

***In vitro* und *ad planta* Studien zum Einsatz  
von *Trichoderma*-Arten für die Biologische Kontrolle  
Holz abbauender Pilze an Bäumen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften  
der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

**Mark Schubert**

Freiburg im Breisgau  
2006

Dekan: Prof. Dr. H. Rennenberg  
Referent: Prof. Dr. S. Fink  
Korreferent: Prof. Dr. Dr. hc. G. Becker  
Betreuer: PD Dr. F.W.M.R. Schwarze

Datum der Disputation: 02.02.2007

„Der unermesslich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber wird der Mensch, soweit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis fortgeschritten sein mag, immer das sich wundernde Kind bleiben und muß sich stets auf neue Überraschungen gefaßt machen.“

Max Planck, 1918

---

## Danksagung

---

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Fink für die Überlassung des Themas, den gewährten wissenschaftlichen Freiraum bei der Durchführung der Arbeit sowie sein Vertrauen Lehrveranstaltungen selbstständig zu organisieren, sehr herzlich bedanken. Für die Übernahme des Korreferates bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gero Becker.

Zu Dank bin ich meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn PD Dr. Francis Schwarze verpflichtet. Die konstruktiven Diskussionen sowie sein freundschaftlicher Rat haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dieter Keck, BASF AG Ludwigshafen und Herrn Christoph Marx, Stadt Straßburg für die Bereitstellung von Bäumen, Hubsteigern, Klimadaten, Verpflegung und ihrer tatkräftigen Unterstützung während der Probenentnahmen in Schwindel erregender Höhe. Ohne ihre Hilfe wäre dieses Projekt nicht realisierbar gewesen.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Boppré und bei Herrn Kiesel, Forstzoologisches Institut sowie bei Frau Dr. Gack, Institut für Biologie I für die Hilfestellung bei der Rasterelektronenmikroskopie bedanken. Bei Herrn PD Dr. Leubner, Institut für Biologie II bedanke ich mich für die Möglichkeit der Osmolalitätsmessungen sowie bei Herrn PD Dr. Kopriva, Baumphysiologie für die Einführung und die ersten Ansätze in der Molekularbiologie.

Beim Evangelischen Studienwerk e.V. Villigst bedanke ich mich herzlich für das gewährte Promotionsstipendium.

Ganz besonders möchte ich mich für die freundliche Unterstützung, die Aufmunterungen und Anregungen sowie die vielen wertvollen Arbeiten bei allen Mitarbeitern der Professur für Forstbotanik, insbesondere bei (in alphabetischer Reihenfolge) Herrn R. Dietrich, Herrn E. Franz, Frau L. Gschwend, Herrn K. Merz, Frau S. Röske, Frau N. Streit und Frau K. Waldmann bedanken. Natürlich bedanke ich mich auch bei den Doktoranden und Ex-Doktoranden, insbesondere bei Jörg Grüner und Dr. David Ferner für die schöne und lustige Zeit am Institut.

Für die liebevolle und geduldige Unterstützung und die Durchsicht meiner Arbeit bin ich meiner Freundin zu unendlichem Dank verpflichtet sowie meiner Tochter, die mich durch ihr bezauberndes Lächeln aufs Beste ablenkte und mich immer wissen ließ, was wirklich wichtig im Leben ist. Und schließlich danke ich meiner Familie, die mir stets beiseite stand und Rückhalt gab.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 PROBLEMSTELLUNG .....	1
1.2 DIE GATTUNG <i>TRICHODERMA</i> .....	3
1.3 ZIEL DER ARBEIT .....	6
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>8</b>
2.1 CHARAKTERISIERUNG DER VERSUCHSORGANISMEN .....	8
2.1.1 Pilzarten .....	8
2.1.2 Baumarten .....	10
2.2 NÄHRMEDIEN.....	11
2.3 HISTOLOGISCHE STUDIEN.....	15
2.4 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE .....	17
2.5 PILZIDENTIFIKATION .....	19
2.5.1 Klassische Methodik.....	19
2.5.2 Molekularbiologische Charakterisierung.....	21
2.5.2.1 DNS Sequenzierung .....	23
2.5.2.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) .....	27
2.5.2.3 Mikrosatelliten .....	28
2.6 <i>IN VITRO</i> SCREENING ZUM ANTAGONISTISCHEN POTENZIAL VON <i>TRICHODERMA</i> .....	29
2.6.1 Index of Dominance ( $I_D$ ) .....	29
2.6.2 Dualkultur-Tests.....	30
2.6.2.1 Studien zum Mycoparasitismus .....	31
2.6.3 Detektion flüchtiger antibiotischer Substanzen.....	32
2.6.4 Interaktionsstudien an Platanenholz .....	32
2.6.4.1 Herstellung der Sporensuspension .....	33
2.6.5 Wachstums- und Sporenkeimungsraten.....	34
2.6.5.1 Einstellung der Wasseraktivität ( $a_w$ ) .....	35
2.7 <i>AD PLANTA</i> STUDIEN MIT <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> KARSTEN.....	36
2.7.1 VERSUCH A: Schnittflächenbeimpfung an Bäumen.....	36
2.7.1.1 Applikation .....	37
2.7.1.2 Re-Isolation.....	38
2.7.2 VERSUCH B: Infektionsversuche an Bäumen .....	39
2.7.2.1 Applikation und Inokulation .....	39
2.7.2.2 Probennahme und Wundparameter.....	40
2.7.2.3 Bestimmung des Wirkungsgrades [%] .....	41
2.7.3 Analyse der isolierten Pilzpopulationen (Diversitätsindices).....	41

2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	42
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
3.1 <i>IN VITRO</i> SCREENING ZUM ANTAGONISTISCHEN POTENZIAL VON <i>TRICHODERMA</i> .....	43
3.1.1 Dualkultur-Tests .....	43
3.1.1.1 Studien zum Mycoparasitismus .....	47
3.1.2 Wirksamkeit flüchtiger antibiotischer Substanzen .....	50
3.1.3 Interaktionsstudien an Platanenholz .....	52
3.1.3.1 Makro- und mikroskopische Beobachtungen .....	52
3.1.3.2 Gewichtsverlustmessungen .....	61
3.1.4 Wachstums- und Sporenkeimungsraten .....	66
3.1.4.1 Wachstumsraten .....	66
3.1.4.2 Sporenkeimungsraten .....	73
3.1.5 Gesamtauswertung der I <sub>D</sub> -Indices .....	79
3.2 <i>AD PLANTA</i> STUDIEN MIT <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> KARSTEN.....	81
3.2.1 VERSUCH A: Schnittflächenbeimpfung an Bäumen.....	81
3.2.1.1 Re-Isolationsergebnisse.....	81
3.2.1.2 Pilzanalyse.....	90
3.2.2 VERSUCH B: Infektionsversuche an Bäumen .....	97
3.2.2.1 Re-Isolationsergebnisse.....	97
3.2.2.2 Pilzanalyse.....	98
3.2.2.3 Auswertung der Wundparameter.....	102
3.2.2.4 Wirkungsgrad [%].....	110
3.2.3 PILZIDENTIFIKATION .....	112
3.2.3.1 Morphologische Charakteristika von <i>Trichoderma</i> .....	112
3.2.3.2 Molekularbiologische Charakterisierung .....	116
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>121</b>
4.1 <i>IN VITRO</i> SCREENING ZUM ANTAGONISTISCHEN POTENZIAL VON <i>TRICHODERMA</i> ...	121
4.1.1 Dualkultur-Tests .....	121
4.1.1.1 Diskussion zur Probenvorbereitung für REM .....	125
4.1.2 Antibiotische Substanzen .....	126
4.1.3 Interaktionsstudien an Platanenholz.....	127
4.1.3.1 Holzabbaumuster.....	129
4.1.4 Wachstums- und Sporenkeimungsraten.....	131
4.1.4.1 Diskussion zu den Einflussfaktoren .....	133
4.1.5 Index of Dominance (I <sub>D</sub> ) .....	135
4.2 <i>AD PLANTA</i> STUDIEN MIT <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> KARSTEN .....	138
4.2.1 Diskussion zu Versuch A und B .....	138
4.2.1.1 Re-Isolation.....	139

4.2.1.2 Wundparameter .....	142
4.2.1.3 Wirkungsgrad [%].....	145
4.2.2 Persistenz und Wirkung von <i>T. atroviride</i> auf dem Substrat.....	147
4.2.2.1 Abiotische Einflussfaktoren .....	147
4.2.2.2 Biotische Wechselwirkungen .....	150
4.2.3 Diskussion zur Pilzanalyse .....	153
4.2.3.1 Pilzidentifikation .....	154
4.2.3.1.1 Klassische Methodik .....	154
4.2.3.1.2 Molekularbiologische Charakterisierung .....	155
4.2.4 Formulierung und Applikation.....	156
4.2.4.1 Verfahren .....	156
4.2.4.2 Beeinträchtigungen von Nicht-Ziel-Organismen.....	158
4.3 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	159
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>161</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>163</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>165</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>185</b>

## Abkürzungsverzeichnis

(*); (**)	signifikant $p \leq 0,05$ ; hochsignifikant $p \leq 0,001$
6-PP	6-pentyl- $\alpha$ -pyrone
$a_w$	Wasseraktivität
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
bp	base pairs (Basenpaare)
BZ	Barrierezone
osmol $\text{kg}^{-1}$	Osmolalität (osmotischwirksame Teilchen/kg)
CFU	Colony Forming Units (Koloniebildende Einheiten)
CODIT	Compartmentalization of Decay in Trees
DNS	Desoxyribonucleinsäure
HMDS	Hexamethyldisilazane
H-Test	Kruskal-Wallis-Test
$I_D$	Index of Dominance
ITS	Internal Transcribed Spacer
$K_{\text{koef.}}$	Kalluskoeffizient
LNA	Low Nutrient Agar
MEA	Malzextraktagar
MP-PCR	Microsatellite Primed PCR
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
r	Korrelationskoeffizient
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REGWQ	Ryan-Einot-Gabrial-Weltsch-Test
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RZ	Reaktionszone
SNA	Slight Nutrient Agar
SSR	Simple Sequence Repeats
T-MEA	Malzextraktagar mit Thiabendazole
TSM (1); (2)	<i>Trichoderma</i> Selective Medium (1); (2)
VOC	Volatile Organic Compounds
$W_{\text{Grad}}$	Wirkungsgrad
$\chi^2$	Chi-Quadrat-Test

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 PROBLEMSTELLUNG

Im städtischen Einzugsgebiet leisten Bäume zur Erhöhung der Lebens- und Umweltqualität einen wesentlichen Beitrag. Sie dienen als Staubfilter, Lärm- und Sichtschutz, wirken regulierend auf das extreme Stadtklima und stellen für viele Tier- und Pflanzenarten Refugien dar. Aber auch ästhetische Gesichtspunkte und nicht zuletzt der monetäre Wert der Bäume rechtfertigen eine intensive Betreuung und Pflege.

Allerdings erschweren die in urbanen Gebieten vorherrschenden Bedingungen einen langfristigen Erhalt des Baumbestandes. Anthropogen bedingte Stressoren wie Schadstoffe, Trockenstress, Nährstoffmangel und regelmäßige Schnittmaßnahmen verringern die Vitalität und prädisponieren Bäume für typische, in urbanen Gebieten häufig auftretende Holz zersetzende Pilze. Insbesondere die durch Schnittmaßnahmen im Kronen- und Wurzelbereich verursachten Wunden können als Eintrittspforten für Wundparasiten dienen (GLASS & MCKENZIE, 1989; WARDLAW & NEILSEN, 1999). Im Holz etabliert, sind die invasiven Schaderreger in der Lage, die Stand- und Bruchsicherheit von Stadt- und Parkbäumen soweit zu reduzieren, dass diese auch ohne Windbelastung brechen und zu Personen- und Sachschäden führen können. Auf Grund des Gefahrenpotenzials und durch die einzuhaltende Verkehrssicherungspflicht führt dies oftmals zu kostspieligen Sicherungsmaßnahmen oder gar zur Fällung der pilzinfizierten Bäume (MALEK et al. 1999).

Schon früh erkannte man, dass der Wundbehandlung für den langfristigen Erhalt von Bäumen besondere Bedeutung zukommt. Robert HARTIG (1882), der Begründer der Forstpathologie, formulierte die Ziele, welche eine effektive Wundbehandlung erfüllen sollte:

„Die Behandlung der Wunden ergibt sich aus dem vorstehend Mitgetheilten. Sie hat zweierlei ins Auge zu fassen, einmal den Heilungsprocess und zweitens die Verhütung von Wundkrankheiten infectiöser und nicht infectiöser Art.“

Eine Wundbehandlung sollte demnach zum einen die vom Baum gebildeten Abwehrreaktionen nicht negativ beeinflussen, ggf. sogar fördern und zum anderen vor einer Infektion durch Pathogene schützen. Vor diesem Hintergrund wurde eine Vielzahl von Grundlagen bildenden Arbeiten durchgeführt. So leisteten SHIGO

(1984a,b), BALDER (1992 & 1993), LONSDALE (1992) und DUJESIEFKEN (1992 & 1995), DUJESIEFKEN et al. (1998) wichtige Beiträge über die beste Schnitfführung und den besten Schnittzeitpunkt von Bäumen sowie über die Wirkung und Pflanzenverträglichkeit chemischer und mechanischer Wundbehandlungen.

Nach dem heutigen gültigen Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen werden die zur Wundbehandlung eingesetzten Stoffe als Pflanzenschutzmittel (§ 2 Abs. 1 Nr. 9 PflSchG) eingestuft. Auf Grund dieser Tatsache ergeben sich in urbanen Gebieten einige Besonderheiten. So ist der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln nach dem Grundsatz der guten fachlichen Praxis (Integrierter Pflanzenschutz) auf das notwendige Maß zu beschränken und sollte nur dann Anwendung finden, wenn effektive mechanische, biotechnische oder biologische Methoden nicht zur Verfügung stehen (§ 6 Abs. 1 und 2, § 2 Abs. 1 Nr. 2 PflSchG).

In diesem Zusammenhang wurden bereits für die Entwicklung alternativer Pflanzenschutzverfahren verschiedene Untersuchungen, basierend auf der Verwendung antagonistischer Mikroorganismen, zur biologischen Kontrolle phytopathogener Erreger durchgeführt und dokumentiert (COOK & BAKER, 1983; CHET, 1990; CAMPBELL, 1994). Besondere Aufmerksamkeit gewannen zunehmend Arten der Gattung *Trichoderma* als effektive Antagonisten gegen eine Vielzahl von Pflanzenkrankheiten (PAPAVIZAS, 1985; CHET, 1987; ANDREWS, 1992; SAMUELS, 1996; HOWELL, 2003; HOITINK et al. 2006).

Beruhend auf diesen Ausführungen könnte der Einsatz von *Trichoderma*-Arten (Stämmen) für die biologische Kontrolle von Holz abbauenden Pilzen eine sinnvolle Alternative für die Wundbehandlung an Bäumen und eine Ergänzung des integrierten Baumschutzes in städtischen Bereichen darstellen.

### Biologische Kontrolle von Schadorganismen

Nachfolgend werden für ein besseres Verständnis einige wichtige Begriffe näher erläutert. Cook & Baker (1983) definierten die biologische Kontrolle als eine Beseitigung (Reduktion) des Inokulums eines Pathogens oder seiner Pflanzen schädigenden Aktivitäten durch den Einsatz eines oder mehrerer Organismen.

Heute ist die biologische Kontrolle ein fester Bestandteil des integrierten Pflanzenschutzes und umfasst zudem nach AUST et al. (1999) die gesteuerte Nutzung biologischer Vorgänge:

- Das Wissen über die Verhaltensweise von Schadorganismen
- Die Förderung pflanzeigener Schutzmechanismen gegenüber biotischen und abiotischen Schadfaktoren
- Der Einsatz von Antagonisten gegen Schaderreger

Die Anwendung von biologischen Pflanzenschutzverfahren zur Regulation von pathogenen Pilzen beruht auf einer *kurativen*, *eradikativen* oder *protektiven* Wirkungsweise (AUST et al. 1999). Die *kurative* Wirkung wird erzielt, wenn das Verfahren an bereits befallenen oder erkrankten Pflanzen angewendet wird und dadurch die vollständige Beseitigung des Erregers, während seiner Inkubationsphase, die Pflanze „kuriert“. Die *eradikative* Wirkung basiert auf der Reduktion des Inokulums des Pathogens (infektiöse Material) und soll das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen. Die *protektive* Wirkungsweise wird in vielen Fällen durch einen schützenden Belag auf der Pflanzenoberfläche, der einer Infektion vorbeugt, erzielt.

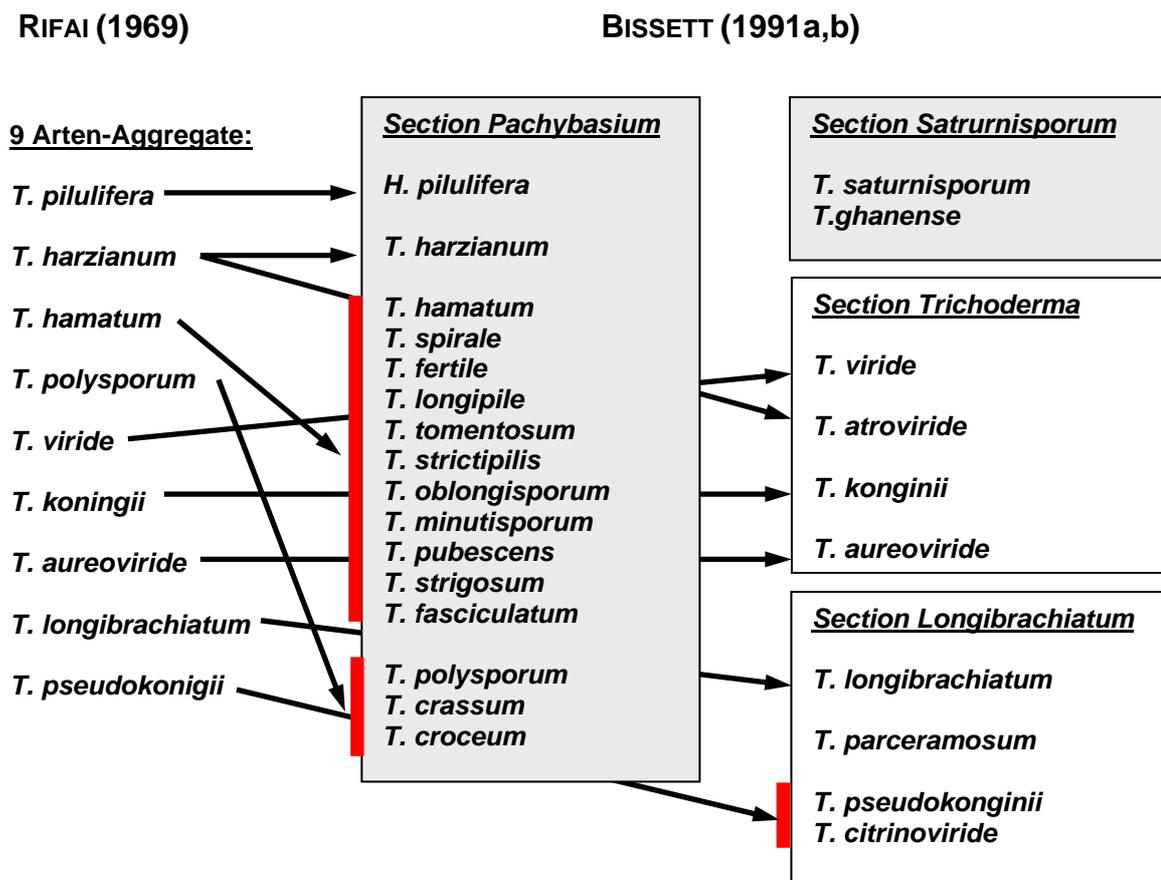
Als Pflanzenkrankheit definierte AGRIOS (1997) jegliche Beeinträchtigung des natürlichen Aufbaus, der Funktion und des ökonomischen Wertes einer Pflanze. In diesem Zusammenhang werden Pathogene demnach als Erreger eingestuft, die in der Lage sind, diese Beeinträchtigungen auszulösen.

