandt larver fodret med henholdsvis inficeret og ikke-inficeret materiale.

Resultaterne viste, at larver fodret med inficeret materiale generelt udviste lavere overlevelseshastighed, nedsat vægtforøgelse og forlængelse af perioden inden forpupningsstadiet, end larver fodret med ikke-inficeret materiale fra alle 5 typer græsser.

De indsamlede data gav indtryk af at der var forskelle i den næringsmæssige værdi af de forskellige græsser, men da der blev benyttet flere generationer af larver blev der ikke analyseret direkte på dette aspekt, men hvert forsøg blev i stedet betragtet som et individuelt forsøg.

Det første forsøg blev udført med rajgræs dyrket i væksthuse. Vægten af 8 dage gamle larver fodret med ikke-inficeret materiale var mere end dobbelt så høj som larver fodret med inficeret materiale (se Tabel 1).

	Inficeret	Ikke-inficeret
Larvevægt dag 8	88,43 ± 3,64	186,74 ± 4,53
Dage inden forpupning	13,90 ± 0,07	12,45 ± 0,06
Larveoverlevelse	84 %	96 %
Puppevægt	166,40 ± 1,82	183,67 ± 1,37

**Tabel 1: Udviklingen hos fall armyworm. Larver fodret med alm.rajgræs dyrket i væksthuse, inficeret og ikke-inficeret med endofytter af Lolium typen. Alle tal er i milligram og afvigelser er vist som ±. (uddrag af tabel af Clay, K. et al., 1985).**

Larver anbragt på inficerede blade var ca. 1,5 dage længere om at forpuppe sig sammenlignet med ikke-inficerede og vægten på pupperne var ca. 20 mg lavere end hos de ikke-inficerede. Alt i alt var overlevelsen frem til forpupning 12 % lavere hos de larver der var fodret med inficeret materiale.

Det andet forsøg blev udført med rajgræs indsamlet fra de udendørs områder og larverne blev fulgt helt frem til klækning af pupperne. Generelt set var resultatet det samme som første forsøg; larver fodret med inficeret materiale vejede kun ca. 60 % af vægten på larver fodret med ikke-inficeret materiale (se Tabel 2).

	Inficeret	Ikke-inficeret
Larvewægt dag 8	3,30 ± 0,33	6,36 ± 0,34
Larvewægt dag 12	73,76 ± 4,45	125,42 ± 3,22
Dage inden forpupning	20,57 ± 0,35	19,78 ± 0,35
Larveoverlevelse	42 %	80 %
Puppevægt	177,74 ± 3,95	169,65 ± 2,24
Dage inden udklækning	8,33 ± 0,08	9,96 ± 1,76
Puppeoverlevelse	95 %	95 %

**Tabel 2: Udviklingen hos fall armyworm i i rajgræs dyrket udendørs. Alle tal er i milligram og afvigelser er angivet som ±. (uddrag af tabel af Clay, K. et al., 1985).**

Perioden fra larve til forpupning var længere og generelt var dødeligheden ca. 40 % højere hos larverne der fik græs indeholdende endofytter. I modsætning til det første forsøg var der ikke nogen signifikant forskel på puppevægten, dage til udklækning eller overlevelseshraten for pupperne. Alt i alt var det kun ca. 40 % af de larver der havde fået inficeret materiale der nåede voksenstadiet, mod ca. 76 % af de larver der havde fået ikke-inficeret materiale.

Lignende resultater blev opnået i strandsvingel, hvor vægten af de larver der var fodret med endofyholdigt materiale aldrig kom højere end 80 % af den hos larverne der var fodret med ikke inficeret materiale.

I de øvrige græsser var det kendetegnende at larvewægten generelt lå væsentligt under larverne fodret med rajgræs og strandsvingel, hvilket også giver indtrykket af at der må være en væsentlig næringsmæssig forskel i græsserne. Da de tre øvrige græsser ikke er udbredt under danske forhold er disse ikke diskuteret her.

### 3.1.1.1 Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*)

Fall armyworm er larven hos en amerikansk græsmøl. Den skader græsset ved at æde plantevæv og gnave på bladene. Den foretrækker planter i græsfamilien, men hvis den er meget sulten kan den æde næsten alle slags afgrøder. Larverne æder alt tilgængeligt plantemateriale og vandrer videre til den næste mark.



Figur 1: Den amerikanske fall armyworm møl og dens larve ([www.ent.iastate.edu](http://www.ent.iastate.edu)., [www.uark.edu](http://www.uark.edu))

Rapporterne om ødelæggelser skabt af larven kommer som regel i juli og tidlig august. Fall armyworm møllene trækker op nord på fra Central og Sydamerika og lægger deres æg i de tidlige sommermåneder. Møllene har flere generationer i løbet af et år. Når larverne er fuldt udvoksede er de ca. 3,5 cm lange (se Figur 1).

### 3.1.2 Vurdering af forsøget

Generelt viser resultaterne af dette forsøg, at der er en væsentlig forskel i udviklingen af larver fodret med endofytinficeret græs og ikke-inficeret græs. Selvom effekten af endofytterne virker dramatisk, er der dog ikke noget entydigt svar på, hvorvidt den ligger i en egentlig forgiftning eller en repellerende effekt skabt af endofytterne. Der er ligeledes heller ikke blevet vurderet på hvorvidt larverne der blev fodret med inficeret materiale spiste mere eller mindre end de der fik ikke-inficeret materiale, hvorfor det ikke kan anses for sikkert, at effekten er så stor som opgjort.

Alle græsserne blev dyrket under samme forhold og der burde derfor ikke være forskelle i de næringsmæssige kvaliteter i mellem græsserne i samme forsøg. Derfor er der trods alt stadig belæg for at vurdere at de udviklingsmæssige forskelle der er opstået blandt larverne skyldes endofytindholdet.

Hvorvidt resultaterne af dette forsøg kan benyttes til at bevise effekten af endofytinficeret græs, mod planteædende insekter, afhænger i høj grad af hvorvidt det kan overføres til andre insekter end fall armyworm. Da denne er en meget generel herbivor og spiser hvad den kommer i nærheden af, er der muligvis belæg for at vurdere at effekten umiddelbart kan overføres direkte til andre generelle herbivorer (Cheplick, G. P., Clay, K., Marks, K., 1988). Der er dog stor forskel på hvordan forskellige insektarter reagerer på disse giftstoffer.

Under danske forhold vil det være mest nærliggende at sammenligne fall armyworm med græsmøl, stængelmøl eller frøgræsugler. Disse kan have betydelige konsekvenser for udbyttet i en græsafgrøde og græsmøllarven kan ligeledes udgøre stor skade i en efterfølgende kornafgrøde. I plænegræsser og rekreative områder er der nogle år ligeledes store problemer med gåsebillelarver og stankelbenslarver, der kan volde store skader på plænerne. Bortset fra stængelmøllarven har larverne fra disse møl dog den væsentlige forskel fra fall armyworm, at skaderne som regel sker ved gnav i rødder og andre underjordiske dele.