## 1.2 DIE GATTUNG *TRICHODERMA*

Die Gattung *Trichoderma* ist eine der am häufigsten untersuchten Pilzgattungen weltweit und dennoch wird heute ihre Taxonomie noch diskutiert (KULLNING et al. 2002; SAMUELS, 2006). Die ersten Beschreibungen der charakteristischen Merkmale von *Trichoderma* spp. erfolgten bereits 1927 von GILMAN & ABBOTT und von BISBYS (1939). Ausgehend von morphologischen Kriterien, wie Myzelfarbe, Verzweigungstyp der Konidiophoren, Formen der Phialiden und der Konidien konnte RIFAI (1969) die Gattung *Trichoderma* in 9 Arten-Aggregate einordnen und bildete damit die bis heute gültige Grundlage der *Trichoderma*-Taxonomie. Im Laufe der Zeit wurde diese von BISSETT (1991a,b,c) überarbeitet und weiterentwickelt (Abbildung 1).

Wegen des bekannten anamorphen und dem Fehlen des telemorphen Stadiums wird *Trichoderma* spp. der Klasse der Deuteromyceten (*Fungi imperfecti*) zugeordnet. Durch die Anwendung moderner molekulargenetischer Verfahren konnten allerdings

phylogenetische Studien die verwandtschaftliche Beziehung zwischen *Trichoderma* (Anamorph) und dem Ascomyceten *Hypocrea* (Teleomorph) aufzeigen (LIECKFELDT et al. 2000; DODD et al. 2003; CHAVERRI & SAMUELS, 2004; DRUZHININA & KUBICEK, 2005). Zudem wurden in den letzten Jahren mit Hilfe dieser neuen Methoden immer wieder neue Arten entdeckt (WUCZKOWSKI et al. 2003; HOLMES et al. 2004; KRAUS et al. 2004), so dass mittlerweile die Gattung *Trichoderma* von 9 Arten-Aggregaten auf 100 einzelne, beschriebene Arten erweitert wurde (DRUZHININA et al. 2006).



**Abb. 1:** Vergleich der Arten-Konzepte von RIFAI (1969) und BISSETT (1984; 1991a,b; 1992) (GRADINGER, 2001).

Das antagonistische Potenzial von *Trichoderma* spp. beruht auf verschiedenen Mechanismen, die in zahlreichen Studien untersucht und diskutiert wurden (DENNIS & WEBSTER, 1971a,b,c; LEWIS & PAPAIVIZAS, 1980; LORITO et al. 1993 & 1994; CHET et al. 1998; HOWELL, 1998; HARMAN, 2006, HOITINK et al. 2006; WOO et al. 2006). Die Hemmung eines Pilzes durch *Trichoderma* spp. beruht auf:

- Produktion antibiotischer, volatiler und nicht-volatiler Substanzen. Diese Stoffe wirken auf die Permeabilität cytoplasmatischer Membranen und haben einen Efflux von wichtigen Zellinhaltsstoffen zur Folge (HOWELL, 1998).

- Mycoparasitierung und Ausscheiden lytischer Enzyme. Im Prozess der Parasitierung spielt das antimykotische Enzym-System von *Trichoderma* spp. bei der Erkennung, Bindung an und Zerstörung der Wirtszellwand eine entscheidende Rolle (SCHIRMBÖCK et al. 1994).
- Hohe Konkurrenzkraft um Nahrung und Raum. Sie findet Ausdruck durch das schnelle Wachstum und die hohe Produktion an asexuell gebildeten Konidien und Chlamydosporen (COOK, 1979; CHET, 1990; CHET et al. 1998).

Bereits 1932 wies WEINDLING die hemmende Wirkung von *Trichoderma lignorum* gegen verschiedene phytopathogene Pilze nach. Heute ist der Einsatz von potenten *Trichoderma*-Stämmen zur Regulation von vielen pilzlichen Schaderregern ein fester Bestandteil des Pflanzenschutzes (HJELJORD & TRONSMO, 1998). So finden mittlerweile auch kommerziell erhältliche *Trichoderma*-Produkte eine erfolgreiche Anwendung (MONTE, 2001). In der Landwirtschaft erfolgt zum Schutz der Kulturpflanzen der Einsatz gegen bodenbürtige Wurzelkrankheiten wie etwa *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, und *Sclerotium rolfsii* (LEWIS & PAPAVIDAS, 1980; KOMMEDAHL et al. 1981; LIFSHITZ et al. 1985; YEDIDIA et al. 1999; HOWELL et al. 2000; KOVACH et al. 2000). Für eine Applikation von *Trichoderma* spp. an Bäumen wurden zahlreiche Untersuchungen gegen wichtige Fäulepilze wie bspw. *Heterobasidion annosum* und *Armillaria* spp. sowie gegen den Erreger des Bleiglanzes *Stereum purpureum* durchgeführt (GROSCLAUDE et al. 1973; HOLDENRIEDER, 1984; BRUCE & HIGHLEY, 1991; BRUCE, 1992; HIGHLEY et al. 1997; SPIERS & BREWSTER, 1997; KWASNA, 1997; NICOLOTTI et al. 1999; VARESE et al. 1999; WANG et al. 2001; FOX, 2003).

Allerdings ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass zum einen eine grundsätzliche antagonistische Wirkung von *Trichoderma* spp. nicht gegen alle Schadpilze existiert. Und zum anderen kann das antagonistische Potenzial nicht nur zwischen *Trichoderma*-Arten, sondern auch zwischen Stämmen stark variieren (HANSON & HOWELL, 2004; HARMAN et al. 2004; KREDICS et al. 2004; HOITINK et al. 2006; SAMUELS, 2006; WOO et al. 2006). Beruhend auf diesen Ausführungen sind Untersuchungen mit definierten Antagonist/Pathogen-Kombinationen und unter Berücksichtigung aller Mechanismen im Antagonismuskomplex unerlässlich, um einen potenten *Trichoderma*-Stamm für den Einsatz zur biologischen Kontrolle zu selektieren. (KLOEPPER, 1991; SCHOEMAN et al. 1994; SAMULES, 1996; HOWELL, 2003; VIZCAINO et al. 2005; HARMAN, 2006).

Im städtischen Raum liegen bislang keine Erfahrungen über die Wirksamkeit von *Trichoderma*-Stämmen gegen die an Stadtbäumen häufig auftretenden Holz zersetzenden Pilze vor. Interessant ist die Beobachtung, dass die meisten Wundparasiten, die unsere Stadtbäume befallen, nur sehr selten im Wald auftreten. Mögliche Gründe hierfür dürften mit dem vermehrten Auftreten prädisponierender Faktoren und mit dem selteneren Vorkommen natürlicher Gegenspieler (Antagonisten) auf Standorten im Stadtbereich zusammenhängen.

### **1.3 ZIEL DER ARBEIT**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das antagonistische Potenzial der *Trichoderma*-Arten (-Stämme) gegen die Holz abbauenden Pilze *Ganoderma adspersum*, *Ganoderma lipsiense*, *Inonotus hispidus*, *Polyporus squamosus* und *Kretzschmaria deusta* in verschiedenen *in vitro*-Versuchen zu testen. Unter Beachtung möglicher chemischer und physikalischer Einflussfaktoren sollten die Wirkungsmechanismen von *Trichoderma* spp. studiert und letztendlich ein geeigneter *Trichoderma*-Stamm selektiert werden.

Die durchgeführten *ad planta*-Studien (Versuch A & B) sollten die erzielten *in vitro*-Ergebnisse komplettieren sowie bereits vorliegende Erkenntnisse im Bereich der biologischen Kontrolle Holz zersetzender Pilze ergänzen und um bisher unberücksichtigte Aspekte erweitern. Der Focus der Untersuchungen lag hierbei zum einen auf einer Formulierung und Applizierung eines Verfahrens, das den Antagonisten optimal auf dem Substrat etabliert und zum anderen auf einer exakten Bonitierung der Persistenz und des Wirkungsgrades unter Praxisbedingungen.

Im Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

#### **In vitro-Screening:**

- F-1: Besitzt *Trichoderma* spp. ein antagonistisches Potenzial gegen die Holz abbauenden Pilze?
- F-2: Inwieweit existieren Unterschiede zwischen den eingesetzten *Trichoderma*-Arten (-Stämmen)?

F-3: Welche Wirkungsmechanismen im Antagonismuskomplex von *Trichoderma* spp. sind bei der Regulation der Holz zersetzenden Pilze beteiligt?

F-4: Existieren Unterschiede zwischen den Holzzersetzern in Bezug auf die Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber *Trichoderma* spp.?

**Ad planta-Studien:**

F-1: Lässt sich ein Verfahren formulieren und applizieren, das den Antagonisten auf Schnittflächen von Bäumen optimal etabliert?

F-2: Wie ist die räumliche Verteilung des Antagonisten auf dem Substrat?

F-3: Welchen Einfluss haben abiotische und biotische Faktoren auf die Etablierung und Persistenz des Antagonisten?

F-4: Besitzt der selektierte *Trichoderma*-Stamm unter Praxisbedingungen eine protektive Wirkung gegen Holz abbauende Pilze?

F-5: Wenn ja, wie hoch ist der protektive Wirkungsgrad?

F-6: Ist auf den Schnittflächen eine natürliche Sukzession erkennbar?

F-7: Wenn ja, welche Organismen besiedeln den neu entstandenen Raum?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 CHARAKTERISIERUNG DER VERSUCHSORGANISMEN

#### 2.1.1 Pilzarten

Alle Holz zersetzenden Pilze, die bei den künstlichen Inokulationsversuchen verwendet wurden, stammten bis auf die Kultur *Inonotus hispidus* 221105.1 (Im Rahmen dieser Arbeit isoliert und kultiviert aus *Platanus x hispanica* Münchh., Freiburg i. Br.) aus den an der Professur für Forstbotanik vorhandenen Stammkulturen. Die Auswahl der Holzersetzer erfolgte auf Grund ihres häufigen Vorkommens in städtischen Gebieten sowie ihres natürlichen Auftretens an typischen Stadtbaumarten (Platane, Ahorn, Linde). Zudem sollten Pilze vertreten sein (Nr. 1, 2, 4 und 5), die über das Potenzial verfügen, das lebende Splintholz invasiv zu besiedeln (BODDY & RAYNER, 1983; JAHN, 1990; BUTIN, 1996; SCHWARZE & FERNER, 2003). Das enzymatische Holzabbau-Potenzial ist mit der Weiß- und Moderfäule nicht gänzlich abgedeckt. Auf Erreger der Braunfäule wurde bewusst verzichtet, da diese allgemein mit Koniferen assoziiert sind und daher in städtischen Gebieten eine untergeordnete Rolle spielen. Für eine genaue Beschreibung der eingesetzten Holz abbauenden Pilze wird auf entsprechende Fachliteratur verwiesen (KREISEL, 1961; BODDY & RAYNER, 1983; BREITENBACH & KRÄNZLIN, 1984 & 1986; SINCLAIR et al. 1987; JAHN, 1990; BUTIN, 1996; SCHWARZE et al. 1999).

**Tabelle 1:** In den Studien eingesetzte Holz abbauende Pilze

Nr.	Pilzart	Isoliert aus	Isolat-Nr.
1	<i>Polyporus squamosus</i> (Hud.:Fr.) Fr. (Schuppiger Porling)	ex <i>Tilia cordata</i> Mill. (Winterlinde)	291101.2 <sup>1</sup>
2	<i>Ganoderma adspersum</i> (S. Schulz.) Donk (Wulstiger Lackporling)	ex <i>Fagus sylvatica</i> L. (Rotbuche)	086699.2 <sup>1</sup>
3	<i>Ganoderma lipsiense</i> (Batsch) Atk. (Flacher Lackporling)	ex <i>Fagus sylvatica</i> L. (Rotbuche)	250593.1 <sup>1</sup>
4	<i>Inonotus hispidus</i> (Bull.:Fr.) Karsten (Zottiger Schillerporling)	ex <i>Fraxinus excelsior</i> L. (Esche)	200792.1 <sup>1</sup>
5	<i>Inonotus hispidus</i> (Bull.:Fr.) Karsten (Zottiger Schillerporling)	ex <i>Platanus x hispanica</i> Münchh. (Platane)	221105.1
6	<i>Kretzschmaria deusta</i> (Hoffm.) P.M.D. Martin (Brandkrustenpilz)	ex <i>Acer pseudoplatanus</i> L. (Bergahorn)	271098.1 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> = Die Isolate stammen aus den an der Professur für Forstbotanik vorhandenen Kulturen

Für die Auswahl der Antagonisten waren folgende Kriterien entscheidend. Zum einen sollte ein kommerziell erhältliches *Trichoderma*-Produkt (BINAB™ TF WP, Karlsborg, Schweden), das im Obstbau gezielt gegen *Stereum purpureum* (Bleiglanzkrankheit) eingesetzt wird (RICARD, 1981; MONTE, 2001) vertreten sein und zum anderen sollten in den *in vitro* Studien *Trichoderma*/Pathogen-Kombinationen ausgewählt werden, über die bisher keine veröffentlichten Daten vorliegen.

Des Weiteren sollte eine *Trichoderma*-Art (*Trichoderma atroviride*) getestet werden, die nach der Literatur über ein sehr großes antagonistisches Potenzial gegen viele phytopathogene Pilze verfügt (KULLNIG et al. 2000; HJELJORD & TRONSMO, 2003; LI et al. 2005; MCLEAN et al. 2005). Der Focus hierbei lag auf der Feststellung möglicher Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten von *T. atroviride* in Bezug auf das antagonistische Potenzial gegen Holz zersetzende Pilze.

**Tabelle 2:** In den Studien eingesetzte *Trichoderma*-Arten

Pilzart	Isoliert aus	Isolat-Nr.
<i>Trichoderma atroviride</i> Karsten	<i>Armillaria mellea</i> - Deutschland	15603.1 <sup>1</sup>
<i>Trichoderma atroviride</i> Karsten	Schale von <i>Citrus aurantium</i> - Israel	CBS 351.93 <sup>2</sup>
<i>Trichoderma atroviride</i> Karsten	Waldboden - USA	CBS 396.92 <sup>2</sup>
<i>Trichoderma fasciculatum (strictipile)</i> Bissett*	Rinde von <i>Betula</i> spp. - Niederlande	CBS 338.93 <sup>2</sup>
<i>Trichoderma virens</i> Miller, Giddens & Foster	Weißfaules Holz - Deutschland	CBS 126.65 <sup>2</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> Bissett	BINAB TF WP	IMI 206039 <sup>3</sup>
<i>Trichoderma polysporum</i> Bissett	BINAB TF WP	IMI 206040 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> = Die Isolate stammen aus den an der Professur für Forstbotanik vorhandenen Kulturen

<sup>2</sup> = Die Isolate stammen von Centraalbureau voor Schimmelcultures – Niederlande

<sup>3</sup> = Die Isolate stammen von BINAB Bio-Innovation AB

\* = *T. fasciculatum* Synonym *T. strictipile* (DRUZHININA & KUBICEK, 2005)

Auf Grund der Tatsache, dass die Gattung *Trichoderma* bereits in der Einleitung weitestgehend beschrieben wurde und auf Grund wenig vorhandener Literatur zu den einzelnen *Trichoderma*-Arten und –Isolaten, wird hier auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet.

### Anzucht und Erhalt der Pilzkulturen

Die Anzucht der Testpilze für die *in vitro* Studien, Pilzidentifikationen sowie für die Licht- und Rasterelektronenmikroskopie erfolgte auf dem Medium MEA, im Brutschrank bei 25°C im Dunkeln.

Zum Erhalt der Kulturen wurde frisches Myzel vom Kolonierand des jeweiligen Pilzes entnommen, auf das Minimalmedium SNA überimpft und anschließend mit Parafilm

zur Feuchtigkeitserhaltung verschlossen. Die SNA-Platten mit den angewachsenen Pilzkulturen wurden dann im Kühlschrank bei 4°C gelagert und in regelmäßigen Abständen erneuert.

### 2.1.2 Baumarten

Bei der Auswahl der Baumarten für die Feldstudien (Versuch A und B) mussten mehrere Restriktionen berücksichtigt werden. Bei der Mehrzahl der verwandten Bäume sollte es sich um Arten handeln, die in städtischen Gebieten auf Grund ihrer Eignung häufig angepflanzt werden, wie z.B. *Platanus x hispanica*, *Tilia platyphyllos* und *Acer pseudoplatanus* (MALEK et al. 1999). Zudem musste auf Baumarten zurückgegriffen werden, die für die Versuche in Bezug auf Vitalität, Höhe, BHD geeignet schienen, welche auf der jeweiligen Fläche (Stadt Nähe) zur Verfügung standen und an denen zum richtigen Zeitpunkt Schnittmaßnahmen vollzogen werden konnten. Somit wurden 6 verschiedene Arten und insgesamt 196 Bäume in den Feldstudien eingesetzt und ausgewertet (Tabelle 3).

Im Vorfeld wurden folgende Parameter der Bäume aufgenommen (siehe Anhang):

- Vitalität nach ROLOFF (2001): Stufen 0-3
- Baumdaten: BHD, Höhe, Alter, Kronendurchmesser
- Wuchsanomalien: Zwiesel, Drehwuchs, Beulen, Krebs, etc.
- Krankheiten: Käfer-, Pilzbefall
- Verletzungen: Kronen-, Stamm-, Wurzelschäden
- Besonderheiten: Trockenstress, Schleimfluss, unterständig, dominant, etc.

**Tabelle 3:** In den Feldversuchen eingesetzte Baumarten

Baumart	Standort	Anzahl	Versuch
<i>Platanus x hispanica</i> Münchh.	Ludwigshafen / Straßburg	91	A
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	Ludwigshafen / Freiburg-Lehen	40	A/B
<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	FreiburgLehen	24	B
<i>Populus nigra</i> L.	Ludwigshafen / Freiburg-Lehen	16	A/B
<i>Quercus rubra</i> L..	Freiburg-Lehen	16	B
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Ludwigshafen	9	A

Ø Vitalität der Bäume (ROLOFF, 2001): 1,3

Ø Kronendurchmesser: 9,2m

Ø Aststärke: 6,4cm

Ø Alter: 26

Ø BHD: 29cm

Ø Höhe: 12m

Durch die Wahl der Baumarten waren die Organisationsstufen des Hydrosystems II, III, IV und V und sowohl zerstreuporige als auch ringporige Arten vertreten (BRAUN, 1982). An dieser Stelle wird auf eine ausführliche Beschreibung der Baumarten und ihrer Anatomie verzichtet und auf entsprechende Fachliteratur verwiesen (BRAUN, 1970; GROSSER, 1977; BRAUN, 1982; WAGENFÜHR, 1996; SITTE et al. 2002).