### 3.1.3 Europæiske forsøg med insektresistens

I 1998 har forsøg udført i Tyskland vist tilsvarende god effekt mod kålmøl (*Plutella xylostella*) der ligeledes er en meget aggressiv planteæder og som blandt andet volder store problemer i grøntsagsproduktionen i hele Europa. Der var dog i dette forsøg ikke tale om endofytter fra rajgræs. Det tyske forsøg blev udført på rosenkål inokuleret med endofytter hvorefter halvdelen af møllarverne blev fodret med inficeret materiale, mens en kontrolgruppe blev fodret med ikke-inficeret plantemateriale. Herefter blev den relative vækstrate udregnet på baggrund af en metode udviklet af Farrar et al. 1989 (C.F. Raps, A., Vidal, S., 1998). Resultaterne viste med alt tydelighed at der var stor forskel i udviklingen af møllarverne. Der var en stor reduktion i vækstraten hos larverne der fik inficeret materiale (se Tabel 3), samt der var en tydelig synlig effekt i form af vækstdeformiteter (Raps, A., 1998).

	Inokulerede planter	Kontrol planter
Vækstrate 1. forsøg	0,32 ± 0,18	0,41 ± 0,11
Vækstrate 2. forsøg	0,39 ± 0,05	0,41 ± 0,04

**Tabel 3: Vækstrate hos kålmøl fodret med endofytinficerede rosenkålsblade sammenlignet med ikke-inficerede. (Udrag af tabel, Raps, A., Vidal, S., 1998)**

Den observerede effekt af larvernes indtagelse af endofytinficeret materiale, var sammenlignelig med den deformitetseffekt der opnås ved vækstregulerende hormoner. Som følge heraf døde flere af

larverne få dage efter forsøgsstart eller undergik forsinket vækst, udvikling og forpupning (Raps, A., Vidal, S., 1998).

## 3.2 Resistens overfor herbivorer

Hidtidig forskning og kendskab til de fleste græsendofytter, har koncentreret sig omkring deres giftighed overfor planteædere. Laboratorie- og feltforsøg har vist at planteædende dyr ofte afskrækkes fra at æde endofytnificeret materiale eller udviser deciderede sygdomssymptomer, dårlig trivsel og reduceret tilvækst (Latch, G. C. M., 1993). Disse egenskaber opnået ved endofytninfektion kan ses som en selektionsfordel for planter ved græsningstryk af forskellige herbivorer.

Af pattedyr hvor der er observeret konkrete sygdoms- eller fitnesspåvirkninger efter indtagelse af endofytnificeret græs kan nævnes køer, heste, okser, får, geder, kron dyr, kaniner/harer, rotter og mus. Feltundersøgelser viser endvidere at strandsvingelarealer inficeret med endofytter indeholder væsentligt lavere populationer af mindre pattedyr end tilsvarende ikke-inficerede arealer (Clay, K., 1991). Ydermere er det påvist at fugle udviste store vægttab hvis de var udsat for en diæt indholdende inficerede frø, kontra ikke-inficerede.

Viden om, at græsser kan være giftige overfor husdyr er langt fra noget nyt fænomen. Således er der referencer helt tilbage til biblen, den romerske poet Ovid og Shakespears skuespil *Henry VI*, omkring tilfælde af forgiftning af husdyr fodret med rajgræs af en bestemt type (*Lolium temenulum/poison Darnel*, [www.omnicopia.com](http://www.omnicopia.com)). Dette kunne meget vel have været grundet et højt endofytindhold.

## 3.3 Forgiftningsfarer

Tilstedeværelsen af endofytter i fodergræsser (både afgræsning, slet og hø), skaber ofte forgiftningsproblemer, der dog ikke er blevet registreret i Danmark. I USA og New Zealand er der dog talrige eksempler på alvorlige forgiftninger med stor produktionsnedgang til følge. Det er især to giftstoffer (Lolitrem B og Ergovalin), der regnes som hovedårsag til forgiftningerne.

### 3.3.1 Lolitrem B

Producers kun i inficeret rajgræs, og kan i høje koncentrationer fremkalde krampelignende symptomer, kaldet *Stagger*. Symptomerne viser sig især hvis dyrene udsættes for stress mens de har høje koncentrationer i kroppen. Kendetegne for forgiftningen er det, at dyrene har problemer koordineringen af deres bevægelser, krampeanfald og stivhed i benene. Forgiftnings symptomerne forsvinder dog igen så snart dyrene fratages det endofyholdige foder igen (Jensen, A. M. D., 2003).

### 3.3.2 Ergovalin

Producers i en lang række græsser, men kendes bedst fra strandsvingel, hvorfor den også skaber størst problemer i USA, hvor strandsvingel udgør en stor del af afgræsningsarealet. Ergovalin fremkalder symptomer kaldet *fescue toksikoser*. Disse symptomer optræder både vinter og sommer men med forskellige karakteristika.

I vinterperioden kendetegnes symptomerne ved, at blodtilførsel til ører, ben, hale osv. bliver reduceret eller afskåret, hvorved der opstår koldbrand og lemmerne i værste fald falder helt af. Sommer symptomerne kendetegnes ved forhøjede temperaturer, reduceret fødeindtagelse, strittende pels og reproduktionsproblemer. Ydermere har der også været observationer af store, faste fedtaflejringer i dyrenes vom (Jensen, A. M. D., 2003).



Der er stor forskel på hvor sensitive dyr er overfor koncentrationer af de to giftstoffer (se Tabel 4). Heste og grise er meget følsomme, hvorimod køer og får kan tåle noget højere koncentrationer før der udvises synlige symptomer.

Dyr	Grænseværdi Lolitrem B (ppm)	Grænseværdi Ergovalin (ppm)
Heste	0-0,8	0,3-0,5
Køer	1,8-2,0	0,4-0,7
Får	1,8-2,0	0,8-1,2

**Tabel 4: Grænseværdier for indhold af Lolitrem B og Ergovalin, før der er synlige symptomer hos dyr. (Jensen, A. M. D., 2003).**

Disse grænseværdier skal dog ses i lyset af, at det er værdier hvor man direkte har kunnet se symptomerne på dyret. Det er sandsynligvis ved de lave vedvarende koncentrationer, at man får produktionsnedgangene i form af eksempelvis nedsat tilvækst og dårlig reproduktion. Der er naturligvis også stor forskel på hvor høje koncentrationer dyrene er udsat for afhængige af om de går ude og græsser, eller de er opstaldet og fodret er en blanding af flere komponenter. Koncentrationerne af giftstofferne i græsset har mindre effekt hvis græsset kun er en del af fodret, i modsætning til hvis der er tale om ren afgræsning.

I Danmark findes der sædvanligvis ikke endofytter i fodergræs, hvorimod det er meget almindeligt i plænegræsser og især udenlandske plænegræsser. Problemer med forgiftninger opstår derfor kun hvis der fodres med frøgræshalm fra en græsmark med plænegræssort, eller hvis der afgræsses på frøgræsmarker, hvilket der ikke er tradition for. I de senere år har nogle dog forsøgt sig med at lade får afgræsse frøgræsmarken i efteråret.