## 2.2 NÄHRMEDIEN

Alle Medien wurden mit Aqua dest. auf 1000ml aufgefüllt, bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert und anschließend in Einmal-Petrischalen (Ø 94mm x 16mm, mit Nocken) gegossen. Eine Einstellung und Messung des pH-Wertes der Medien erfolgte mit einem pH-Meter (Consort P907) und entsprechenden Pufferlösungen. Für die Arbeiten Kultivierung, Isolation, Re-Isolation, Mikroskopie sowie für die *in vitro* Studien wurden folgende Nährmedien eingesetzt:

### LB – Medium

NaCl	10g
Trypton	10g
Hefeextrakt	5g
Ampicillin	50µg/ml
Bacto-Agar	15g (für LB-Agarplatten)

Das Medium wurde für die Anzucht der *Escherichia coli* Bakterien verwendet, die im Transformationsprozess eingesetzt wurden (SAMBROOK et al. 1989).

### SOC - Medium

Caseinhydrolysat	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	5g
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	15ml
MgSO <sub>4</sub> -Lösung	12,5ml
Glucoselösung	20ml

Dieses Medium wurde ebenfalls im Transformationsprozess eingesetzt und diente der ersten Zellvermehrung und Expression der Antibiotika-Resistenzgene.

**MEA – Malzextraktagar**

Malzextrakt	20g
Agar	20g

**MEA-A – Malzextraktagar + Antibiotika**

Malzextrakt	20g
Penicillin	1ml (124mg gelöst in 100ml H <sub>2</sub> O)
Streptomycin	1ml (400mg gelöst in 100ml H <sub>2</sub> O)
Tetracyclin	1ml (100mg gelöst in 100ml H <sub>2</sub> O)
Agar	20g

Um die aus den Abisolierungen gewonnenen Organismen, welche nicht auf T-MEA wachsen, in Reinkultur zu bringen und von Bakterienkontaminationen zu befreien, wurden dem Malzextrakt Antibiotika beigefügt. Im Text abgekürzt mit **MEA-A**.

**T-MEA – Malzextraktagar + Thiabendazole**

Malzextrakt	20g
Thiabendazole	2ml (0,46mg gelöst in 2ml Milchsäure)
Agar	20g

Um die Konkurrenzverhältnisse für Basidiomyceten zu verbessern wurde dem Malzextrakt Thiabendazole beigefügt. Dies unterbindet eine Kontamination und Entwicklung von Deuteromyceten auf dem Medium (SIEBER, 1995). Zudem wurden in einigen Fällen dem T-MEA auch Antibiotika (siehe Malzextraktagar + Antibiotika) beigefügt. Im Text abgekürzt mit **T -MEA-A**.

**SNA – Slight Nutrient Agar**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
KNO <sub>3</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5g
KCL	0,5g
Glucose	0,2g
Saccharose	0,2g
Agar	17g

Dieses Medium sollte zum einen die Ausbreitung schnell wachsender Pilze zu Gunsten langsamer Arten hemmen und zum anderen eine direkte Beobachtung

morphologischer Merkmale unter dem Mikroskop durch Entnahme von Agarblöcken erlauben (NIRENBERG, 1981). In einigen Fällen war eine Beigabe von Antibiotika notwendig. Im Text abgekürzt mit **SNA-A**.

#### **LNA – Low Nutrient Agar**

L-Asparagin	0,013g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,3g
KCL	0,5g
FeSO <sub>4</sub>	0.01g
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.008g
ZnSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,002g
CaNO <sub>3</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,05g
CuSO <sub>4</sub>	0.002g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,008g
Glucose	5g
Agar	10g

Dieses Medium wurde in den *in vitro* Studien verwendet, da es das Substrat Holz in der Nährstoffkomposition und im C:N – Verhältnis, im Gegensatz zum nährstoffreichen MEA, annähernd repräsentiert (SRINIVASAN et al. 1992).

#### **TSM (1) – *Trichoderma* selective medium**

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,9g
KCL	0,15g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1g
Glucose	3g
Chloramphenicol	0,25g
PCNB	0,2g (Pentachloronitrobenzene)
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> SNa	0,3g (4-dimethylaminobenzenediazo sulfonic acid)
Rose Bengal	0,15g
Agar	20g

**TSM (2) – *Trichoderma* selective medium**

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,9g
KCL	0,15g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1g
Glucose	3g
Chloramphenicol	0,25g
PCNB	0,2g (Pentachloronitrobenzene)
Captan	0,2g
Propamocarb	1,2ml
Rose Bengal	0,15g
Agar	20g

Für die Re-Isolation von *Trichoderma* spp. wurden 2 verschiedene, selektiv wirkende Nährmedien verwendet und auf ihre Eignung hin untereinander und mit dem Medium MEA bzw. SNA verglichen. TSM (1) wurde von ELAD et al. (1981) für die quantitative Isolation von *Trichoderma* spp. aus Böden entwickelt. ASKEW & LAING (1993) modifizierten die Zusammensetzung des Mediums und entwickelten das TSM (2). Beide Medien sollen die Entwicklung von Bakterien und schnellwachsenden Pilzen, wie z.B. *Mucor* spp. und *Rhizopus* spp., unterbinden und somit die Konkurrenzverhältnisse für *Trichoderma* spp. verbessern. Hierbei macht man sich die Tatsache zu nutze, dass *Trichoderma* spp. relativ tolerant gegenüber hohen Konzentrationen von PCNB und anderen Fungiziden ist und ferner auch bei geringen Konzentrationen an Glucose eine rasche Entwicklung aufweist (ELAD et al. 1981).

**Cellophan-Präparate**

Es wurden für die Pilzbestimmung und für die Studien zum Mycoparasitismus ca. 6x6cm große Cellophanstücke geschnitten, 20 Minuten bei 120°C autoklaviert und auf MEA gelegt. Auf die Folie wurde anschließend das Myzel überimpft und nach Entwicklung der Hyphen Teile aus dem Cellophan entfernt, in Milchsäure eingebettet und mikroskopisch ausgewertet. Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Cellophanpräparate, wie in Kapitel 2.4 näher beschrieben, aufgearbeitet.

## 2.3 HISTOLOGISCHE STUDIEN

### Fixierung der Proben

Aus allen relevanten gesunden, natürlich oder künstlich inokulierten Holzproben, die mikroskopisch untersucht werden sollten, wurden ca. 3 x 3 x 8 mm Stücke je nach Betrachtungsebene (radiale, tangentielle und axiale Ausrichtung) entnommen. Anschließend wurden die Proben in Fixierlösung (2%iges Glutaraldehyd, 0,1M Phosphatpuffer pH 7,2 – 7,4) gelegt, mittels einer Vakuumpumpe entgast und zur Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 – 8°C aufbewahrt.

### Einbettung

Die fixierten Proben wurden dreimal für jeweils zwei Stunden in Aqua dest. im Rotator geschwenkt und jeweils 12 Stunden mit einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe (50%, 70%, 90%, 96% V/V) entwässert. Anschließend wurden sie in 100%igem Isopropanol und Einbettlösung im Verhältnis 1:1 für 2 x 12 Stunden aufbewahrt und schließlich in mit 0,5% Katalysator versetzter Methacrylatharz-Monomer (FINK, persönliche Mitteilung) eingebettet. Hierzu wurden die Proben in Gelatine kapseln gemäß der gewünschten Schnittebene orientiert, mit Einbettlösung gefüllt und anschließend im Wärmeofen bei 60°C für 24 Stunden ausgehärtet.

### Anfertigung von Gewebeschnitten

Nach dem Aushärten und Abkühlen wurden die Gelatine kapseln entfernt und für die Analyse 2-3µm dicke Schnitte mit diversen Rotationsmikrotomen (Leica® Ultracut UCT, Leica® RM 2165 und Reichert-Jung® 2040 Autocut) angefertigt. Für die Durchlicht-Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie wurden die Dünnschnitte mit Hartmetall- und für detaillierte Studien mit Diamantmessern geschnitten.

Um einen Überblick über die Verteilung der Hyphen im Gewebe gewährleisten zu können, wurden zudem 25µm dicke Schnitte von größeren, nicht eingebetteten Holzproben mit einem Schlittenmikrotom (Leitz®) angefertigt. Diese Vorgehensweise verhinderte das Herauslösen der Hyphen aus den Präparaten.

## **Färben der Präparate**

Die standardmäßige Färbung der Gewebeschnitte erfolgte in einem Färbeautomaten HMS™ Series Programmable Slide Stainer von Carl-Zeiss®. Für die Autofluoreszenz blieben einige Schnitte ungefärbt.

### Normfärbung

- a) 24 Stunden in 3%iger Safranin- und 1%iger Acriflavinlösung
- b) 30 Minuten in 1%iger Auraminlösung
- c) 3 Minuten in 2%iger Methylenblaulösung

### Sudan IV

Um den Nachweis von Suberin erbringen zu können, wurden die Schnitte für 30 min in Trichlorethylen gebadet und für 10 Minuten in eine 0,5%ige alkoholische Sudan IV-Lösung getaucht.

### Toluidin-Blau-O-Färbung

Für den Nachweis von Lignin wurden die Präparate mit einer 0,05%igen wässrigen Toluidin-Blau-O-Lösung angefärbt. Nach 5-minütiger Behandlung wurden die Schnitte entnommen und anschließend wurde der Farbstoff aus den nicht-lignifizierten Partien herausgelöst (20min. in 20%iger, wässriger CaCl<sub>2</sub>-Lösung). Die lignifizierten Zellbestandteile sollten türkis erscheinen (HERR, 1992)

### Eisenchlorid

Für den Nachweis von Polyphenolen wurden die Schnitte für 20 Minuten in eine 2%ige ethanolische Eisenchlorid-Lösung gegeben.

### Autofluoreszenz

Um das Vorhandensein von Lignin oder Suberin zu verifizieren, wird allgemein die UV-Absorptionsfähigkeit von phenolhaltigen Bereichen ausgenützt. Hierbei werden die Präparate mit kurzwelligem Licht im ultravioletten Wellenlängenbereich zur Emission von längerwelligem Licht angeregt und unter dem Mikroskop betrachtet (BAUM, 2000). Die phenolhaltigen Bereiche, welche mit der Filterkombination BP 365-FT 395-LP 397 betrachtet wurden, fluoreszierten in einem hellen Blau.

### Acridinorange

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden zwei Schnitte je Probe mit Acridinorange angefärbt:

- a) Eine Stunde in 0,02%iger AcridinorangeLösung
- b) Spülen in Aqua dest.

Anschließend wurden die Proben mit der Filterkombination 450/490-FT 510-LP 520 nach der bereits beschriebenen Vorgehensweise angeregt und betrachtet.

### **Lichtmikroskopie und Fotodokumentation**

Die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Studien sowie deren Dokumentation erfolgten auf einem Zeiss<sup>®</sup> Axiophot Mikroskop mit digitaler Kamera (Zeiss<sup>®</sup> AxioCam MRc 5). Die makroskopischen Aufnahmen wurden mit einer auf einer Leitz Reprovit Vorrichtung montierten Kamera (Minolta 404si) aufgenommen. Für die Außenaufnahmen kam eine Canon 300D Digitalkamera zum Einsatz.

## **2.4 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE**

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops lassen sich Oberflächenstrukturen detailliert darstellen und betrachten. Die Proben werden in einer Vakuumkammer des Rasterelektronenmikroskops von einem Elektronenstrahl (Primärstrahl) abgetastet. Von der Oberfläche des Objektes werden Sekundärelektronen emittiert und von einem Detektor erfasst, so dass sich Bilder von großer Tiefenschärfe und hohem Auflösungsvermögen generieren lassen (SCHMIDT, 1994).

Um eine Beeinträchtigung von empfindlichen Oberflächenstrukturen durch das im Rasterelektronenmikroskop entstehende Hochvakuum (ca.  $5 \cdot 10^{-3}$  Pa) zu vermeiden und somit einer Artefaktbildung entgegenzuwirken, wurden die relevanten Präparate mit unterschiedlichen Verfahren (1-4) aufbereitet. Zudem wurden Präparate im Niedervakuumbereich (3 - 500 Pa) rasterelektronisch untersucht (5).

(1) Die Proben wurden zur Fixierung in 4%iges Glutaraldehyd 0,1 M Phosphatpuffer pH-Wert 7,2–7,4 gelegt und bei 4°C im Kühlschrank für 12 Stunden gelagert. Die Entwässerung erfolgte mit einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe (50%, 60%, 70%, 80%, 90% und 2x100%) für jeweils 10 Minuten. Anschließend wurden die Präparate luftgetrocknet.

- (2)** Die Proben wurden fixiert, entwässert und für 15 Minuten in Hexamethyldisilazane (HMDS) getaucht. Anschließend erfolgte die Trocknung bei Raumtemperatur an der Luft. HMDS ist ein organisches Lösungsmittel und wird als Trocknungsmittel für biologische Präparate eingesetzt. CHISSOE et al. (1994) verwendete HMDS erfolgreich als abschließende Behandlung für Blütenpollen.
- (3)** Nach der Fixierung und Entwässerung wurde die Trocknung der Proben mittels einer Kritisch-Punkt-Trocknung (Bal-Tec CPD 030) durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Substitution des Isopropanols durch flüssiges CO<sub>2</sub> gefolgt von einer Wärmung über den kritischen Punkt (31°C und 74bar). Diese Trocknung ist besonders schonend für die Objekte, da die flüssige und gasförmige Phase nicht mehr unterscheidbar sind und somit Oberflächenspannungen an den Objekten minimiert werden. Die Vorgehensweise erfolgte an Anlehnung an MOUSSA (2002), MEYER & PLASKOWITZ (1989) und TIEDT et al. (1987).
- (4)** Bei diesem Verfahren unterblieb eine vorherige Fixierung und Entwässerung. Die unbehandelten Proben wurden bei -27°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet (Christ® Alpha 1-4 LD).
- (5)** Für die rasterelektronenmikroskopischen Studien im Niedervakuumbereich blieben die Proben gänzlich unbehandelt. Hierbei wurde in der Elektronensäule ein Hochvakuum, hingegen im Probenraum ein Niedervakuum erzeugt. Das geringere Vakuum minimiert die Beeinträchtigungen und Kollabierungen von Oberflächenstrukturen und ist insbesondere für biologische und feuchte Präparate geeignet (SCHMIDT, 1994). Die Gasmoleküle, die im Probenraum sowohl durch die Primärelektronen als auch durch die von der Probe emittierten Elektronen ionisiert werden, neutralisieren die elektrostatischen Aufladungen auf der Probenoberfläche (SCHMIDT, 1994; BILLY, 2000). Somit konnte auf eine leitfähige Beschichtung (Bedampfung der Proben mit Gold) verzichtet werden.

Nach Aufbereitung der Proben wurden diese mit Hilfe von beidseitig klebenden Leit-Tabs auf 15mm kleinen Objektellern (Plano, Wetzlar) fixiert und, bis auf die Objekte für das Niedervakuum, anschließend mit Gold im nm-Bereich (Edwards Sputter Coater; Cressington Sputter Coater 108auto) für 2 min bedampft. Im Anschluss erfolgten die Studien im Hochvakuumbereich sowohl an einem Zeiss® DSM 940a (Forstzoologie, Universität Freiburg) als auch an einem Leica® S430 Rasterelektronenmikroskop (Biologie I, Universität Freiburg). Für die Untersuchungen im Niedervakuum kam das Leica® S430 Rasterelektronenmikroskop zur Anwendung.

## 2.5 PILZIDENTIFIKATION

### 2.5.1 Klassische Methodik

Die im Zuge der Re-Isolationen (Kapitel 2.7.1.2 und 2.7.2.2) gewonnen Organismen wurden für die Bestimmung sowohl auf MEA- als auch auf SNA-Platten vereinzelt und bei 25°C im Brutschrank gelagert (Bakterien wurden quantifiziert, aber nicht bestimmt). Nach Anwachsen der Pilzkulturen erfolgte eine systematische Gruppierung anhand makro- und mikromorphologischer Charakteristika. Wiesen auch nach 3 Wochen Myzelien keine Bestimmungsmerkmale auf, wurden diese als „Mycelia sterilia“ deklariert.

Die taxonomische Einteilung erfolgte nach dem Klassifizierungssystem von SITTE et al. (2002). Pilze, welche nicht der Abteilung Eumycota angehörten, wie z.B. Schleimpilze (Myxomycota), wurden mit Hilfe von Beschreibungen von ESSER (2000) näher charakterisiert. Für die Identifikation der Pilze aus den Klassen Chytridiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes und Deuteromycetes wurden die Bestimmungsschlüssel von DOMSCH et al. (1980), VON ARX (1981), WEBSTER (1983), WANG et al. (1990) und BARNETT & HUNTER (1998) verwendet.

Zur Differenzierung von Pilzen der Klasse Basidiomycetes wurde mit den jeweiligen Reinkulturen zusätzlich der Reagenzientest nach STALPERS (1978) durchgeführt, welcher das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Enzyme nachweist. Hierzu wurden die folgenden vier Reagenzien verwendet, von denen je ein Tropfen auf das Pilzmyzel gegeben wurde:

#### a) Laccase Test

Aqua dest.	2,0 ml
Ethanol (96 Vol.%)	48,0 ml
$\alpha$ -Naphthol	0,72 g

Bei einer blau-schwarzen Verfärbung des Myzels wurde der Nachweis für Laccase als positiv bewertet.

#### b) Peroxidase Test

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6 Vol.%)	3,0 ml
Aqua dest.	42,0 ml
Pyrogallol	0,45 g

Bei einer gelb-braunen Verfärbung des Myzels wurde der Nachweis für Peroxidase als positiv gewertet.

c) Tyrosinase Test

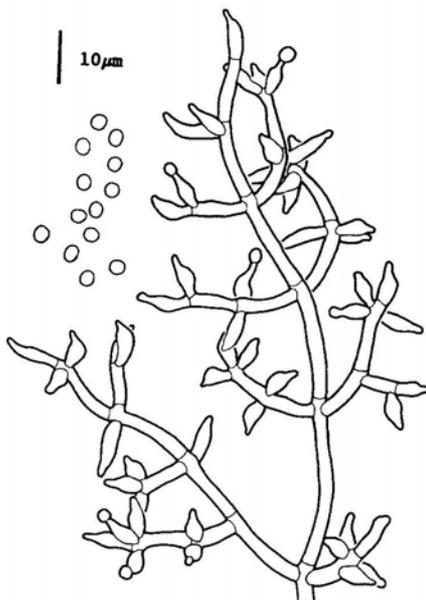
Aqua dest.	2,0 ml
Ethanol (96 Vol.%)	48,0 ml
p-Kresol	0,54 g

Bei einer orange-braunen Verfärbung des Myzels wurde der Nachweis für Tyrosinase als positiv gewertet.

d) Kalilaugen Test

Die wässrige KOH-Lösung (4 Vol.%) dient nicht dem Nachweis eines bestimmten Enzyms. Kalilauge kann bei verschiedenen Pilzen unterschiedliche Reaktionen hervorrufen. Deswegen stellt jede Farbveränderung eine positive Reaktion dar.