### 3.4 Endofytters effekt over for skadevoldere

Effekten af endofytter overfor herbivorer, både insekter og pattedyr, kan på baggrund af et repræsentativt uddrag af forsøg, opsættes i et skema som nedenstående (sammensat af Clay, K., 1988):

Dyr	Værtsgræs	Endofytype	Kommentar
Pattedyr			
Kvæg, heste	Festuca (svingel)	<i>Neotyphodium</i>	Giver reduceret tilvækst, forøget kropstemperaturer, lammelser, spontane aborter
Kvæg, får	Lolium (rajgræs)	<i>Neotyphodium</i>	Giver reduceret tilvækst, lammelser, stagger, død
Insekter			
Fall armyworm (ikke noget dansk navn)	Lolium, Festuca	<i>Neotyphodium</i>	Afskrækkende effekt, reduceret overlevelse, reduceret tilvækst, forlænget udvikling
Bladlus	Festuca	<i>Neotyphodium</i>	Afskrækkende effekt
Snudebiller	Lolium	<i>Neotyphodium</i>	Reduceret ædelyst, og forringet reproduktion
Fårekyllinger	Lolium	<i>Neotyphodium</i>	Dødelighed

**Tabel 5: Effekten af endofytter i rajgræs og svingel mod en række insekter og pattedyr (uddrag af tabel, Clay, K., 1988).**

Der produceres dog også andre giftstoffer i forbindelse med tilstedeværelsen af *Neotyphodium* endofytter i rajgræs og svingel. Stoffet Pyrrolizidine er blevet fundet i endofytnificeret svingel og har ved høje koncentrationer resulteret i fescue toksiskoser hos køer, hvorimod det ved lave koncentrationer ingen effekt havde. Samtidig har dette stof også vist sig at have en afskrækkende effekt overfor bladlus. I rajgræs har stoffet Peramin vist sig at være den mest effektive afskrækker af herbivore insekter. Dette kunne indikere at giftigheden over for insekter og pattedyr har forskellige kemiske oprindelser (Clay, K., 1988).

Andre græsser, som eksempelvis byg, producerer alkaloider på det nyfremspirede stadie, hvor angreb af herbivorer har den største potentielle effekt på plantens fitness. Der er forskel på hvor i planten giftstofferne ophobes. Nogle forbliver i det plantevæv hvor i svampen er placeret, mens andre bliver transporteret rundt i planten.

### 3.5 Non toksisk græs

Non toksiske endofytinficerede græsser er blevet meget interessante de senere år, da man meget gerne vil have effekten af de egenskaber der følger med endofytten, men til gengæld helst vil slippe for de problemer der opstår i forbindelse med udskillelse af toksiner.

Der er i tidens løb blevet iværksat en række mere eller mindre vellykkede forsøg for at eliminere eller minimere risikoen for forgiftninger på grund af endofytindholdet i græsset.

De tidligste gik ud på at producere endofytfrie græsser og erstatte græsset på afgræsningsarealerne med dette. Disse tiltag blev dog mødt med begrænset succes; det virker en smule uoverskueligt at erstatte 17 millioner hektar med endofytinficeret svingel i USA med nyt græs. Når det meste af dette græs så oven i købet er placeret på marginaljord hvor man i høj grad har brug for endofytternes egenskaber, da der ikke er ressourcer til intensiv dyrkning, virker det helt omsonst. På samme måde har man på New Zealand tidligere prøvet at udskifte det inficerede græs med ikke-inficeret. Alt rajgræs bliver dog angrebet af den argentinske snudebille (Argentine stem weevil) og kan derfor ikke overleve uden endofyten. Før i tiden måtte man derfor bare acceptere at dyrene blev syge på grund af et højt Lolitrem B indhold, men nu er en del af græsset på New Zealand dog blevet erstattet med græs indeholdende AR1 endofytten, som er giftfri (Jensen, A. M. D., 2005 P.M)

I den senere tid er der i stedet blevet rettet opmærksomhed mod, at tilsætte medikamenter i suppleringsfodret til de græssende dyr, eller udvikling af en egentlig vaccine mod de ergotlignende toksiner. En anden løsning er identifikation af endofytstammer eller græsgenotyper, hvor der ikke er risiko for akkumulering af giftstoffer, eller i sidste instans forsøg med genmanipulering i endofytstammerne.

Der er dog en lang række problemer og betænkeligheder forbundet med produktion af non toksiske endofytstammer. Ligesom med græsserne de skal implementeres i er der store genetiske forskelle i endofytterne. Derfor er det heller ikke konsekvent, at der opstår problemer med forgiftninger. I Texas har man således udført forsøg med italiensk rajgræs inficeret med endofytter hvor udbytte blev forøget betragteligt, uden at der dog opstod forgiftninger ved efterfølgende opfodring af det høstede græs (Schardl, Christopher L., Phillips, Timothy D., 1997). Udbytte var ca. 10 % højere hvor græsset var inficeret sammenlignet med en genetisk ens population uden endofytten.

I Danmark er der taget hul på et projektsamarbejde mellem DLF-Trifolium og Forskningscenter Flakkebjerg (DJF), hvor det forsøges at identificere giftfrie endofytstammer og herefter implementere dem i en værtsplante. I projektbeskrivelsen er opsat følgende mål og metode:

*Mål:* Målet er at identificere/fremstille giftfrie stammer af endofytter. Stammer af denne type er allerede patenteret på New Zealand og disse er med stor succes indsat i andre græs sorter hvor de ikke producerer toksiner. Når egnede kandidater er identificerede er målet at få dem indsat i egnede foder og plænetyper.

*Metode:* Endofyholdige græsser indsamles fra naturlige græspopulationer og screenes ved brug af HPLC for tilstedeværelsen af udvalgte toksiner. Fra toksin-fri græsser isoleres endofytten og indsættes i andre græstyper hvor toksin profil og stabilitet følges ([www.agrsci.dk](http://www.agrsci.dk)).

Med den åbenlyse interesse der er fra udenlandsk side, for det produkt der kan komme ud af et sådant projekt, er det interessant at vide hvor langt man er kommet i projektet, og hvilken betydning det forventes at få for den danske eksport, hvis man kan frembringe et produkt der matcher forbrugers krav. I den forbindelse har projektforsker Niels Roulund venligst givet sin vurdering af det foreløbige resultat samt betydning for eksport:

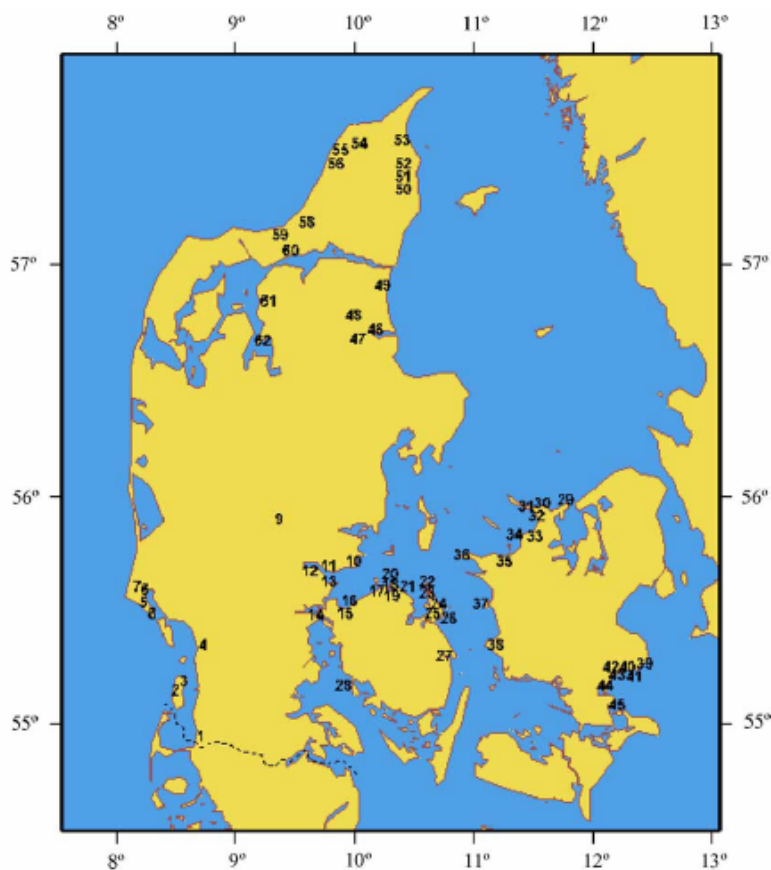
*Vi er igang med at starte produktion af non-toksiske endofytinficerede græsser hvor vi bruger endofytisolater fra AgResearch New Zealand. Vi er ligeledes ved at inficere egne giftfrie endofytter - men*

*disse skal først gennem omfattende test med fodringsforsøg før vi kan være sikre på om de virkelig er giftfri. Med giftfri endofyt fodergræsser forventer vi at kunne forøge vores markedsandel i især New Zealand, Australien og til dels USA - men kun med en relativ begrænset mængde i forhold til de 120.000 T/år som DLF-Trifolium idag producerer.*

## 4 Endofytter i Danmark

En af de væsentligste græsarter i Danmark er alm. rajgræs. Alm. rajgræs optræder i både græsfrøsprødsproduktionen og i afgræsningsarealer på baggrund af et højt produktivt- og kvalitetsniveau. I vild bestand har en række undersøgelser i Europa vist, at alm. rajgræs er en hyppig vært for endofytter, men også de kommercielt dyrkede sorter er hyppige værter (Jensen, A. M. D., 2003). Der har dog ikke før 2003 været udført offentliggjorte undersøgelser omkring indholdet af endofytter i vildtvoksende græsser i Danmark, og der findes kun upublicerede beskrivelser af indholdet i de kommercielt dyrkede græsser.

Derfor blev der under en undersøgelse i semi-naturlige habitater for at undersøge biodiversitet, også undersøgt på forekomsten af endofytter i Danmark. Der blev udvalgt 62 lokaliteter (se Figur 2) som skulle repræsentere 12 forskellige typer habitater, hvor der blev undersøgt for endofytindholdet i alm. rajgræs. De fleste af disse habitater var delvist ekstensive afgræsningsarealer.



**Figur 2: Oversigt over de udvalgte lokaliteter hvor testmaterialet blev indsamlet. Lokaliteterne blev udvalgt på baggrund af deres historie som henholdsvis afgræsset og ikke-afgræsset. (Jensen, A. M. D., Roulund, N., 2003).**

Arealerne blev udvalgt ud fra deres historie, eksempelvis permanente græsarealer, eller udvalgt ud fra at skulle repræsentere et bredest muligt udsnit af Danmark. Lokaliteterne blev opdelt i to kategorier; afgræsset og ikke-afgræsset, og der blev indsamlet mellem 12 og 40 individuelle rajgræsplanter på hver lokalitet. Som det kan ses på Figur 2 er stort set samtlige lokaliteter hvor testmaterialet er indsamlet kystnære områder. Dette skyldes at man under indsamlingen dels gerne ville undgå arealer der lå i umiddelbar nærhed af kommercielt dyrkede græsser for at undgå ”indvandrede” rajgræs-

typer, samt det faktum at mange naturlige græsarealer tilfældigvis ligger der (Jensen, A. M. D., 2005, P.M)

Disse planter blev herefter plantet i potter og placeret i et væksthuse, der på intet tidspunkt kom under 15° C. her blev de vandet og fulgt i gennem 2 måneder gennem efterår og vinter, med naturligt lysindfald. Dog blev der suppleret med ekstra belysning hvis lysintensiteten kom under 4000 Lux.

Herefter blev der testet for indhold af endofytter og planter med positiv respons blev efterfølgende testet for koncentration af intercellulært mycelium.

Der blev fundet endofytter på 77 % af disse lokaliteter, med infektionsrater svingende fra 4-82 %, højst på lokaliteter hvor der havde været et højt afgræsningsniveau, eller arealer der i høj grad havde været offentlig befærdet.

Dog lå 56 % af lokaliteterne på et infektionsniveau på under 20 %, mens kun to lokaliteter havde et niveau der lå på over 75 %.

Dette kunne indikere at der er en øget overlevelses fordel hos det inficerede græs frem for det ikke-inficerede i områder hvor afgræsning eller intensiv benyttelse af græsset er miljømæssige stress faktorer.

Denne undersøgelse beviser som den første tilstedeværelsen af endofytter i Danmark er forholdsvis høj i de mere ekstensive græsområder, og at høje endofyt mængder ikke er begrænset til egne med tradition for meget tørre forhold, som eksempelvis middelhavsområdet (Jensen, A. M. D., 2003).

## 4.1 Produktion af endofytinficeret rajgræs i Danmark

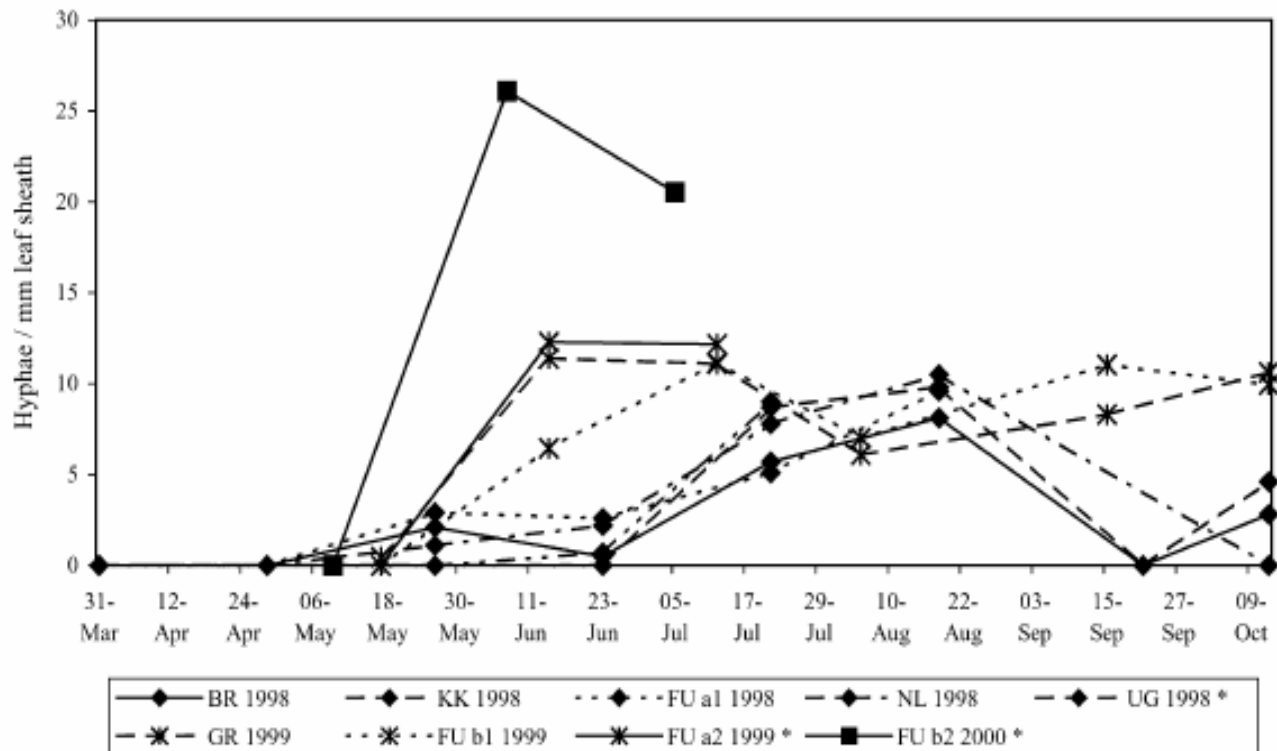
Da alm. rajgræs ligeledes er en betydningsfuld frøgræsafgrøde blev der forud for denne undersøgelse, i perioden 1998-2000 lavet tilsvarende undersøgelser på indhold og etablering af endofytter i frøgræsarealer fordelt over 9 lokaliteter i det nordvestlige sjælland, i præ-basis, basis og F1 udsæd og vurderet på koncentrationen af mycelium i de inficerede planter. Dels for at undersøge hvorvidt det overhovedet kan lade sig gøre at opretholde mængden af endofytter under danske forhold, men også for at undersøge udviklingen af indholdet af Lolitrem B.