Nach 48 Stunden konnte man die Farbreaktionen des Myzels auf den Test beobachten. Die Bestimmung der Basidiomyceten erfolgte anschließend anhand gefundener morphologischer Merkmale sowie der Ergebnisse des Enzymtests mit Hilfe des rechnerunterstützten Bestimmungsschlüssel der Forestry Commission STALPERS (1978) und "Rotters" (ROSE, 1993).



**Abb.2:** Konidiophore und Konidien von *Trichoderma atroviride* Karsten (BISSETT, 1991c)

Für die Identifikation der *Trichoderma*-Arten wurden die von RIFAI (1969), BISSETT (1984, 1991a,b,c, 1992) und GAMS & BISSETT (1998) entwickelten Bestimmungsschlüssel verwendet. Als Grundlage dieser Schlüssel dienen neben der Wachstumsgeschwindigkeit auch Form und Farbe des Myzels sowie die Verteilung der Sporenlager auf einem bestimmten Nährmedium. Zusätzlich werden mikroskopische Merkmale, wie Form, Größe und Pigmentation von Konidiophoren, Philaliden, Konidien und Chlamydosporen zur Differenzierung herangezogen.

## 2.5.2 Molekularbiologische Charakterisierung

Die molekularbiologischen Arbeiten fanden sowohl an der Professur für Baumphysiologie als auch an der Professur für Forstbotanik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg statt.

### DNS-Extraktion

Es wurden ca. 100 mg des Pilzmyzels von Petrischalen entnommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tief gefroren und mechanisch aufgeschlossen. Die hochmolekulare chromosomale DNS wurde anschließend mit Hilfe des DNeasy-Plant Mini-Kits (QIAGEN, Hilden) und PhytoPure-Kits (Amersham Life Science, Buckinghamshire) isoliert. Die DNS-Extraktion erfolgte hierbei gemäß den Protokollen der Hersteller.

#### Isolierung der DNS mit DNeasy-Plant Mini-Kit

Die DNS wurde durch Zentrifugation und Bindung an Silica-Säulen von anderen Zellbestandteilen getrennt. Durch Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Puffer AP1 und RNase A (4  $\mu\text{l}$ ) wurde das Myzel bei  $65^{\circ}\text{C}$  lysiert. Proteine und Polysaccharide wurden durch Zugabe von 130  $\mu\text{l}$  Puffer AP2 und bei einem Inkubationsschritt von 10 min auf Eis gefällt und durch Zentrifugation im „QIAshredder“ entfernt. Das Gemisch wurde mit 1,5VOL. des Puffers AP3/E versetzt. Die DNS wurde durch hohe Salzkonzentrationen an eine Membran aus Silicagel gebunden und durch zwei Waschschriffe (Puffer AW, 500  $\mu\text{l}$ ) von restlichen Protein-, Polysaccharid- und Salzanteilen befreit. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  des Puffers AE wurde die DNS eluiert und sodann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Isolierung der DNS mit PhytoPure-Kit

Das Myzel wurde mit 600  $\mu\text{l}$  der Reagent 1-Lösung (versetzt mit 1% (v/v) Mercaptoethanol und RNase 20  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) vermischt und für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Es wurden 200  $\mu\text{l}$  des Reagent 2 hinzu pipettiert, für 10 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert und danach für 20 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Gemisch mit 500  $\mu\text{l}$  Chloroform ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) und 100  $\mu\text{l}$  Phyt PURE Extraktionskit versetzt, für 10 min sanft geschwenkt und danach bei 1300 x g zentrifugiert. Die Oberphase wurde entnommen und, entsprechend dem Volumen der Oberphase, Isopropanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) zugegeben. Durch Zentrifugation (5000 x g) wurde die DNS pelletiert und mit 70%

EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet für 10 min an der Luft getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O (bidest) aufgenommen.

### **PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Mit der von MULLIS et al. (1986) entwickelten Methode der PCR (Polymerase Chain Reaction) wurden selektiv bestimmte Abschnitte der DNS exponentiell amplifiziert. Die hierbei eingesetzten Oligonukleotide (Primer) dienen in dieser Reaktion als Startermoleküle. Der Abschnitt, den die Primer beidseitig flankierten, wird in jedem Zyklus der Reaktion verdoppelt. Der Zyklus besteht aus 3 Schritten:

1. Die doppelsträngige DNS wird bei der Hitzedenaturierung bei 94 °C in Einzelstränge aufgespaltet.
2. Die Primer lagern sich (Annealing) bei einer primerspezifischen Temperatur an die DNS-Einzelstränge an.
3. Es folgt die Synthese des komplementären DNS-Doppelstranges (Elongation) bei optimaler Arbeitstemperatur der DNS-Polymerase bei 72-75°C.

Die Wahl der richtigen Annealingtemperatur ist für das Ergebnis der PCR entscheidend. Wird die Temperatur zu niedrig gewählt treten durch unspezifische Primerbindungen unerwünschte Nebenprodukte auf. Wird sie hingegen zu hoch gewählt, ist es möglich, dass es zu keiner Primerbindung an die DNS-Matrize und somit zu keinem PCR-Produkt kommt (MULLIS et al. 1986).

Auf Grund unterschiedlicher Anforderungen und Fragestellungen wurden verschiedene Reaktionsansätze, PCR-Protokolle und Primer eingesetzt. Eine genaue Beschreibung der Primer sowie einen genauen Ablauf der PCR-Programme erfolgen in den Kapiteln 2.5.2.1, 2.5.2.2 und 2.5.2.3. Die PCR wurde zum einen mit einem Thermocycler Stratagene<sup>®</sup>/Robocycler Gradient 40 (Professur für Baumphysiologie) sowie mit einem Mastercycler<sup>®</sup> ep (Professur für Forstbotanik) durchgeführt.

### **Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration**

Für die Konzentrationsbestimmung und Ermittlung der Reinheit der DNS-Lösung wurde die optische Dichte (OD) mit einem Spektralphotometer (Beckman DU-7500i Spectrometer; Analytik Jena SPECORD S 100) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Dabei entspricht der Absorptionswert 1 (OD) bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1cm einer Konzentration von 50 µg/ml

doppelsträngiger DNS. Die DNS-Lösungen wurden jeweils mit einer Verdünnung von 1:10 gemessen. Der Leerwert wurde mit Aqua dest. eingestellt.

Für die Berechnung der DNS-Konzentration ( $c(\text{DNS})$ ) wurden der bei 260nm gemessene Absorptionswert ( $abs$ ), die DNS-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  bei 1 OD (Faktor DNS) und der Verdünnungsfaktor 10 (Verdünnung 1:10) berücksichtigt. Entsprechend wurde folgende Formel verwendet:

$$C(\text{DNS}) = \text{Absorptionswert (abs) } 260\text{nm} * \text{Faktor DNS} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Eine Aussage bezüglich der Reinheit der DNS-Lösung kann mit Hilfe des Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ( $Q A_{260}/A_{280}$ ) getroffen werden. Bei sehr reinen DNS-Lösungen sollte der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein kleinerer Wert deutet auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, wo hingegen ein größerer Wert auf das Vorhandensein von RNA schließen lässt (SAMBROOK et al. 1989).

### **Agarose-Gelelektrophorese**

Im Anschluss an die PCR wurde zur qualitativen Analyse der Amplifikationsprodukte eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Lineare doppelsträngige DNS ist auf Grund ihres Phosphordiester-Aufbaues negativ geladen und bewegt sich im elektrischen Feld zum positiven Pol.

Die DNS-Abschnitte wurden bei 80 (100) Volt, variabler Stromstärke und für ca. 60min in einem, je nach Anforderung, 1%igen bzw. 2%igen TBE-Agarosegel (1 x TBE-Laufpuffer) aufgetrennt (kleinere DNS-Fragmente wandern in der Agarosematrix schneller als größere). Mittels Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g/ml}$ ), einem fluoreszierenden Farbstoff, der in die DNS-Doppelhelix interkaliert und sie unter UV-Licht sichtbar macht, wurden die DNS-Abschnitte angefärbt. Somit konnte anschließend die Auswertung und Fotodokumentation auf einem UV-Tisch erfolgen.

#### **2.5.2.1 DNS Sequenzierung**

Bei der Sequenzierung wird die Nukleotid-Abfolge der DNS direkt bestimmt. Ein häufig verwendeter Kennmarker ist die ITS (Internal Transcribed Spacer)-Region der nukleären ribosomalen DNS. Die Vorteile der ITS-Region sind zum einen, dass durch die konservativen ITS-flankierenden 18 S, 26 S und 5,8 S-Einheiten für Pflanzen und Tiere von universell geltenden Primern ausgegangen werden kann, und zum

anderen ist die ITS-Region, auf Grund ihrer Kürze, auch bei stark degenerierter DNS noch sequenzierbar (WHITE et al. 1990).

In dieser Arbeit wurden für die Identifikation unbekannter *Trichoderma*-Arten die ITS 1 und 2 Region vervielfältigt und sequenziert (HERMOSA et al. 2000; KUBICEK et al. 2003; PRYCE et al. 2003; WUCZKOWSKI et al. 2003; HERMOSA et al. 2004; MAYMON et al. 2004).

Zudem wurde die ITS 1 und 2 Region von 4 Basidiomyceten (*Ganoderma adspersum*, *G. lipsiense*, *Inonotus hispidus* 200792.1 und *Polyporus squamosus*) und von einem Ascomyceten (*Kretzschmaria deusta*) sequenziert (HSEU et al. 1996; JASALAVICH et al. 2000; OH et al. 2003).

### PCR zur Amplifizierung der ITS-Region

Die PCR zur Amplifizierung der ITS Region wurde unter Verwendung der Oligo-Primer (Tabelle 4) und mit folgendem Ansatz sowie PCR-Protokoll durchgeführt (Thermocycler Stratagene®/Robocycler Gradient 40):

**Tabelle 4:** Sequenz, Schmelztemperatur ( $T_m$ ) und G+C-Gehalt der Primer (MWG-Biotech)

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur	G+C-Gehalt (%)
trRNAf	5'-AAG TCG TAA CAA GGT CTC C-3'	54,5 °C	47,4
trRNAr	5'-TGA TAT GCT TAA GTT CAG C-3'	50,2 °C	36,8

Der Reaktionsansatz (50µl) enthielt: Steriles Wasser (26,5µl), Mg-Reaktionspuffer (5µl), 25mM MgCl<sub>2</sub> (5µl), Primer forward (5µl), Primer reverse (5µl), 10 mM dNTP mix (1µl), *Taq* DNA polymerase (0,5µl), DNS (2µl).

#### PCR-Protokoll:

Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	
Annealing	48 °C	1 min	<b>x 30 Zyklen</b>
Elongation	72 °C	1 min	
Abschließende Elongation	72 °C	5 min	
Abkühlung	4 °C	30 min	

### **Isolierung und Aufreinigung von DNS Fragmenten**

Nach der Gelelektrophorese wurden ca. 100mg der unter UV-Licht sichtbaren Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Elution der DNS-Fragmente wurde das Jetsorb-Kit der Firma Genomed verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Es wurden den 100mg Probe 300 µl A1 Puffer und 10 µl Jetsorbsuspension zugegeben. Um die DNS zu binden, wurde die Lösung für 15 min bei 50 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde alle 3 Minuten das Gemisch zur schnelleren Auflösung geschwenkt. Anschließend wurde für 30s zentrifugiert (14000 U/min), der Überstand verworfen, 300 µl A1 Puffer zugegeben und erneut bei 14000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 300 µl A2 Puffer gelöst und ebenfalls bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und der Vorgang (Zugabe von A2 Puffer und Zentrifugation) ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in H<sub>2</sub>O (bidest) resuspendiert. Abschließend wurde die Lösung für 5 min bei 50 °C inkubiert und abermals zentrifugiert. Der Überstand enthielt die gereinigte DNS und wurde bei 4 °C gelagert.

### **Klonierung von Amplifikationsprodukten**

DNS-Fragmente lassen sich mit Hilfe von Enzymen in zuvor aufgeschnittene Plasmide einfügen, religieren und zur Vervielfältigung in Bakterien transformieren. Die Klonierung erfolgte hierbei mittels des Klonierungskit TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen), wobei chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen des Stammes INVαF' sowie die Plasmidvektoren PCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> verwendet wurden. Die Ligation, Transformation sowie die Isolierung rekombinanter Plasmide erfolgte gemäß den Protokollen der Hersteller.

#### Ligationsreaktion

Für die Ligation des PCR Produktes in das Plasmid wurde die T4 DNA Ligase verwendet. Das Enzym katalysiert die Bindung einer Phosphordiesterbindung zwischen 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxygruppe unter Verwendung von ATP (SHUMAN, 1994). Es wurden 3 µl des PCR Produktes, 1 µl des Vektors PCR2.1-TOPO, 1 µl Ligationspuffer, 4 µl H<sub>2</sub>O (bidest) und 1 µl T4 DNA Ligase vermischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Ligationsreaktion erfolgte eine Kühlung auf Eis.

### Transformation

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen (INVα F') mit 4 µl des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. In einem Wasserbad (42 °C) für 30s erfolgte die Transformation. Anschließend wurde, um eine erste Zellvermehrung und die Expression der Antibiotika-Resistenzgene zu erzielen, der Ansatz für 2 min auf Eis gestellt, mit 250 µl SOC Medium versetzt und für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach vollständiger Transformation wurde die Suspension auf LB-Agarplatten, die mit Ampicillin versetzt waren, ausgestrichen (200 µl) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### Selektion rekombinater Plasmide

Die Selektion rekombinanter Plasmide erfolgte auf der Grundlage der α-Kontemplation des verwendeten *E. coli* Stammes. Durch die Transformation besitzen diejenigen Bakterien, welche die Plasmide aufgenommen haben eine vermittelte Ampicillinresistenz und bildeten weiße Kolonien auf dem LB-Agar. Hingegen waren die Kolonien der Bakterien, die ein Plasmid ohne Fremd-DNS aufgenommen haben, dunkelblau gefärbt.

### Isolierung rekombinater Plasmide

Die Isolierung rekombinanter Plasmide wurde mit dem QIAprep Miniprep Kit durchgeführt. Hierbei wurden *E. coli* Bakterien durch Zentrifugation geerntet und in 250 µl des RNase-haltigen Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 250 µl Puffer P2 lysiert, die Suspension dann durch gründliches Mischen mit 350 µl Puffer P3 neutralisiert und durch eine weitere Zentrifugation wurden unlösliche Bestandteile entfernt. Der verbliebene Überstand enthielt die Plasmid-DNS und wurde auf QIAprep-Säulchen (QIAprep Spin Column) aufgetragen, zentrifugiert und mit Puffer PB und PE gewaschen. Die Elution der gereinigten DNS erfolgte mit 50 µl sterilem Wasser durch eine abschließende Zentrifugation (10000 x g) für 1 min. Abschließend wurde mit einem Teil der DNS-Lösung ein Plasmidverdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* durchgeführt.

### **Sequenzierung und Sequenzanalyse**

Die Sequenzierung der aus den Klonierungen hervorgegangenen Plasmide wurde als Auftragsarbeit an die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) geschickt. Mittels der

Sequenzierereinheit LI-COR DNA Analyser Gene Reader 4200 wurden die Sequenzen an beiden Strängen generiert und editiert. Anschließend erfolgte eine Analyse der erhaltenen Basenabfolgen in vorhandenen Gendatenbanken. Hierbei wurden die Sequenzen mittels einer BLAST-Suche (<http://workbench.sdsc.edu>) auf mögliche Homologien mit dortigen Sequenzen verglichen.

#### **2.5.2.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

Diese PCR-Variante, die von WILLIAMS et al. (1990) entwickelt wurde und bei der keine Informationen zum Zielgenom vorliegen müssen, wird mit mehr oder weniger willkürlich gewählten Decamer-Oligonukleotid-Primern, die einen hohen G+C-Anteil aufweisen und an polymorphe DNS binden, durchgeführt. Durch die Wahl einer unstringenten, niedrigen „Annealing“-Temperatur lagert sich der Primer zufällig an verschiedene komplementäre Bereiche im Chromosom an und führt zu einer Vervielfältigung unbekannter Sequenzen und somit zu einem reproduzierbaren DNS-Bandenmuster.

Mit Hilfe des spezifischen Bandenmusters („Fingerabdruck“) können taxonomische Untersuchungen sowohl auf Gattung-Ebene als auch auf Art- und Stammebene durchgeführt werden (WILLIAMS et al. 1990). Die RAPD-PCR wurde bereits erfolgreich zur Identifikation von *Trichoderma*-Arten eingesetzt und sollte in dieser Arbeit die Re-Identifikation des in den Feldstudien eingesetzten Antagonisten (*Trichoderma atroviride* Karsten) erleichtern (RANGANATH & SHYAM PRASAD SHEEBA 2002; WILLIAMS et al. 1990; ZIMAND et al. 1994; CASTLE et al. 1998; LIECKFELDT et al. 1998; CHEN et al. 1999; McLEAN et al. 2005).

#### **RAPD-PCR**

Im Vergleich zur konventionellen PCR-Methode, bei der zwei Oligonukleotide jeweils an einen der beiden DNS-Stränge hybridisieren, werden bei der RAPD-PCR dekamere (10 Oligonukleotide) Single-Primer eingesetzt (Tabelle 5).

Die RAPD-PCR wurde mit folgendem Reaktionsansatz und PCR-Protokoll durchgeführt (Mastercycler<sup>®</sup> ep):

**Tabelle 5:** Sequenz, Schmelztemperatur ( $T_m$ ) und G+C-Gehalt der Primer (Carl Roth GmbH)

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur	G+C-Gehalt (%)
Chen203	5'-CAC GGC GAG T-3'	37 °C	70
Chen238	5'-CTG TCC AGC A-3'	37 °C	60

Der Reaktionsansatz (20µl) enthielt: Steriles Wasser (x µl), RED-Extract-N-Amp PCR reaction mix (10µl) (Sigma), Primer (y µl), DNS (4µl).

*PCR-Protokoll:*

Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	
	74 °C	7 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	<b>x 39 Zyklen</b>
Annealing	37 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Abschließende Elongation	72 °C	10 min	
Abkühlung	4 °C	30 min	

### 2.5.2.3 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten sind kurze DNS-Sequenzabschnitte, in denen ein bestimmtes Nukleotidmuster von bis zu sechs Basenpaaren mehrfach wiederholt wird (simple sequence repeats, SSR). Diese Mikrosatelliten kommen in eukaryotischen Organismen häufig vor, sind relativ gleichmäßig über das Genom verteilt, heritabel und können sowohl art- als auch stammspezifisch sein (WANG et al. 1994).

Polymorphismen zwischen verschiedenen Genotypen entstehen durch die variierende Anzahl an Wiederholungen eines Nukleotidmusters. Sind diese flankierenden Bereiche eines solchen DNS-Abschnitts bekannt, können die Mikrosatelliten über eine MP-PCR spezifisch amplifiziert werden (WANG et al. 1994). Diese Methode der MP-PCR wurde auf Grund der hohen Stammspezifität eingesetzt und sollte eine Unterscheidung von Individuen (Stämmen) ein und derselben *Trichoderma*-Art ermöglichen (TENZER et al. 1999; AVIS et al. 2001; LI et al. 2002, ENKERLI et al. 2005; NAEF et al. 2006).