I undersøgelserne blev der benyttet udsæd af sorten Delaware, med endofytindhold i ca. 30 % af frøene. Præbasis udsæden var af amerikansk oprindelse, men opformeringsarbejdet af sorten var udført under danske forhold. Ved høst af dette udsæd i USA var indholdet af endofytter anslået til 87 %, men efter opformeringen i Danmark var dette indhold reduceret til at kun ca. 30 % af frøene var inficeret.

Hver måned fra maj til oktober blev der indsamlet 20 planter 2-3 udvalgte steder i marken, der dagen efter blev undersøgt for endofythyfer. Det yderste blad på et skud blev fjernet, og herefter blev der skrællet strimler af epidermis på den inderste overflade af bladet. Disse blev herefter vurderet i mikroskop.

Intensiteten af svampehyfer blev beregnet på baggrund af mængden af svampehyfer pr. mm på tværs af epidermis, og lagt sammen for at give et gennemsnit af hver mark.

Der var tydelige beviser på at endofytterne kunne etablere sig, også under danske forhold. Der var en sæsonafhængig variation i mængden af hyfer. Der var lavest koncentration i foråret og en stigende koncentration henover sommeren (se Figur 3).



Figur 3: Intensiteten af endofyter i de 9 græsmarker. Det ses at der er store sæsonafhængige udsving. \* indikerer at det er en 2. års græsmark (Jensen, A. M. D., 2004)

Resultatet af denne undersøgelse var, at der ikke var nogen væsentlig reduktion af endofytindholdet selvom græsset blev dyrket under danske forhold. I 7 ud af de 9 forsøg var der ingen indikation af en reduktion af endofytindholdet fra basis udsæd og frem til både første og andet høstår. Det store fald i indholdet af endofytter fra det amerikanske materiale til den danske basisudsæd, skal sandsynligvis forklares ved forkert håndtering og opbevaring af materialet frem til opformering. Det er tidligere bevist at længere tids opbevaring, fugtighed og temperatur under opbevaring kan have betydning for endofytternes overlevelsessevne (Clay, K., 1988).

Hvis danske klimatiske forhold eller dyrkningspraksis skulle være grunden til det store svind af endofytter under opformeringen, ville der kunne forventes stor reduktion af endofytindholdet mellem udsæd og 1- og 2.-års græsfrø. Dette var dog ikke tilfældet. Endofytterne blev tværtimod godt etableret i afgrøden og undersøgelser af endofytindholdet i mere eller mindre vilde græspopulationer viser også at endofytterne er ganske udbredt under det danske klima (Jensen, A. M. D., Roulund, N., 2003). Konklusionen på undersøgelsen må altså være at dyrkning af endofyholdigtgræs og opretholdelse af endofytindholdet kan lykkedes under danske forhold, hvis håndtering og dyrkningsmanagement er i top.

#### 4.1.1 Indhold af Lolitrem B

Endofytterne i rajgræs er kendt for at producere en række toksiske metabolitter. En af disse er Lolitrem B. Dette er en neurotoxin og er ansvarlig for forgiftningssymptomer hos en lang række husdyr, blandt andet *stagger*. Normalvis regnes 2 ppm Lolitrem B for en tilstrækkelig dosis til at udløse alvorlige anfald af *stagger* hos får, mens heste til gengæld er langt mere sarte (se Tabel 4 s.13). Under normale omstændigheder er *stagger* ikke dødeligt, men da den er skyld i både reduceret tilvækst og reproduktionsnedgang, må det vurderes, at den kan have en alvorlig økonomisk konsekvens for

landmanden. Der er registrerede tilfælde af *stagger* i Europa, og hvis fremavlen af endofytinficeret græs forøges, er det sandsynligt at der vil opstå flere tilfælde.

Indholdet af Lolitrem B er påvirket af en lang række faktorer. Både miljø- og landbrugsmæssige faktorer såsom temperatur, plantealder, plante/fungi genotype og nitrogen tilførslen er med til at bestemme indholdet. Toksinproduktionen stiger typisk når planterne dyrkes under stressende forhold som eksempelvis tørke.

Analyser på Lolitrem B produktionen i rajgræs har hidtil kun været udført på frø, enkelt planter eller strå. Der har ikke hidtil været analyseret på hvordan produktionsniveauet af Lolitrem B er under praktiske dyrkningsforhold. Og der har ingen undersøgelser været af Lolitrem B indhold i græs i Danmark, før denne undersøgelse.

Alm. rajgræs til frøgræsproduktion dækkede i 2003 ca. 35.000 ha. Heraf var ca. de 1.500 inficeret med endofytter (DLF), og 2004 var det tal lidt højere.

Analysen af Lolitrem B indholdet i rajgræs foregik ved, at der hver måned blev klippet græs af på et 0,5 m<sup>2</sup> stort område, i et i forvejen udvalgt område. Det afklippede græs blev opdelt i enten topfraktion (plantemateriale mere end 5 cm over jorden) og bundfraktion (plantemateriale fra 0-5 cm over jorden). Topfraktionen afspejlede det græs der fjernes ved høst af afgrøden eller genvæksten i efteråret. Bundfraktionen afspejler det der efterlades i marken som stub. Denne fraktion er vigtig at få vurderet på, i det Lolitrem B ikke er ligeligt fordelt i planten. Toksinet er normalt koncentreret i det yderste af bladene gennem den vegetative vækstfase, men i blomstringsperioden kan det også findes i de blomstrende skud og frø.

Fraktionerne blev snittet i stykker på 2-3 cm, blandet godt, og herefter delt op i 3 dele der blev frysetørret og formelet, og senere kemisk analyseret.

Resultatet var, at der var højeste koncentrationer af Lolitrem B i sommerperioden, mens de var lavest i forårsperioden. Dette falder også sammen med at koncentrationen af endofythyfer var højest på disse tidspunkter (se Figur 3). I alle årene var de højeste koncentrationer i topfraktionen at finde i juli og august, mens koncentrationerne i bundfraktionen blev ved med at stige gennem efteråret. Bundfraktionen afspejler hvad der ville være tilbage efter høst og evt. være til rådighed hvis marken skulle afgræsses. Den højeste koncentration af Lolitrem B der blev fundet var 0,79 ppm.

Produktionen af Lolitrem B følger sædvanligvis en sæsonbestemt profil, karakteriseret ved at den toppe i sensommeren. Resultaterne af denne undersøgelse med dansk dyrket Delaware rajgræs understøtter denne teori, og falder godt sammen med udenlandske forsøg, der dog ikke på samme måde har fokuseret på adskillelse af top og bundfraktion (Jensen, A. M. D., 2004)

Evalueringer af toksinproduktionen i større populationer, forskellige plantefraktioner og under markforhold er sjældne. Derfor er dette danske forsøg meget vellykket i det, der tages højde for at der er tale om en frøafgrøde, hvor den del der kan benyttes som foder først hentes sent på sommeren. Baseret på de opnåede data i dette forsøg blev det vurderet, at det ikke var anbefalingsværdigt at benytte høg fra 2 af lokaliteterne til hestefoder, da disse havde et Lolitrem B indhold der lå tæt på den grænseværdi der kan udløse meget voldsomme symptomer af *stagger* hos heste (0,8 ppm). Dette skal ses i lyset af, at høg ofte sælges i små mængder og koncentrationen af toksiner derfor kan være langt højere hvis denne mængde er taget i en plet af marken hvor toksinproduktionen har været højere.

Variationerne i produktionen Lolitrem B kan muligvis ligge i formeringen. Alm. rajgræs er en krydsbestøvende art og mange af sorterne er kunstigt fremstillede varianter. Dette kræver normalt,



at man under forædlingsarbejdet krydser et sted mellem 6-10 forældreplanter, og den population der kommer ud af det vil være genetiske forskellige planter.

Hvor høj produktion der er af metabolitter afhænger i høj grad af plante-fungi genotype kombinationen. En strategi til at nedsætte forgiftningsfarerne i rajgræs må derfor være, at udvikle og dyrke græssorter med endofytstammer der ikke producerer Lolitrem B.

Genotypeforholdet mellem svamp og værtsplante er en af de helt store komplikationer i udviklingsarbejdet med endofytnificeret græs, i det, det er forholdsvist let at isolere endofytten og innokulere på værtsplanten, men samme endofytstamme kan have forskellig effekt afhængig af genotypen på værtsplanten, og det er derfor svært at udvikle et produkt man kan stille garanti for (Jensen, A. M. D., 2005, P.M).

Den mængde Lolitrem B der blev fundet i topfraktionen i oktober i dette forsøg, blev brugt til at vurdere hvorvidt genvæksten i efteråret kunne bruges til eksempelvis ensilage. Det blev vurderet at der ikke på noget tidspunkt i efteråret opnåedes koncentrationer der kunne udløse forgiftningssymptomer. Derimod blev det vurderet at den højeste koncentration var at finde i bundfraktionen. Dette har betydning hvis man har tanker om at lade sine frøgrøsoarealer afgræsse, eksempelvis en 2.års mark der er taget ud af produktion. Der er stor sandsynlighed for, at Lolitrem B koncentrationen i stubbene øges i løbet af efteråret, i hvert fald i nogle afgrøder. Derfor bør afgræsningsintensiteten nøje afvejes og vurderes ud fra hvilke dyr man lader afgræsse og en test af toksinkoncentrationen bør tilstræbes.

## 5 Relevans af endofytter i Danmark

For at undersøge hvorvidt der er relevans af de egenskaber der kan opnås i Danmark med endofytinficeret græs, vil det følgende afsnit beskæftige sig, med de forhold der gør sig gældende, og de egenskaber der er interessante hos slutforbrugeren og producenten.

### 5.1 Lovmæssige forhold

Med det formål at begrænse pesticidforbruget har Kommunernes Landsforening indgået en aftale med Miljø og Energiministeriet om at afvikle brugen af kemiske bekæmpelsesmidler på offentlige arealer. Aftalen blev indgået i 1998 i forbindelse med vandmiljøplan II og tiltag og resultater skulle efterfølgende evalueres i 2003. Disse tiltag vil give problemer for bl.a. dansk golf, fodbold og andre udendørs aktiviteter da de alle stiller visse krav til græsarealernes struktur, kvalitet og pleje.

Derfor er der indledt et projektsamarbejde mellem Forskningscenter Flakkebjerg, KVL, DLF og DGU, for at undersøge alternativer til græspleje især med fokus på mulige egenskaber i græsendofytter.

Målet for aftalen var at udfase brugen af pesticider på offentlige arealer senest 1. januar 2003, bortset fra områder hvor der er væsentlige negative sikkerheds- eller sundhedsmæssige konsekvenser ved at undlade brug af pesticider.

Evalueringen i 2003 viser, at kommuner, amter og stat er nået langt med udfasningen af pesticider på de offentlige arealer. Det opgjorte offentlige pesticidforbrug udgør således i 2002 under 2 promille af det samlede pesticidforbrug i Danmark. Forbruget er faldet fra 28,8 tons aktivt stof i 1995 til ca. 6,3 tons aktivt stof i 2002. Der er i løbet af udfasningsperioden opnået en lang række erfaringer i kommuner, amter og i staten vedrørende pesticidfri drift, der kan være medvirkende til at fortsætte og fastholde udfasningen på de offentlige arealer ([www.fvm.dk](http://www.fvm.dk)).

### 5.2 Udvikling af robuste plænegræsser til golf og boldbaner

For at imødekomme ønskerne i ovennævnte aftale, har parterne i projektgruppen fokuseret på udvikling af robuste græsser, baseret på indholdet af kulhydrater og metabolitter forårsaget af tilstedeværelse af endofytter i græsserne. Målet er at finde græssorter med meget akkumuleret fruktan sidst på efteråret da de formodes at være mere vinterpersistente. Desuden ønskes fremstillet græsser med stammer af endofytter der producerer høje mængder af toksin så der derigennem kan opnås insekt- og nematode resistens.

Enkeltplanter af forskellige græsarter (plæne og fodertyper) udsat i marker høstes gennem efteråret og analyseres for fruktan ved brug af enzymatiske analyser. Endofytstammer med evnen til at producere meget toksin indsættes i relevante art/sorter og testes for resistens.

Da et forskningsprojekt som dette slutteligt skal være til gavn for forbrugeren, der er berørt af et tiltag som dette fra overordnet side, er det relevant at se på hvad der er egentlig er af ønsker, for at kunne vurdere hvorvidt endofytter kan opfylde disse.

Som repræsentant for forbrugeren har miljøkonsulent Torben Kastrup Petersen fra Dansk Golf Union, venligst svaret på spørgsmål omkring ønskede egenskaber i plænegræs og forventninger til forskningsprojektet:

Hvilke ønsker I har til, at der skal komme ud af et sådant projekt?

- *Få ideer om hvordan vi kan udvikle et produkt - plænegræsser med forbedrede egenskaber*
  - *Vinterpersistens*
  - *Sneskimmelresistens*
  - *Insektresistens*
- *Udføre pilotforsøg der skal give en ide om, hvad det er for faktorer, vi skal kigge på*
  - *Endofytter*
  - *Kulhydrater*
  - *Etc.*

Vil I være parate til at benytte endofytinficeret græs selvom udsædsprisen måske er højere? og tror I det gælder for alle jeres medlemmer?