### MP-PCR

Die bei der MP-PCR eingesetzten Primer (Tabelle 6) sowie das durchgeführte PCR-Protokoll erfolgten an Anlehnung an NAEF et al. (2006).

Folgender Reaktionsansatz und Zyklen wurden für die Amplifizierung verwendet (Mastercycler<sup>®</sup> ep):

**Tabelle 6:** Sequenz, Schmelztemperatur ( $T_m$ ) und G+C-Gehalt der Primer (Biomers.net)

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur	G+C-Gehalt (%)
MS-Ta4f	5'-ATC TGG CAC TGC TTG GTA GG-3'	52 °C	55
MS-Ta4r	5'-TCG ATC GCC TTC GTA TTA GG-3'	52 °C	50

Der Reaktionsansatz (20µl) enthielt: Steriles Wasser (x µl), RED-Extract-N-Amp PCR reaction mix (10µl) (Sigma), Primer forward (y µl), Primer reverse (y µl), DNS (4µl).

*PCR-Protokoll:*

Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	60 °C	30 s	<b>x 35 Zyklen</b>
Elongation	72 °C	1 min	
Abschließende Elongation	72 °C	10 min	
Abkühlung	4 °C	30 min	

## 2.6 *IN VITRO* SCREENING ZUM ANTAGONISTISCHEN POTENZIAL VON *TRICHODERMA* SPP.

### 2.6.1 Index of Dominance ( $I_D$ )

MAGAN & LACEY (1984) entwickelten für die *in vitro* Dualkultur-Tests (Konfrontationstests) den so genannten Index of Dominance ( $I_D$ ), der im weiteren Verlauf von RAMAKRISHNA et al. (1993) und MARIN et al. (1998) leicht verändert wurde.

Durch die Vergabe von Punkten von 1 bis 5 lässt sich die Konkurrenzkraft und das antagonistische Potenzial von einzelnen Organismen durch den  $I_D$ -Index quantitativ darstell- und vergleichbar machen. Hierbei steht der Wert 1 für keine bzw. eine sehr geringe, hingegen der Wert 5 für eine sehr hohe Konkurrenzkraft.

In dieser Arbeit wurde die Verwendung des Index of Dominance ( $I_D$ ) dahin gehend modifiziert und erweitert, dass er nicht nur als Bewertungsgrundlage für die

Dualkultur-Tests diente, sondern zusätzlich auf alle durchgeführten *in vitro* Studien zum antagonistischen Potential von *Trichoderma* spp. angewendet werden konnte (Tabelle 7). Dies sollte zum einen die Darstellung der Konkurrenzkraft der einzelnen *Trichoderma*-Arten in Abhängigkeit des jeweiligen Versuches erleichtern. Zum anderen sollte abschließend ein quantitativer Vergleich der eingesetzten *Trichoderma*-Arten in Bezug auf ihr antagonistisches Potenzial möglich sein.

**Tabelle 7:** Übersicht über die Vergabe von  $I_D$ -Indices

<i>In vitro</i> Studien	Index of Dominance ( $I_D$ )	Bewertung
Dualkultur-Tests	$I_D$ I	1 bis 5
Wirksamkeit flüchtiger Substanzen	$I_D$ II	1 bis 5
Interaktionsstudien an Holz	$I_D$ III	1 bis 5
Wachstumsraten	$I_D$ IV	1 bis 5
Sporenkeimungsraten	$I_D$ V	1 bis 5

Für jede *Trichoderma*-Art wurde pro durchgeführten Test ein  $I_{DX}$ -Index ermittelt. Hierbei wurden die beobachteten Interaktionen zwischen Pathogen/*Trichoderma* sp. typisiert, gemittelt und dem entsprechenden Index-Wert zugewiesen. Bei einer numerischen Datengrundlage wurden 5 gleichmäßige Gruppen gebildet, wobei jede Gruppe für einen entsprechenden  $I_D$ -Wert stand. Der in dem jeweiligen Test ermittelte Durchschnittswert von jeder *Trichoderma*-Art erlaubte anschließend eine Zuordnung zu einer der 5 Gruppen und damit die Vergabe eines  $I_D$ -Wertes.

Der Gesamtindex  $I_D$  für jede *Trichoderma*-Art wurde mit folgender Formel berechnet:

$I_D$ -Index = Summe der ermittelten Indices  $I_{DX}$  / Summe der durchgeführten Tests.

$$I_D\text{-Index} = \frac{\sum I_{DX}}{\sum T_X}$$

### 2.6.2 Dualkultur-Tests

Um die *in vitro*-Hemmwirkung von *Trichoderma* spp. gegenüber den Holz zersetzenden Pilzen zu ermitteln wurden Dualkultur-Tests mit jeder *Trichoderma*/Pathogen Kombination (n=6) durchgeführt. Als Kontrolle dienten jeweils Platten ohne Antagonisten. Es wurden 5x5mm große Myzelstücke aus 2 Wochen alten Kulturen der Holz zersetzenden Pilze auf die Medien MEA (pH-Wert 5 und 7) und LNA (pH-Wert 5 und 7) am Rand (10mm) der Petrischale inokuliert. Nach

Anwachsen des Myzels (2cm) wurde die gegenüberliegende Seite der Platte mit Myzelstücken von *Trichoderma*-Kulturen (2 Wochen alt, 5x5mm) inokuliert, anschließend mit Parafilm verschlossen und bei 25°C und einer Inkubationszeit von 4 Wochen im Brutschrank gelagert. Während der Inkubationszeit wurden die Proben in regelmäßigen Abständen visuell kontrolliert und Besonderheiten dokumentiert. Hierbei dienten als Indikatoren für den Grad der Parasitierung die für *Trichoderma* spp. typischen grünlichen Sporenlager (NAÁR & KECSKÉS, 1998). Bildeten sich diese Lager auf dem Myzel des Holz zersetzenden Pilzes, so wurde dies als erfolgreiches Überwachsen und Parasitieren gewertet. Da eine Abwesenheit der Sporenlager nicht zwingend auf ein Fehlen von *Trichoderma* spp. hindeutet, wurden zur Verifizierung aus den sporenlagerfreien Bereichen Agarscheiben (Ø 5mm) mit einem Korkbohrer entnommen und auf das selektive Medium TSM (2) von ASKEW & LAING (1993) gelegt. Nach 7tägiger Inkubationszeit bei 25°C wurden diese auf Wachstum von *Trichoderma* spp. überprüft. Um die Frage zu klären, ob *Trichoderma* spp. in der Lage war, die Holz abbauenden Pilze während der 4wöchigen Inkubationszeit abzutöten, wurde nach der Methode von HIGHLEY & RICARD (1988) vorgegangen. Hierbei wurden aus dem Myzel des Holzersetzers Ø 5mm große Scheiben entfernt und auf das für Basidiomyceten selektive Medium T-MEA gelegt. War nach 2 Wochen Inkubationszeit bei 25°C kein Wachstum des Holzersetzers feststellbar, wurde dies als "abgetötet" bewertet. Ferner erfolgte die Vergabe der I<sub>D</sub> I-Indices.

**Tabelle 8:** Matrix für die Typisierung und Verteilung der I<sub>D</sub> I-Indices

Typisierung	I <sub>D</sub> I
Kein Überwachsen und keine Parasitierung des Myzels	1
In 30-49% der Fälle das Myzel parasitiert und abgetötet	2
In 50-69% der Fälle das Myzel parasitiert und abgetötet	3
In 70-89% der Fälle das Myzel parasitiert und abgetötet	4
In 90-100% der Fälle das Myzel parasitiert und abgetötet	5

### 2.6.2.1 Studien zum Mycoparasitismus

Um die Interaktionen zwischen Antagonist/Pathogen und die Mechanismen des Mycoparasitismus genauer zu untersuchen, wurden Dualkultur-Tests auf den Medien SNA, MEA und auf Cellophan durchgeführt (n=3).

Aus den Interaktionsbereichen wurden aus dem Medium SNA ca. 10x15mm große Agarblöcke entnommen und direkt unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Mittels eines Korkbohrers wurden aus dem Medium MEA Proben (Ø 5mm) ausgestanzt und für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet. Sowohl für die Licht- als auch für die Rasterelektronenmikroskopie dienten die Cellophanpräparate, aus denen ca. 5x5mm große Bereiche herausgeschnitten wurden.

### **2.6.3 Detektion flüchtiger antibiotischer Substanzen**

Unter Laborbedingungen wurden auf verschiedenen Medien (MEA und LNA) die von *Trichoderma* spp. ausgeschiedenen volatilen organischen Verbindungen auf ihre Wachstumshemmung gegenüber Holz abbauenden Pilzen überprüft. Die Durchführung erfolgte an Anlehnung an die Methodik von BRUCE et al. (1996). Für jede Antagonist/Pathogen Kombination (n=8) wurden Petrischalen mit einer *Trichoderma* – Art (Ø 5mm) inokuliert und für 3 Wochen im Brutschrank bei Dunkelheit und 25C° gelagert. Im Anschluss wurden MEA-Platten mit dem jeweiligen Holzzersetzer (Ø 5mm) inokuliert, umgedreht auf die *Trichoderma*- Kulturen gesetzt und mit Parafilm fixiert. Damit es zu keinem physischen Kontakt zwischen Antagonist und Pathogen kommt, wurde ein steriles Filterpapier (Rundfilter Ø 90mm, Schleicher&Schüll) beigefügt. Als Kontrolle dienten mit Holz zersetzenden Pilzen inokulierte Petrischalen, die nicht den flüchtigen Verbindungen von *Trichoderma* spp. ausgesetzt waren. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurde das Myzelwachstum der Holz zersetzenden Pilze, wie in Kapitel 2.6.5 beschrieben, ermittelt.

### **2.6.4 Interaktionsstudien an Platanenholz**

Die Durchführung der künstlichen Interaktionstests erfolgte in modifizierter Form nach dem EUROPEAN STANDARD EN 113 (1996). Es wurden ca. 10x15x25mm große Holzklötzchen aus dem Splintholzbereich der Baumart *Platanus x hispanica* im Forstbotanischen Garten in Lehen gesägt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Stirnseiten jeweils einem Querschnitt im Rundholz entsprachen und die Proben weitestgehend homogen waren.

Vor der Inokulation wurden die Holzproben bei einer Temperatur von 103°C für 48 Stunden getrocknet und das Darrrockengewicht ermittelt. Anschließend wurden die Proben mittels einer Vakuumpumpe mit Aqua dest. auf eine Holzfeuchte zwischen 50% und 70% eingestellt und 2-mal bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert. Unter der Sterilbank wurden die Holzproben mit 2 unterschiedlichen Sporenlösungen (I und II) von *Trichoderma* spp. beimpft und anschließend auf 2 Wochen alte Reinkulturen der Holz zersetzenden Pilze gesetzt (5 Holzklötzchen pro Petrischale). Als Kontrolle dienten unbeimpfte Proben. Als weitere Variante wurden mit der Sporensuspension beimpften Holzproben auf MEA-Platten gelegt, die keine Holzersetzer enthielten. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und für 3 verschiedene Inkubationszeiten (6, 12, 18 Wochen) bei 25°C im Brutschrank aufbewahrt. Für jede Antagonist/Pathogen-Kombination wurden 10 Holzproben verwendet (n=10). Ferner wurden pro Kombination Holzproben für histologische Studien weiter bearbeitet.

EJECHI & OBUKWE (1996) und EJECHI (2003) beobachteten, dass eine Zugabe von Harnstoff und ein pH-Wert (7) im neutralen Bereich das Wachstum von *Trichoderma viride* anregt, hingegen das von holzerstörenden Pilzen hemmt. Ferner konnte dadurch die Effektivität des Antagonisten erhöht werden. HJELJORD et al. (2001) beschreibt eine beschleunigte Keimung von Konidien von *T. atroviride* durch gezielte Nährstoffzugabe. Vor diesem Hintergrund wurden folgende Lösungen hergestellt und verwendet:

#### Sporenlösungen

Sporensuspension I: [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml]

Sporensuspension II: [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml +0,2% Glucose + 0,1% Harnstoff + pH 7]

Kontrolle: ohne Behandlung mit *Trichoderma* spp.

#### **2.6.4.1 Herstellung der Sporensuspension**

Zur Herstellung der Sporenlösungen wurde *Trichoderma* spp. auf MEA Medien inokuliert und für 14 Tage bei Raumtemperatur und unter Lichteinfluss bebrütet (BETINA & FARKAŠ, 1998). Die gebildeten Konidien wurden von diesen Kulturen mit 10ml sterilem Aqua dest. abgespült und mit einem Faltenfilter (Schleicher&Schüll, Porengröße 4-7µm) von groben Myzelresten befreit. Daran anschließend erfolgte eine erneute Filtration (Nalgene<sup>®</sup> MF75™ Filter mit Supor<sup>®</sup> mach V Membran) und Lösung der Sporen in 10ml Aqua dest. Die Suspension wurde, um eventuell

vorhandene Nährstoffe und Stoffwechselprodukte zu entfernen, bei 300 U/min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5702), gewaschen und wieder in sterilem Aqua dest. aufgenommen (NAÁR & KECSKÉS, 1998). Ferner wurde von dieser Ausgangslösung  $V_0$  eine 10er-Verdünnungsreihe ( $V_0$ - $V_9$ ) angelegt und mit Hilfe einer Thomakammer (Kammertiefe 0,1mm) die Konidiendichte mit folgender Gleichung bestimmt (Auszählen der Großquadrate):

$$\text{Sporenkonzentration} = \text{Mittelwert Sporen} * 2,5 * 10^5 * \text{Verdünnungsstufe}$$

Im Anschluss daran konnte die gewünschte Sporenkonzentration ( $10^5$ cfu/ml) durch gezielte Verdünnung hergestellt werden. Für die Herstellung der Sporensuspension II wurden entsprechende Mengen an Glucose (Merck, Darmstadt) und Harnstoff (Riedel-DeHaën AG, Hannover) der Lösung beigefügt und der pH-Wert auf 7 eingestellt.

### 2.6.5 Wachstums- und Sporenkeimungsraten

Für die Bestimmung der Wachstumsraten wurden aus 2 Wochen alten Reinkulturen Agarscheiben ( $\varnothing$  5mm) mit einem Korkbohrer ausgestanzt und auf die Medien MEA und LNA beimpft ( $n=3$ ). Das Myzelwachstum wurde in 2 vorher festgelegten Richtungen gemessen und durch Mittlung der Werte die Ausdehnung bestimmt (GOLDFARB et al. 1989). Das Wachstum der Holz zersetzenden Pilze bei 25°C wurde nach einer 7tägigen Inkubationszeit untersucht.

Die Ermittlung der Wachstumsraten (mm/24h) für *Trichoderma* spp. erfolgte unter dem Einfluss unterschiedlicher Temperaturen (5, 10, 15, 25 und 30°C) sowie Wasseraktivitäten  $a_w$  0,998, 0,955 und 0,892 (Vindeløv & Arneborg, 2002; MARÍN et al. 1998; ALDRED et al. 1999; KREDICS et al. 2000).

Für die Bestimmung der Sporenkeimungsraten wurden Konidien der Sporensuspension (siehe Kapitel 2.6.4.1) von *Trichoderma* spp. verdünnt ( $10^{-2}$ ), 5 $\mu$ l davon auf SNA Medien ausplattiert und bei 5, 10, 15, 25 und 30°C inkubiert ( $n=3$ ). Nach 6, 16, 24 und 48 Stunden erfolgte unter dem Lichtmikroskop die Bestimmung der Keimungsraten. Zusätzlich wurde der Einfluss der oben genannten Temperaturen in Kombination mit den Wasseraktivitäten  $a_w$  (0,998, 0,955 und 0,892) auf die Sporenkeimungsrate nach 24 Stunden bonitiert.

### 2.6.5.1 Einstellung der Wasseraktivität ( $a_w$ )

Mikroorganismen benötigen für alle Stoffwechselaktivitäten Wasser (NULTSCH, 1991). Die Verfügbarkeit von Wasser für biologische Vorgänge wird durch die Wasseraktivität  $a_w$  (0-1) ausgedrückt. Es ist das Verhältnis des Dampfdruckes der Luft im Gleichgewicht mit einer Substanz oder Lösung zum Dampfdruck von reinem Wasser (KRÄMER, 2002). Die meisten Mikroorganismen wachsen bei einem  $a_w$ -Wert von 0,98 - 1 am besten. Es gibt jedoch einige Mikroorganismen, die sich auch noch bei kleineren  $a_w$ -Werten vermehren können. Diese Organismen werden als xerophil bezeichnet (CYPIONKA, 2006).

Die Einstellung der Nährmedien auf die unterschiedlichen Wasseraktivitäten (0,998, 0,955 und 0,892) erfolgte an Anlehnung an DALLYN (1978 & 1980). Hierbei wurden den Medien bestimmte Mengen an Glycerin (Aldrich, Steinheim, 92,09g/mol) vor dem Autoklavieren beigefügt (Tabelle 9). Zur Überprüfung der Wasseraktivität wurde die Osmolalität ( $\text{osmol kg}^{-1}$ ) der Lösungen mit dem Osmometer OM 801 der Firma Vogel bestimmt und anschließend mit der Formel nach KISS & HANSSON (2004) der  $a_w$ -Wert berechnet:

$$a_w = \frac{\frac{1000}{MG_{\text{wasser}}}}{\left( \frac{1000}{MG_{\text{wasser}}} + C_{\text{osm}} \right)}$$

wobei  $MG_{\text{wasser}}$  = Molekulargewicht von Wasser (18,015g/mol) und  $C_{\text{osm}}$  =  $\text{osmol kg}^{-1}$

**Tabelle 9:** Einstellung der Wasseraktivität  $a_w$  mit Glycerin (g/Liter) nach DALLYN (1980)

Nährmedien	$a_w$ 0,998	$a_w$ 0,955	$a_w$ 0,892
MEA	9,1g	187,1g	355,9g
LNA	-	155,5g	336,2g
SNA	-	155,5g	336,2g

## 2.7 AD PLANTA STUDIEN MIT *TRICHODERMA ATROVIRIDE* KARSTEN

Um die Persistenz und die antagonistische (protektive) Wirkung von *Trichoderma atroviride* 15603.1 auf Schnittflächen an Bäumen im Freiland zu untersuchen, wurden an unterschiedlichen Standorten Feldversuche (A und B) angelegt und über 4 Vegetationsperioden bonitiert. Hierbei wurden an insgesamt 196 Bäumen von 6 verschiedenen Baumarten Schnittmaßnahmen (Lichtraumprofilschnitt; Kronenpflege und -einkürzung) gemäß der ZTV-Baumpflege (2006) durchgeführt. Eine Beschreibung des methodischen Vorgehens und der Standorte erfolgen in den kommenden Kapiteln.

### 2.7.1 VERSUCH A: Schnittflächenbeimpfung an Bäumen

Im Frühjahr/Sommer 2003 wurden in Straßburg, Rue de Saint Joseph, 37 und in Ludwigshafen, BASF AG Werksgelände, 81 Bäume nach Schnittmaßnahmen im Kronenraum mit *T. atroviride* beimpft (siehe Anhang). Die hierbei entnommenen Aststärken lagen zwischen 5 und 45cm ( $\varnothing$  8cm).

Beide Standorte sind durch die in urbanen Gebieten vorkommende Infrastruktur (Verkehr, verdichtetes Bauen) und die sich hieraus ergebenden Vitalitätsmindernden Stressfaktoren für Baumbestände (Krankheiten, Extremklima, Versiegelung, Schadstoffe, mechanische Verletzungen) gekennzeichnet.

Das Klima beider Städte ist charakterisiert durch die milden Winter und heißen Sommer, so besitzen Straßburg (143m ü NN) und Ludwigshafen (96m ü NN) eine Jahresdurchschnittstemperatur von 10°C bzw. 9,2°C und einen Jahresniederschlag von 607mm bzw. <500 (373) mm.



Abb. 3: Übersichtskarte des Standortes Ludwigshafen, BASF Werksgelände

### 2.7.1.1 Applikation

Der Antagonist wurde mit Hilfe unterschiedlicher Suspensionen und Verfahren auf Schnittflächen appliziert. Die Herstellung und Einstellung der Sporensuspensionen erfolgte wie in Kapitel 2.6.4.1 beschrieben. Folgende Varianten wurden angewendet:

Verfahren **A**: Suspension [CFU:  $10^5$  Sporen/ml]

Verfahren **B**: Suspension [CFU:  $10^5$  Sporen/ml + 0,2% Glucose + 0,1 % Harnstoff]

Verfahren **C**: Suspension [CFU:  $10^5$  Sporen/ml + 0,2% Glucose + 0,1 % Harnstoff + 0,4 % Luquasorb<sup>®</sup> (Natriumpolyacrylat)] \*

Verfahren **K**: Kontrolle – keine Behandlung

\*Bei der Variante **C** wurde das von der BASF AG/Fachstelle Polymere zur Verfügung gestellte Hydrogel (Luquasorb<sup>®</sup> 10 30) als Trägersubstanz verwendet.

Für den Standort Straßburg stand das Hydrogel Luquasorb<sup>®</sup> leider nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde als Alternative folgende Variante verwendet:

Variante **C<sup>S</sup>**: Suspension [CFU:  $10^5$  Sporen/ml + 0,5% Glucose + 0,2 % Harnstoff]

#### Technische Daten zu Luquasorb 1030

Chemische Charakterisierung: Natriumpolyacrylat, vernetzt

Form: Granulat

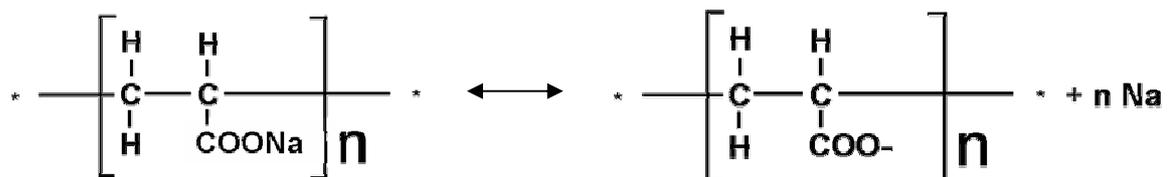
Partikelgröße: <300µm

Farbe: weiß

Geruch: geruchlos

pH-Wert: 6,0

Wasserlöslichkeit: unlöslich, nur quellbar



**Abb. 4:** Funktionsweise von Luquasorb 1030. In Wasser löst sich das Natrium-Kation von der Polyacrylsäure. Durch diesen Vorgang (Absorption) entsteht ein langes Polymer mit negativ geladenen Carboxylgruppen, an denen sich die umgebenden Wassermoleküle (Dipole) anlagern.

Die Applikation der Sporensuspensionen erfolgte im direkten Anschluss an die durchgeführten Schnittmaßnahmen. Es wurden die Varianten A und B (C<sup>S</sup>) mit einer herkömmlichen Sprühflasche (500ml; 0,5mm Düsendgröße), die Variante C mit Hilfe eines Pinsels auf die Wundflächen aufgetragen (Abbildung 5).



**Abb. 5:** Applikation von *Trichoderma atroviride* 15603.1 auf frische Schnittflächen. **A:** Die Sporensuspensionen A und B wurden auf die Astflächen aufgesprüht. **B:** Die Sporensuspension C mit Natriumpolyacrylat als Trägersubstanz wurde mit Hilfe eines Pinsels verteilt.

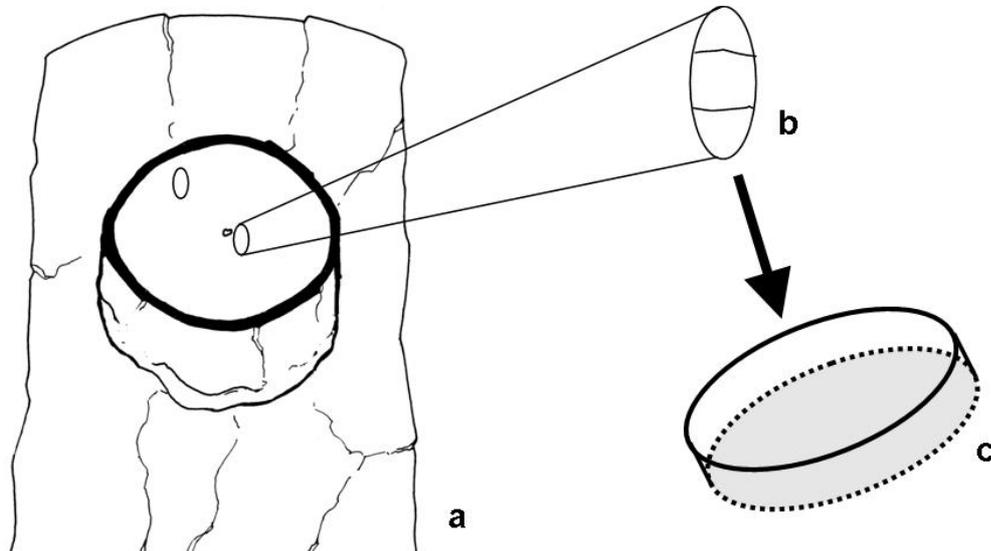
### 2.7.1.2 Re-Isolation

Für das Monitoring von *Trichoderma* sp. im Freiland wurden in regelmäßigen Abständen (2, 8, 12, 18, 24 und 30 Monaten) Abisolierungen der Schnittflächen vorgenommen (Abbildung 6). Mit einem sterilen Holzbeitel wurden hierbei insgesamt 1832 Holzproben (ca. 10x20mm) aus den Schnittflächen entnommen und in gekennzeichnete Petrischalen ohne Medium verpackt. Die Desinfizierung des Werkzeuges wurde mit 70%igem Ethanol nach jeder Re-Isolation durchgeführt. Falls die Wundfläche durch ihre Größe eine Differenzierung in Splint- und Reif/Kernholz zuließ fand eine Entnahme der Proben sowohl aus dem zentralen als auch aus dem Splintholzbereich statt. Zusätzlich wurden folgende Parameter aufgenommen:

- Wundgröße
- Wundausrichtung: Norden; Osten; Süden; Westen
- Besonderheiten: Sporenlager, Risse, Zersetzung

Anschließend wurden im Labor die Proben unter der Sterilbank zur Oberflächensterilisation kurz mit einem Bunsenbrenner abgeflammt und mit Hilfe eines Skalpell geteilt. Die einzelnen Holzstücke wurden dann auf verschiedenen Nährmedien inkubiert. Hierbei kamen die Nährmedien SNA/MEA und T-MEA

standardmäßig zur Anwendung und zusätzlich stichprobenartig die Medien TSM (1) und (2). Alle Petrischalen (N=5496) wurden gekennzeichnet, mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert. Für die Identifikation der Organismen wurde wie in Kapitel 2.5 beschrieben vorgegangen.



**Abb. 6:** **a)** Mit einem sterilen Holzbeitel werden aus dem zentralen Bereich der Astfläche ca. 10x20mm lange Holzproben entnommen (Splint- und Reifholzbereich). **b)** Diese Proben werden im Labor mit Hilfe eines Skalpells unter der Sterilbank geteilt und **c)** anschließend auf unterschiedliche Nährmedien inkubiert.

## 2.7.2 VERSUCH B: Infektionsversuche an Bäumen

Im Forstbotanischen Garten in Lehen bei Freiburg (278m ü NN; Ø 10°C; Jahresniederschlag ca. 1000mm) wurden an 78 Bäumen im Frühjahr/Sommer 2003 nach Schnittmaßnahmen künstliche Inokulationsversuche durchgeführt. Die Stärke der entnommenen Äste lag hier zwischen 1 und 15cm (Ø 4,8cm).

### 2.7.2.1 Applikation und Inokulation

Die Applikation von *T. atrovirde* auf die frischen Schnittflächen erfolgte wie in Kapitel 2.7.1.1 beschrieben. Im Anschluss an eine dreiwöchige Inkubationszeit wurden die Astflächen zusätzlich mit den Holz zersetzenden Pilzen *Inonotus hispidus* 200792.1, *Ganoderma adpersum* und *Polyporus squamosus* inokuliert (Tabelle 10). Hierzu wurden die Pilze auf MEA kultiviert und nach vollständiger Besiedlung der Petrischalen erfolgte das Entfernen und die Trockengewichtsbestimmung des Pilzmyzels nach der modifizierten Methode von SUTTON & STARZYK (1972). Das

Myzel des jeweiligen Pilzes wurde in Lösung (0,15g/10ml) gebracht und auf die Schnittflächen aufgetragen.

**Tabelle 10:** Inokulationsversuche an 78 Bäumen in Lehen, bei Freiburg

78 Bäume [242 Astwunden]																		
	Trichoderma			Trichoderma + Pathogen									Pathogen			Kontrolle		
	A	B	C	A			B			C			P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>
				P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>
<i>Tilia</i>	2 [5]	2 [7]	2 [7]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [4]	1 [3]	2 [6]	2 [6]	2 [7]	1 [2]	1 [5]	1 [2]
<i>Acer</i>	1 [3]	2 [5]	2 [7]	1 [3]	1 [4]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [4]	1 [3]	1 [3]	2 [6]	2 [7]	2 [6]	1 [3]	1 [2]	1 [4]
<i>Populus</i>	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	-	-	-
<i>Quercus</i>	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [4]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [3]	1 [4]	1 [4]	1 [3]	1 [3]	1 [4]	-	-

A = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml]

B = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml + 0,2% Glucose + 0,1 % Harnstoff]

C = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml + 0,2% Glucose + 0,1 % Harnstoff + 0,4 % Natriumpolyacrylat]

P<sub>1</sub> = *Inonotus hispidus* (Bull.:Fr.) Karsten

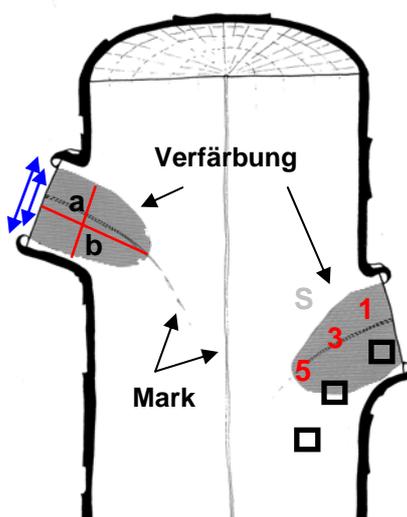
P<sub>2</sub> = *Ganoderma adspersum* (S. Schulz.) Donk

P<sub>3</sub> = *Polyporus squamosus* (Hud.:Fr.) Fr.

K<sub>1,2,3</sub> = keine Behandlung

### 2.7.2.2 Probennahme und Wundparameter

Im Winter 2005/06 wurden die Versuchsbäume im Forstbotanischen Garten gefällt und Stammsegmente mit den behandelten Schnittwunden entnommen. Anschließend wurden die Schnittflächen mittig mit einer Bandsäge durchgesägt (radial) und bis zur Probennahme bei -15°C gelagert. Für die Pilzanalyse, histologische Studien sowie zur Bonitierung der Verfärbungen und des Überwallungsprozentes im Bereich der Wunden wurden von 78 Bäumen und 242 Schnittflächen Proben in Anlehnung an LIESE et al. (1988) und METZLER (1997) entnommen (Abbildung 7).



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Probenentnahme:

Die Abisolierungen von ca. 0,5\*0,5cm starken Holzproben in 1, 3 und 5 cm sowie im Splintholzbereich [S] wurden auf die Nährmedien SNA/MEA und T-MEA (TSM) inkubiert. Für die histologischen Studien zur Reaktionszone und Holzabbau wurden 0,5\*0,5\*1cm große Proben (axial, radial, tangential) herausgesägt und verarbeitet (Vierecke). Zur Bonitierung der Verfärbungen wurde parallel zur Schnittfläche die längste Ausdehnung in axialer sowie im rechten Winkel dazu die längste Ausdehnung in radialer Richtung bestimmt (a,b). Für die Determinierung der Wundüberwallung (Kalluswachstum) wurde die Wundfläche (Kreis) in Beziehung zur überwallten Fläche (Ellipse) gesetzt und der Kalluskoeffizient in Prozent mit folgender Formel berechnet:

$$K_{\text{koeff}}\% = 100 - \frac{(\frac{\pi}{4} * h * b)}{\pi * r^2} * 100$$

### 2.7.2.3 Bestimmung des Wirkungsgrades [%]

Für eine quantitative Aussage bezüglich der protektiven Wirkung von *Trichoderma atroviride* gegen die eingesetzten Holzzersetzer wurde der Wirkungsgrad ermittelt. Der Wirkungsgrad gilt als Kriterium zur Bewertung von Pflanzenschutzmaßnahmen, welcher den Befallsrückgang oder die Schadensminderung in % angibt (AUST et al. 1999). Zur Berechnung wurde die Formel nach ABOIT (1925) in veränderter Form verwendet:

$$W_{\text{grad}} = \frac{(P_x[\%] - B[\%]) * 100}{P_x[\%]}$$

$P_x$  = Infektionsrate ohne Beimpfung und  $B$  = Infektionsrate mit Beimpfung

### 2.7.3 Analyse der isolierten Pilzpopulationen (Diversitätsindices)

Zur Charakterisierung der Pilzpopulationen, ihrer Sukzession und Diversität, bezogen auf eine definierte Raumeinheit (Schnittflächen an Bäumen), wurden folgende Diversitätsparameter nach LUDWIG & REYNOLDS (1988), RICHARD et al. (2005) und PAULUS & GADEK (2006) herangezogen und berechnet:

#### Gattungsreichtum (Richness)

R1: MARGALEF (1958) Index

$$R1 = \frac{S-1}{\log(N)}$$

Anzahl der Gattungen im jeweiligen Habitat.

Wobei  $S$  = Anzahl der Gattungen und  $N$  = Anzahl aller Individuen

#### Diversität (Diversity)

H': Shannon (SHANNON & WEAVER, 1949) Index

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i * \log(p_i) \quad p_i = \frac{n_i}{N}$$

$H'$  ist der Grad der Unsicherheit, mit der ein zufällig der Stichprobe entnommenes Individuum einer bestimmten Gattung angehört.  $H'$  steigt mit der Anzahl der Gattungen und je gleichmäßiger die Individuen auf die Gattungen verteilt sind.

$n_i$  = Anzahl der Individuen der  $i$ -ten Gattung und  $N$  = Anzahl aller Individuen.

### Verteilung (Evenness )

$$E = \frac{H'}{H_{\max}} = \frac{H'}{\log(S)}$$

Die Evenness wird auch „Ausbildungsgrad der Diversität“ genannt und ergibt sich aus der Relation der ermittelten Diversität zur maximalen Diversität, die sich bei gleicher Gattungszahl, aber bei gleichmäßiger Verteilung der Individuenzahl auf die Gattungen ergeben würde.

S = Anzahl der Gattungen

## 2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Bei Vorliegen von metrisch skalierten Variablen, einer Normalverteilung sowie Varianzhomogenität wurden die ermittelten Daten mit einer einfaktoriellen bzw. bei zwei und mehr Faktoren mit einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf Signifikanzen überprüft. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte hierbei mit Hilfe des Ryan-Einot-Gabrial-Welsh-Tests (REGWQ) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  und für Hochsignifikanzen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,001$ .

Für die Berechnung nicht metrisch skalierten Variablen (nominal-, ordinalskalierte Größen) wurde der CHI-Quadrat-Test ( $X^2$ ) und der H-Test nach Kruskal-Wallis bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  und  $p \leq 0,001$  durchgeführt.

Für die Analyse bestehender Korrelationen wurden der Bravais-Pearson und der Spearman'sche Korrelationskoeffizient  $r$  bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  berechnet.

Die Datenhaltung und Aufarbeitung erfolgte mit den Programmen EXCEL sowie mit der Datenbank ACCESS. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS für Windows (Versionen 11.0 und 14.0) durchgeführt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 *IN VITRO* SCREENING ZUM ANTAGONISTISCHEN POTENZIAL VON *TRICHODERMA* SPP.

##### 3.1.1 Dualkultur-Tests

Die Fähigkeit von *Trichoderma* spp., Holz zersetzende Pilze zu überwachsen (parasitieren) und abzutöten, wurde in den Dualkultur-Tests überprüft. Um bestehende Korrelationen zwischen dem antagonistischen Potenzial und optimalen Bedingungen (Ernährungszustand, pH-Wert) festzustellen, wurden die Tests zudem auf unterschiedlichen Nährmedien durchgeführt. Die Gesamtauswertung sowie die statistische Analyse sind in Tabelle 11 zusammengefasst dargestellt. Der H-Test nach Kruskal Wallis sowie der Gruppenvergleich nach Dunnett belegen, dass Unterschiede zwischen den eingesetzten *Trichoderma*-Arten in Bezug auf das Antagonismuspotenzial existieren. So verfügt *T. virens* über das größte antagonistische Potenzial ( $p \leq 0,001$ ). Er parasitierte und tötete im Durchschnitt in 97% der Fälle das Myzel der Holzzersetzer. Hingegen war *T. fasciculatum* (*strictiple*) nur in 35% der Fälle in der Lage, die Holz abbauenden Pilze zu parasitieren. Er besaß somit das geringste Antagonismuspotenzial ( $p \leq 0,001$ ). Ein Unterschied zwischen den *T. atroviride*- Stämmen konnte nicht festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ). Der Einfluss der Nährmedien auf die Parasitierungsrate von *Trichoderma* spp. war nach dem H-Test ebenfalls signifikant. Der Antagonismus der *Trichoderma*-Arten auf den nährstoffreichen Medien MEA (pH-Wert 7) war höher als auf den Minimalmedien LNA (pH-Wert 5 und 7) ( $p \leq 0,001$ ). Einen Einfluss des pH-Wertes konnte nur zwischen LNA (pH 5) und LNA (pH 7) festgestellt werden. So war das antagonistische Potenzial von *Trichoderma* spp. auf dem Medium LNA mit einem pH-Wert im neutralen Bereich höher als auf dem Medium LNA (pH-Wert 5) ( $p \leq 0,001$ ). Zusätzlich konnte mit dem Test nach Kruskal Wallis festgestellt werden, dass zwischen den Holz zersetzenden Pilzen in Bezug auf ihre Anfälligkeit (Sensitivität) gegenüber *Trichoderma* spp. hochsignifikante Unterschiede existieren. In diesen Dualkultur-Tests war die Sensitivität bei *Kretzschmaria deusta* gegenüber *Trichoderma* spp. am größten, hingegen ließen die Pilze *Polyporus squamosus* und *Ganoderma lipsiense* die geringste Anfälligkeit erkennen ( $p \leq 0,001$ ).