*Vi er altid interesseret i at finde på løsninger, der kan være med til at udfase brug af pesticider. Om hvorvidt vi vil anvende det, hvis udsædsprisen er højere er svært at svare på. Hvis prisen er lidt højere tror jeg bestemt man vil benytte endofytinficeret græs, men er prisen alt for høj kan det måske blive et problem at overbevise vores medlemsklubber, der jo også har et budget at tage hensyn til.*

*Hvis man med sikkerhed kan mindske sygdomsangrebene tror jeg imidlertid, at man vil være villig til at betale en del ekstra.*

Hvilke krav græsset skal opfylde for at opfylde jeres behov?

*Være slidstærkt, grønt og resistent overfor sygdomme.*

Da projektet stadig er i gang og der endnu ikke forligger noget publiceret materiale omkring resultaterne, kan det være svært at afgøre hvorvidt effekten af endofytter er tilstrækkelig under danske forhold.

Afgørende er det dog, at der foreligger dokumenterede gavnlige egenskaber, som nævnt tidligere, der opfylder forbrugerens ønsker om insekt- og tørkeresistens. Disse er muligvis udført under andre klimatiske forhold (Frankrig og USA), men da danske undersøgelser udført i 2003 viser, at der er væsentlig tilstedeværelse af endofytter i semi-naturlige habitater med delvis afgræsning samt ubørte arealer, må der være belæg for at regne med, at endofytterne også giver selektionsfordele for græsset under danske forhold.

Muligheden for vinterpersistens hos græsset er kun undersøgt i begrænset omfang hidtil. Finske undersøgelser har dog vist, at næsten 100 % af det græs der var at finde nord for polarcirklen var endofytinficeret. Dette kunne tyde på at endofytterne også her giver græsset en selektionsfordel frem for det ikke-inficerede (Jensen, A. M. D., 2005, P.M.).

### **5.3 Perspektiver for frøfirmaet ved endofyt indhold i græsset**

Udvikling af græstyper der har egenskaber som opfylder forbrugerens ønske er naturligvis også noget der prioriteres meget højt hos producenten. Derfor medvirker DLF også i denne projektgruppe, da evnen til at kunne tilbyde et non-toksisk græsprodukt med resistensegenskaber vil kunne få stor betydning for DLF's position på det internationale frømarked. Et marked hvor DLF blandt andet sidder på 30 % af det europæiske fodergræsmarked og 50 % af det europæiske plænegræsmarked.

Med fokus på slutforbrugerens ønske og perspektiver for DLF's internationale position har Niels Roulund fra DLF's planteforskningsprogram venligst givet sin vurdering af hvad DLF skal kunne tilbyde og hvorledes det vil have indflydelse på deres position på det internationale frømarked:

Hvad vil I gerne kunne tilbyde (hvilke egenskaber er det I gerne vil sælge endofytinficeret græs på)?

*Primært insektresistens og forbedret persistens til brug i især New Zealand, Australien og USA*

Hvad tror du det vil betyde for det danske frøgræsareal og jeres marked, hvis I kan tilbyde dette græs?

*Vi tilbyder allerede sorter med endofytter og endofytter er en forudsætning for at kunne sælge på ovennævnte markeder.*

*Med giftfri endofyt fodergræsser forventer vi at kunne forøge vores markedsandel i især New Zealand, Australien og til dels USA - men kun med en relativ begrænset mængde i forhold til de 120.000 T/år som DLF-Trifolium idag producerer*

Hvordan tror du prismæssigt græsfrø med disse egenskaber kommer til at ligge?

*Som alm. græs, med mindre at der er tale om endofytter som er giftige for insekter men ikke for køer/får, så ligger prisen typisk på 1,5-2,0 kr/kg mere end alm. græs (engros).*

Forbruger og producent er altså forholdsvis enige om hvilke egenskaber der er relevante i disse græstyper. DLF tilbyder allerede græssorter indeholdende endofytter og mener derfor ikke der p.t. er nogen større udvidelse af det danske frøgræsareal på vej. Disse græstyper indeholder dog udenlandske stammer af endofytter, og hvis det kan lykkedes at fremavle en ren dansk non-toksisk endofytstamme til brug i fodergræs, må det dog vurderes at der er potentiale for en større afsætning af dansk frø. Der produceres i øjeblikket ikke mere end der er efterspørgsel til, da det ikke er dansk patenterede endofytstammer der benyttes. Derved er det svært markedsføre græstypen med henblik på produktionsrettigheder og så videre.

Prismæssigt ligger græsfrø af denne type dog på et niveau som må vurderes at være på linie med det Torben Kastrup Petersen fra DGU efterspurgte.

## Konklusion

Endofytter har potentiale for en lang række egenskaber, der kan være med til at gøre det attraktivt, at få dem implementeret i dansk frøproduktion:

- Forsøgene, både udenlandske og danske viser, at der er en klar tendens til, at endofytten er med til at påvirke og forbedre værtsplantens fitness.
- Det er bevist, at toksiner udskilt af endofytten virker enten direkte toksiske eller repellerende over for en række insekter.
- Det er påvist i danske forsøg, at der er en markant større fotosynteseproduktion i endofytinficeret græs frem for ikke-inficeret, hvilket meget vel kan indikere at kulhydratindlejringen dermed også forøges. Dette er en essentiel faktor hvis vinterpersistensen skal forbedres.
- Amerikanske forsøg i strandsvingel har vist, at der er en større produktion af frø og fertile skud, når græsset er inficeret med endofytter.
- Ligeledes har europæiske forsøg vist, at der var en klar udbyttefremgang i rajgræs med endofytindhold, målt på udbytter i form af slæt.
- Der er ikke forsøg der direkte viser en forbedrende effekt over for tørke, men da næsten 100 % af græsset på afgræsningsarealerne der er udsat for store tørkeperioder i USA er endofytinficeret, må det vurderes, at endofytten giver græsset en selektionsfordel.

Der er tilsyneladende ikke nogen risiko for at endofytindholdet i græsset går tabt under de danske klimatiske forhold. De faktorer der har indflydelse på endofyttens overlevelsessevne er ting som opbevaring, temperatur under opbevaring og fugtighed under opbevaring. Dette er alle sammen management relaterede problemstillinger, og hvis der skal opnås en effekt af endofytterne er det altså vigtigt, at der er fokus på det.

I forbindelse med den aftale der er indgået mellem kommunernes landsforening og energiministeriet, er der på det nærmeste "skabt" en interesse for græs der har de egenskaber endofytterne kan producere. Hvis der skal indføres fuldt stop for pesticidbrug på offentlige såvel som større private arealer, er der et oplagt behov for græsser der er udstyret med naturlige afvigemekanismer.

Hvis vi i Danmark kan få isoleret endofytstammer der udskiller toksiner der virker over for insekter, men ikke påvirker husdyr, er der et stort marked for salg af dette til udlandet.

Under danske forhold er det især vinterpersistens og insektresistens der er vigtige faktorer. Ligeledes har danske undersøgelser vist at endofytten kan give græsset bedre egenskaber over for slitage, hvilket vil være en fordel på rekreative områder som eksempelvis golf- og fodboldbaner.