**Tabelle 11:** Gesamtauswertung der Dualkultur-Tests auf unterschiedlichen Nährmedien.

Pilz	MEA												LNA											
	pH-Wert 5 (ab *)						pH-Wert 7 (a *)						pH-Wert 5 (c **)						pH-Wert 7 (b **)					
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>
<b>T-15603.1</b>	xx [100]	xx [100]	xxx [100]	xx [83]	xxx [100]	xx [83]	xxx [100]	xx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xx [83]	xx [100]	xx [83]	xx [100]	x [17]	xxx [100]	– [0]	xx [100]	xx [100]	xxx [100]	xx [83]	xxx [100]	x [67]
<b>T-351.93</b>	xx [100]	xxx [100]	xx [100]	xx [100]	xxx [100]	xx [67]	xxx [100]	xx [100]	xx [83]	xx [100]	xxx [100]	xx [83]	xx [100]	xx [100]	xx [100]	x [33]	xx [100]	– [0]	xx [100]	xx [83]	xx [100]	xx [83]	xxx [100]	x [50]
<b>T-396.92</b>	xx [100]	xx [83]	xxx [100]	xx [67]	xxx [100]	xx [83]	xx [100]	xx [100]	xx [100]	xx [83]	xxx [100]	xx [67]	xx [83]	xx [83]	xx [100]	x [17]	xx [100]	x [17]	xx [100]	xx [83]	xx [100]	xx [67]	xxx [100]	x [50]
<b>T-206040</b>	xx [100]	xx [100]	xx [100]	xx [83]	xxx [100]	xx [83]	xxx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xx [83]	xxx [100]	xx [50]	xx [100]	xx [100]	xx [100]	– [0]	xxx [100]	– [0]	xx [100]	xx [100]	xxx [100]	xx [83]	xxx [100]	xx [50]
<b>T-126.65</b>	xxx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xxx [100]	xx [100]	xx [100]	xx [83]	xx [83]	xxx [100]	xx [83]	xxx [100]	xxx [100]	xx [100]	xx [83]	xxx [100]	xxx [100]
<b>T-338.93</b>	xx [83]	xx [67]	x [17]	– [0]	xx [67]	– [0]	xx [83]	xx [83]	x [33]	x [17]	xx [67]	– [0]	xx [67]	xx [67]	x [17]	– [0]	x [33]	– [0]	xx [50]	xx [67]	x [17]	– [0]	x [17]	– [0]

**Trichoderma spp.:**

- T-15603.1 *Trichoderma atroviride* Karsten (b \*)
- T-351.93 *Trichoderma atroviride* Karsten (b \*)
- T-396.92 *Trichoderma atroviride* Karsten (b \*)
- T-206040 *Trichoderma harzianum/polysporum* Bissett (b \*)
- T-126.65 *Trichoderma virens* Miller, Giddens & Foster (a \*\*)
- T-338.93 *Trichoderma fasciculatum (strictipile)* Bissett (c \*\*)

**Pathogene:**

- P<sub>1</sub> = *Inonotus hispidus* 200792.1 (Bull.:Fr.) Karsten (b \*)
- P<sub>2</sub> = *Inonotus hispidus* 221105.1 (Bull.:Fr.) Karsten (b \*)
- P<sub>3</sub> = *Ganoderma adspersum* (S. Schulz.) Donk (b \*)
- P<sub>4</sub> = *Ganoderma lipsiense* (Batsch) Atk. (c \*\*)
- P<sub>5</sub> = *Kretzschmaria deusta* (Hoffm.) P.M.D. Martin (a \*\*)
- P<sub>6</sub> = *Polyporus squamosus* (Hud.:Fr.) Fr. (c \*\*)

xxx = sehr starker Antagonismus  
 xx = starker Antagonismus  
 x = schwacher Antagonismus  
 – = Kein Antagonismus

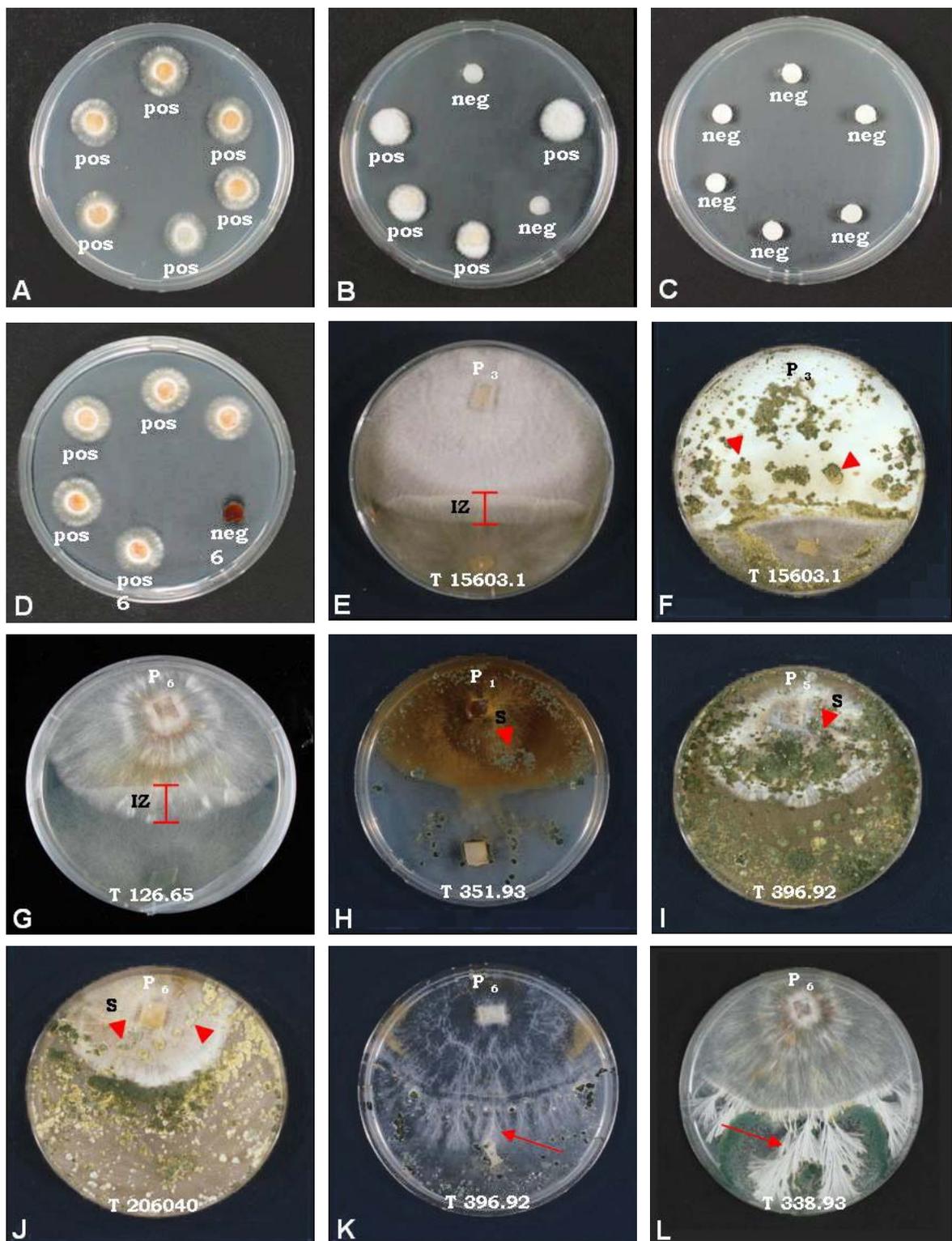
[ ] = Pathogen wurde in [%] d. Fälle abgetötet

**H-Test nach Kruskal Wallis (Gruppenvergleich nach Dunnett):**

Gleiche Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant

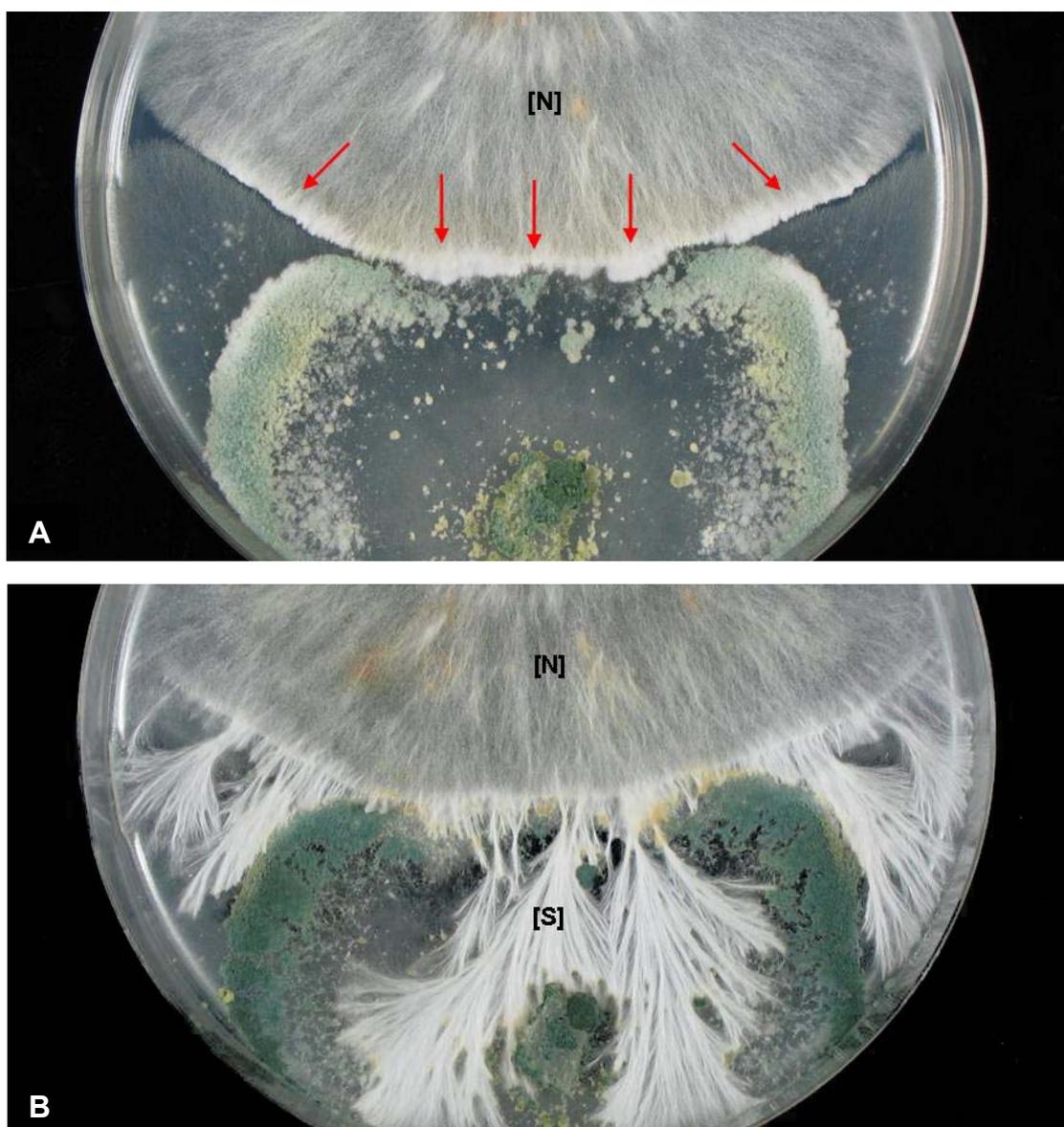
\* - signifikant (p≤0,05)

\*\* - hochsignifikant (p≤0,001)



**Abb. 8:** **A:** T 338.93 war in keinen der durchgeführten Dualkulturtests in der Lage, das Myzel von P<sub>6</sub> zu parasitieren. Die Proben ließen nach wenigen Tagen ein Myzelwachstum erkennen. **B:** Auf dem Medium MEA (pH 5) konnte T 351.93 das Myzel von P<sub>4</sub> nur in zwei Fällen erfolgreich abtöten. **C:** T 15603.1 parasitierte das Myzel von P<sub>3</sub> erfolgreich. Alle 6 entnommenen Proben ließen kein Wachstum erkennen **D:** T 396.92 konnte nur in einem Fall das Myzel von P<sub>6</sub> auf dem Medium LNA (pH 5) erfolgreich überwachsen. **E:** Interaktionszone von T 15603.1 und P<sub>3</sub> nach wenigen Tagen [IZ]. **F:** Nach der Inkubationszeit waren Sporenlager von T 15603.1 auf dem Myzel von P<sub>3</sub> zu erkennen [S]. **G:** Interaktionszone von T 126.65 und P<sub>6</sub> [IZ]. **H:** Auf dem Medium LNA (pH 7) überwuchs T 351.93 den Holzersetzer P<sub>1</sub> erfolgreich. **I:** Deutliche Sporenlager von T 396.92 waren nach der Inkubationszeit auf dem Myzel von P<sub>5</sub> zu erkennen [S]. **J:** T 206040 konnte P<sub>6</sub> erfolgreich parasitieren. **K:** Auf dem Medium LNA (pH 5) konnte T 396.92 das Wachstum von P<sub>6</sub> nicht aufhalten (Pfeil). **L:** Auf MEA (pH 7) überwuchs P<sub>6</sub> das Myzel von T 338.93 (Pfeil).

Im Kontext der Resistenz von *Polyporus squamosus* gegenüber *Trichoderma* spp. konnten einige interessante Besonderheiten festgestellt werden. Nach dem ersten physischen Kontakt zwischen Antagonist und Pathogen veränderte sich das dimittische Hyphensystem (H1 generative Hyphe, H2 sklerotinierte Bindehyphe) von *P. squamosus*. In der Anfangsphase formierten sich die im Durchschnitt 1,5-5µm breiten Hyphen zu einem kompakten und dichten Myzel zusammen (Abbildung 9A). Im Anschluss daran wurden feste und mehrere Millimeter breite Myzelstränge gebildet, mit denen *P. suamosus* seinerseits in der Lage war, das Myzel von *Trichoderma* spp. zu überwachsen (Abbildung 9B).



**Abb. 9:** **A:** Nach dem ersten Kontakt zwischen den Myzelien von *Trichoderma* sp. und Pathogen fügten sich die Hyphen von *P. squamosus* zusammen. Das Myzel wurde dadurch kompakter und dichter (Pfeile). **B:** Anschließend bildete *P. squamosus* feste Myzelstränge aus, mit denen er in der Lage war, das Myzel von *Trichoderma* sp. zu besiedeln. [N] = Normal gewachsenes, feines Myzel; [S] = Kompaktes, in Stränge formiertes Myzel.

### **3.1.1.1 Studien zum Mycoparasitismus**

Nach der Untersuchung und Bewertung des Potenzials von *Trichoderma* spp., Holz abbauende Pilze in Dualkultur zu parasitieren und abzutöten, wurden, um die verantwortlichen Mechanismen des Mycoparasitismus licht- und rasterelektronenmikroskopisch zu studieren, aus den Interaktionsbereichen Proben entnommen (Kapitel 2.6.2.1).

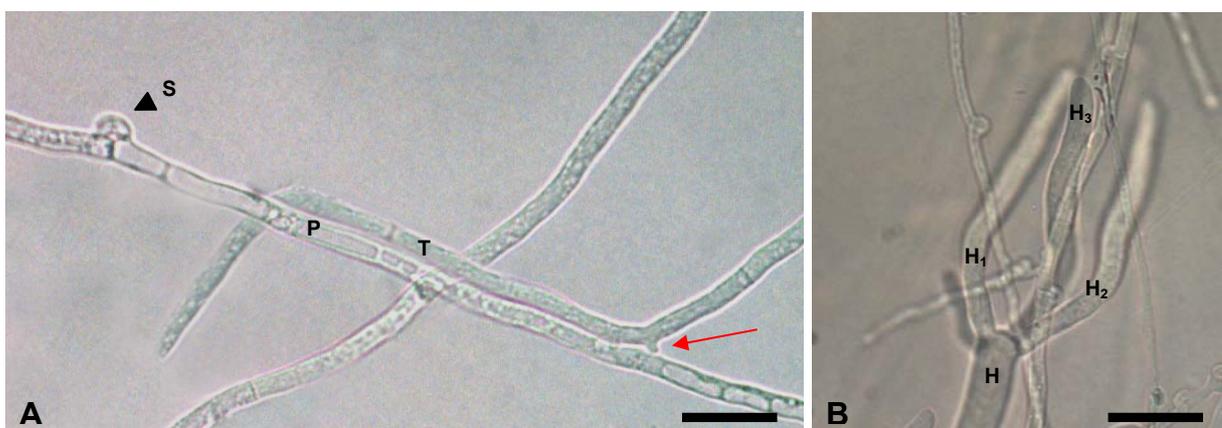
#### Vergleich der Methoden zur Myzelaufbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie

Ein Vergleich der unterschiedlichen Verfahren (Kapitel 2.4) ergab, dass insbesondere die luftgetrockneten Proben durch den abrupten Phasenübergang (flüssig-gasförmig) deutliche Artefaktbildungen und Kollabierungen am Myzel und anderen pilzlichen Strukturen aufwiesen (Abbildung 11A). Durch die Applikation von Hexamethyldisilazane (HMDS) vor der Lufttrocknung konnten diese Beeinträchtigungen weitestgehend minimiert werden. Die gefriergetrockneten Proben ließen, im Vergleich zu den luftgetrockneten Proben, weniger kollabierte Hyphen erkennen, dennoch waren insgesamt die Formveränderungen unverhältnismäßig hoch (Abbildung 11B). Die besten Ergebnisse wurden, neben der Verwendung von HMDS, mit dem Verfahren der Kritisch-Punkt-Trocknung erzielt. Hierbei waren die morphologischen Formen frei von Deformationen. Detaillierte Betrachtungen, auch von fragilen Strukturen (Schnallen, Konidiophoren, Phialiden), konnten somit durchgeführt werden (Abbildung 11G). Die Rasterelektronenmikroskopie im Niedervakuumbereich war für die Interaktionsstudien nicht praktikabel. So waren detaillierte Untersuchungen zur Morphologie und zu den mycoparasitischen Aktivitäten auf Grund der großen Unschärfe des Bildes nur eingeschränkt möglich. Um eine größere Tiefenschärfe zu erhalten, musste das Vakuum im Probenraum erhöht werden, was wiederum zur Folge hatte, dass das Myzel und andere Strukturen, wenn sie nicht schonend getrocknet waren, kollabierten.