## 6 Litteratur

- Bacon, C. W., Porter, J. K., Robbins, J.D., 1986: "Ergot toxicity from endophyte infected weed grasses: a review" *Agron. J.* Nr. 78
- Carroll, George, 1988: "FUNGAL ENDOPHYTES IN STEMS AND LEAVES: FROM LATENT PATHOGEN TO MUTUALISTIC SYMBIONT" *Ecology*, vol.69, No.1. February 1988
- Clay, Keith, Hardy, Tad N., Hammond, Abner, M. Jr., 1985: "Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore" *Oecologia (Berlin)* (1985) 66, Springer-Verlag 1985
- Clay, Keith., 1987: "effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*" *Oecologia (Berlin)* (1987) 73, Springer-Verlag 1987
- Cheplick, G. P., Clay, K., Marks, K., 1988: "Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*" *New Phytologist*, 1989. No 111
- Clay, Keith, 1988: "FUNGAL ENDOPHYTES OF GRASSES: A DEFENSIVE MUTUALISM BETWEEN PLANTS AND FUNGI" *Ecology*, vol.69, No.1. February 1988.
- Clay, Keith, Cheplick, Gregory, P., 1988: "Acquired chemical defences in grasses: the role of fungal endophytes" *OIKOS*, Nr 52. København 1988
- Clay, Keith, 1990: "FUNGAL ENDOPHYTES OF GRASSES" [www.annualreviews.org/aronline](http://www.annualreviews.org/aronline), 1990, No 21
- Clay, Keith., 1995: "FUNGAL ENDOPHYTES, HERBIVORES AND THE STRUCTURE OF GRASSLAND COMMUNITIES" British Ecological Society, 1995.
- Dahlman, D. L., Eichenseer, H., Siegel, M. R. 1990: "Chemical perspectives on endophyte-grass interactions and their implications to insect herbivory" *Microorganisms, plants and herbivores*, ed. C.Jones, V. Krischik, P. Barbosa. NY
- Hardy, T. N., Clay, K., Hammond, A. M. Jr.1986: "The effect of leaf age and related factors on endophyte-mediated resistance to fall armyworm in tall fescue" *Annual Review of Ecology and Systematics* Vol. 21, november 1990
- Jensen, Anne Mette Dahl, 2003: "Svampeendofytter i græs, Test for toksinindhold" *Grøn viden*, Markbrug nr. 285, 2003, Danmarks Jordbrugsforskning
- Jensen, Anne Mette Dahl, 1999: "Endofytter i Alm. rajgræs" *Dansk Frøavl*, nr. 9, oktober 1999, 82. årgang. Strandberg Grafisk a/s
- Jensen, Anne Mette Dahl, 2000: "Endofytter gavner græsset" *Dansk Frøavl*, nr. 7, august 2000, 83. årgang. Strandberg Grafisk a/s
- Jensen, Anne Mette Dahl, 2004: "græsendofyt-forskning på New Zealand" *Dansk Frøavl*, nr. 4, april 2004, 87. årgang. Strandberg Grafisk a/s
- Jensen, Anne Mette Dahl, Roulund, Niels, 2004: "Occurrence of *Neotyphodium* endophytes in permanent grassland with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in Denmark" *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Nr 104 (2004)
- Jensen, Anne Mette Dahl, 2004: "Endophytes i Denmark" <http://cropandsoil.oregonstate.edu/ihsg/default.htm>

- Jensen, Anne Mette Dahl, 2004: "*Endophyte persistence and toxin (Lolitrein B) in a danish seed crop of perennial ryegrass*" In press.
- Jensen, Anne Mette Dahl., Deleuran, Lise Christina (2001): "*Effect of endophyte-infection on photosynthesis in Lolium perenne grown at different nitrogen levels – preliminary results*" (ikke publiceret data)
- Latch, G. C. M., Potter, L. R., Tyler, B.F., 1987: "*Incidence of endophytes in seeds from collections of Lolium and Festuca species*" Annals of Applied Biology, Nr III
- Latch, G. C. M. 1993: "*Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes*" Agriculture, Ecosystems and Environment. Nr 44
- Niell, J. C. 1940: "*THE ENDOPHYTE OF RYE-GRASS (LOLIUM Perenne).*" The N.Z. Journal of Science and Technology. February 1940
- Niell, J.C. 1941: "*THE ENDOPHYTES OF LOLIUM AND FESTUCA*" The N.Z. Journal of Science and Technology. December 1941
- Ravel, C., Charmet. G., Belfourier, F., 1990: "*Influence of the endophyte Neotyphodium lolli on agronomic traits of perennial ryegrass in France*" Grass and Forage science (1995), Volume 50
- Raps, Andrea, Vidal, Stefan, 1998: "*INFLUENCE OF FUNGAL ENDOPHYTES ON ALLELOCHEMICALS OF THEIR HOST PLANTS AND THE BEHAVIOUR OF INSECTS*" Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 63/2a, 1998
- Rolston, M. P., (år ukendt): "*USE OF ENDOPHYTE IN PLANT BREEDING AND THE COMMERCIAL RELEASE OF NEW ENDOPHYTE-GRASS ASSOCIATIONS*" Agresearch, Canterbury Agriculture and Science Centre (ikke publiceret data)
- Rice, J.S., Pinkerton, B.W., Stringer, W.C., Undersander, D.J., 1990: "*Seed production in tall fescue as affected by fungal endophyte*" Crop science, nr. 30.
- Schardl, Christopher L., Phillips, Timothy D., 1997: "*Protective Grass Endophytes- Where are they from and where are they going?*" Plant Disease, Vol. 81 No 5. The American Phytopathological Society, 1997
- Smedegaard-Petersen, V, 1985: "*Mykologiske hovedtræk hos plantepatogene svampe*" KVL – Bogladen, København 1985.

### Web:

- [http://www.agrsci.dk/afdelinger/forskningsafdelinger/gbi/grupper/afgr\\_de\\_kologi\\_og\\_produktkvalitet/projekter/endofytholdige\\_gr\\_sser](http://www.agrsci.dk/afdelinger/forskningsafdelinger/gbi/grupper/afgr_de_kologi_og_produktkvalitet/projekter/endofytholdige_gr_sser) (besøgt 15-05-2005)
- [http://www.dlf.dk/upload/microsoft\\_word\\_-\\_almrajgr\\_305.pdf](http://www.dlf.dk/upload/microsoft_word_-_almrajgr_305.pdf) (besøgt 20-05-2005)
- <http://www.fvm.dk/file/evalueringsrapport%2027061.pdf> (besøgt 17-05-2005)
- <http://www.omnicopia.com/herbage/files/H840.htm> (besøgt 01-06-2005)
- <http://www.ent.iastate.edu/imagegal/lepidoptera/armyworm/1343.80armyworm.html> (besøgt 03-06-2005)
- <http://www.uark.edu/misc/wheat/page-02/Insects/ArmyWorms.html&h=224&w=350&sz=20&tbnid=YjfxMIJQx9kJ:&tbnh=74&tbnw=11>

6&hl=da&start=52&prev=/images%3Fq%3Dfall%2Barmyworm%26start%3D40%26hl%3Dda%26lr%3D%26sa%3DN (03-06-2005)