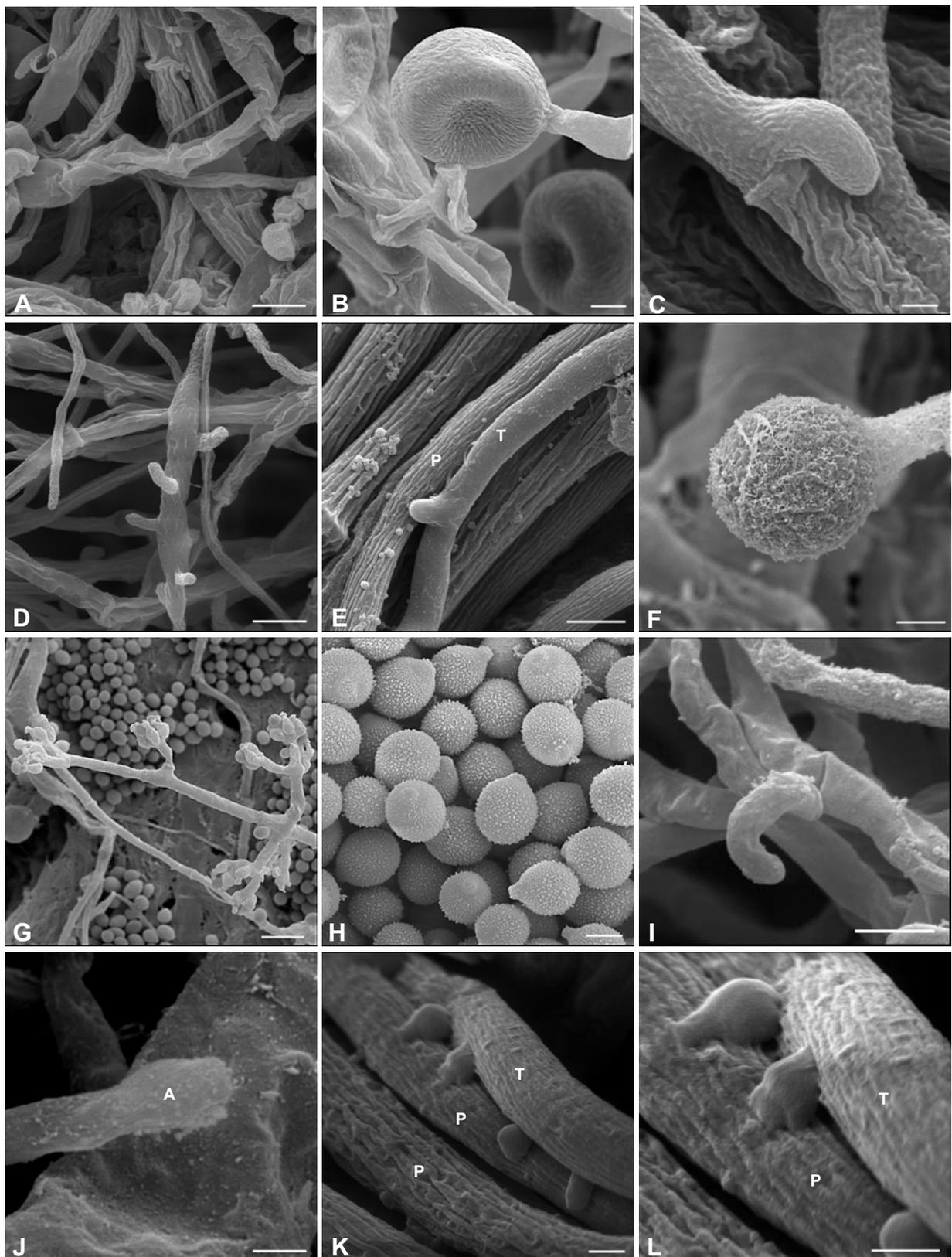
#### Mechanismen des Mycoparasitismus

In allen Fällen konnte ein Hyphenkontakt zwischen *Trichoderma* spp. und den Holz zersetzenden Pilzen beobachtet werden. Um die parasitischen Mechanismen von *Trichoderma* spp. beschreiben zu können, wurden der Hyphendurchmesser und andere Strukturen, wie bspw. die für Basidiomyceten typischen Schnallen, zur Differenzierung der Myzelien der jeweiligen Pilzkombinationen herangezogen

(Abbildung 11C & D). Der Mycoparasitismus wird an dieser Stelle für alle *Trichoderma*-Arten auf Grund der ähnlichen Beobachtungen zusammengefasst dargestellt. In den Fällen, in denen *Trichoderma* spp. in der Lage war, erfolgreich das Myzel der Pathogene zu parasitieren, konnte in der Anfangsphase ein gezieltes Hyphenwachstum in Richtung des Holzzersetzers beobachtet werden. Im Anschluss daran wuchsen und verzweigten (Branching) sich die Hyphen von *Trichoderma* spp. zur Vergrößerung der Kontaktfläche entlang des Myzels der Pathogene und bildeten somit eine feste Hyphenbindung aus (Abbildung 10A & B; 11E). Zudem konnte man feststellen, dass neben dem gerichteten Wachstum zusätzlich Phialiden, Konidien sowie Chlamydosporen ausgebildet wurden (Abbildung 10F, G & H). Diese, der asexuellen Vermehrung dienenden Strukturen, zeugen für eine hohe Konkurrenzkraft um Nahrung und Raum. Während der Interaktionsphase (Parasitierung) bildete *Trichoderma* spp. Haken (Abbildung 11I) und Appressorien-ähnliche Strukturen (Abbildung 11J), die sich fest an die Oberfläche des Wirtes anhefteten. Daran anschließend erfolgte in einigen Fällen ein Eindringen der Hyphen in das Myzel der Holz abbauenden Pilze mittels Penetrationshyphen (Abbildung 11K und L). Eine Hyphenumwicklung (Coiling) konnte in der Parasitierungsphase nur ansatzweise beobachtet werden. An den Kontaktstellen wurde der Abbau der Zellwand der Wirtes in Form von Zusammenschrumpfen, Aufplatzen und Einfallen des Myzels deutlich. Der Prozess des Mycoparasitismus wurde durch den kompletten Zellwandabbau und Efflux des Cytoplasmas mittels Ausscheiden lytischer Enzyme und fungizider Substanzen beendet.



**Abb. 10:** **A:** Interaktionsstudien unter dem Lichtmikroskop. Die septierten Hyphen von *Trichoderma atroviride* 15603.1 [T] wuchsen am Schnallenmyzel [S] von *Ganoderma adspersum* [P] entlang und bildeten Appressorien-ähnliche Strukturen (Pfeil) aus (Maßstab = 5µm). **B:** Die Hyphen von *Trichoderma* spp. verzweigen (Branching) sich, um die Kontaktfläche mit den Myzelien der Holzzersetzer zu vergrößern (MS = 5µm).



**Abb. 11:** **A:** Strukturveränderungen am Myzel der luftgetrockneten Proben. (MS = 5µm). **B:** Kollabierte Chlamydospore nach der Gefriertrocknung (MS = 2µm). **C:** Schnallenmyzel von *P. squamosus* (MS = 1µm). **D:** Für die Gattung *Ganoderma* typische “Staghorn hypha“ (MS = 5 µm). **E:** *T. atroviride* 396.92 [T] wächst an den Hyphen von *K. deusta* [P] entlang und verzweigt (Branching) sich zur Oberflächenvergrößerung (MS = 5 µm). **F:** Intakte Chlamydospore (MS = 2 µm). **G:** Konidiophore von *T. virens* (MS = 10 µm). **H:** Konidien von *T. virens* (Maßstab = 2µm). **I:** Hakenbildung durch *Trichoderma* spp. (MS = 2µm). **J:** Bildung von Appressorien ähnlichen Strukturen [A] durch *T. atroviride* 352.93 (MS = 1 µm). **K + L:** Eindringen in das Myzel von *I. hispidus* [P] mittels Penetrationshyphen von *T. atroviride* 15603.1 [T] (MS = 1µm). MS = Maßstab.

### 3.1.2 Wirksamkeit flüchtiger antibiotischer Substanzen

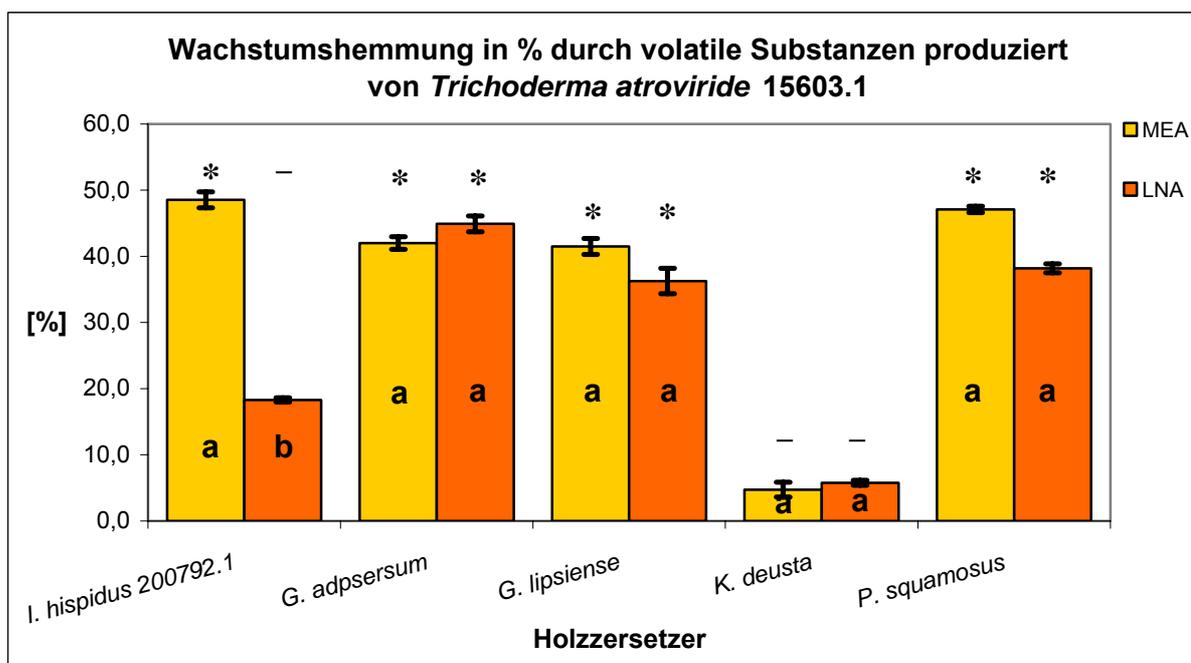
Die Bildung von volatilen Stoffwechselprodukten ist ein weiterer Mechanismus im Antagonismuskomplex von *Trichoderma* spp., mit deren Hilfe das Wachstum Holz abbauender Pilze gehemmt werden kann. In diesen Tests wurde die Wirkung der flüchtigen Substanzen in Abhängigkeit des Ernährungszustands (unterschiedliche Nährmedien) überprüft. Die statistische Auswertung (ANOVA Varianzanalyse) ließ eine signifikante Wirkung der flüchtigen antibiotischen Substanzen von *Trichoderma* spp. auf das Wachstum der Holzersetzer erkennen. Es konnte aber im Schnitt kein signifikanter Einfluss des Ernährungszustandes und somit der Nährmedien auf die Produktion und Wirkung der volatilen Stoffe von *Trichoderma* spp. festgestellt werden. Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, konnte *T. atroviride* 15603.1 das Wachstum der Pathogene im Durchschnitt um 32,8% und damit (hoch-) signifikant verringern ( $p \leq 0,05$  und  $p \leq 0,001$ ). Daneben konnten ebenfalls *T. atroviride* 351.93 und *T. harzianum/polysporum* (BINAB) signifikant das Wachstum der Holzersetzer im Schnitt um 25,7% bzw. 28,3% hemmen ( $p \leq 0,05$ ). Die restlichen *Trichoderma*-Arten waren nicht in der Lage, das Wachstum der Pathogene signifikant zu verlangsamen. *T. fasciculatum (strictipile)* erzielte mit einer durchschnittlichen Hemmung von 8,7% das schlechteste Ergebnis. Zudem konnten nicht nur Unterschiede zwischen den *Trichoderma*-Arten, sondern auch zwischen den *T. atroviride*-Stämmen in Bezug auf die Produktion und Wirkung flüchtiger Stoffwechselprodukte festgestellt werden. So waren die flüchtigen Substanzen von allen 3 *T. atroviride*-Stämme in ihrer Hemmwirkung auf Holz abbauende Pilze signifikant unterschiedlich ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 12:** Durchschnittliche Wirkung volatiler Hemmstoffe von *Trichoderma* spp. in %

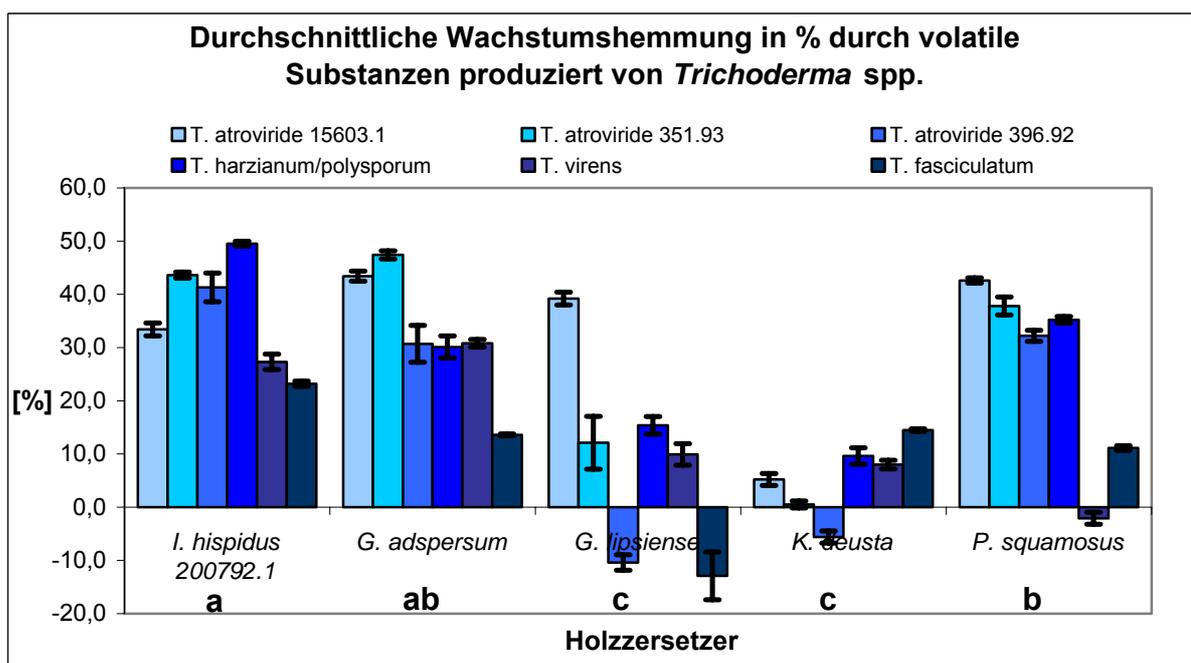
	MEA (a*)	LNA (a*)	gesamt	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,001$
<i>T. atroviride</i> 15603.1	36,9% [±2,28]	28,7% [±2,31]	32,8%	+ (a)	+ (a)
<i>T. atroviride</i> 351.93	27,8% [±2,60]	23,7% [±2,52]	25,7%	+ (b)	- (ab)
<i>T. atroviride</i> 396.92	15,1% [±2,71]	21,4% [±2,46]	18,5%	- (c)	- (bc)
<i>T. harzianum/polysporum</i>	31,5% [±2,52]	25,9% [±2,12]	28,3%	+ (ab)	- (ab)
<i>T. virens</i>	11,9% [±2,52]	17,1% [±2,79]	14,3%	- (cd)	- (c)
<i>T. fasciculatum (strictipile)</i>	5,3% [±2,66]	12,4% [±2,71]	8,7%	- (d)	- (c)

Eine signifikante Hemmung des Wachstums der Holz zersetzenden Pilze ist mit + gekennzeichnet (Test nach Dunnett). Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial- Weltsch-Test (REGWQ).

Die Holz zersetzenden Pilze ließen in ihrer Sensitivität gegenüber den flüchtigen Stoffwechselprodukten nach der Varianzanalyse (ANOVA) hochsignifikante Unterschiede erkennen (Abbildung 13). So waren insbesondere die Pilzarten *I. hispidus* und *G. adpersum* sehr sensitiv für die flüchtigen Verbindungen von *Trichoderma* spp., hingegen ließen *G. lipsiense* und *K. deusta* die geringste Anfälligkeit erkennen ( $p \leq 0,001$ )



**Abb. 12:** Eine signifikante Hemmung des Wachstums ist mit \* gekennzeichnet (Test nach Dunnett). Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant in Bezug zu den verwendeten Nährmedien nach dem Ryan-Einot-Gabriel-Welsch-Test (REWGQ) ( $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 13:** Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht hoch signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabriel-Welsch-Test (REWGQ) ( $p \leq 0,001$ ).

### 3.1.3 Interaktionsstudien an Platanenholz

Die Durchführung der künstlichen Interaktionstests an 2880 Holzproben erfolgte in modifizierter Form nach dem EUROPEAN STANDARD EN 113 (1996) und hatte zum Ziel, die protektive Wirkung von *Trichoderma* spp. gegen eine Zersetzung durch Holz abbauende Pilze festzustellen.

#### 3.1.3.1 Makro- und mikroskopische Beobachtungen

Die Ergebnisse der Makro- und mikroskopischen Beobachtungen sind in Tabelle 13 zusammengefasst dargestellt.

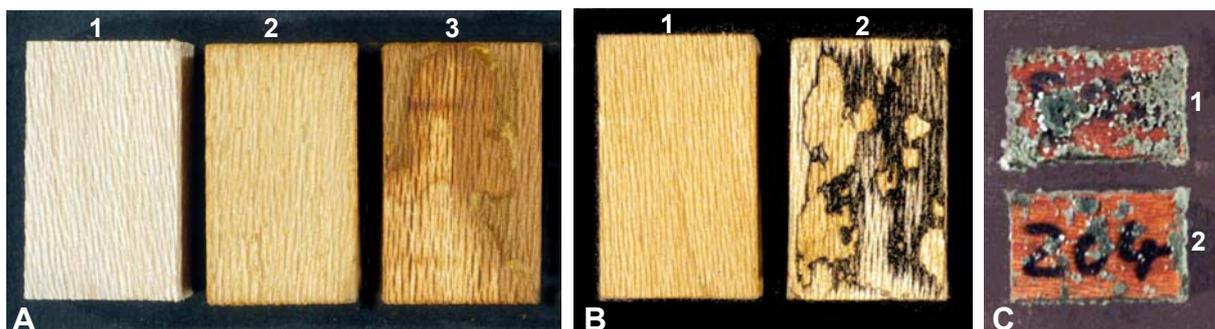
**Tabelle 13:** Makro- und Mikroskopische Beobachtungen an den Platanenholzproben

Pilzart	Kontrolle			<i>Trichoderma</i> Behandlung					
	Grad der Zersetzung	Holzzersetzung	Abbau von Zellelementen	Verhinderung einer Besiedlung und eines Abbaus des Holzes					
				T1	T2	T3	T4	T5	T6
<i>I. hispidus</i> 200792.1	x(x)	Simultane Fäule Moderfäule	Fasertracheiden Holzstrahlen	++	++	++	++	++	+(+)
<i>I. hispidus</i> 221105.1	x(x)	Simultane Fäule Moderfäule	Fasertracheiden Holzstrahlen	++	++	++	++	++	+(+)
<i>G. adspersum</i>	xxx	Simultane Fäule/ (Sel. Delignifiz.)	Fasertracheiden Parenchym	++	++	+(+)	++	++	+
<i>G. lipsiense</i>	xxx	Simultane Fäule/ (Sel. Delignifiz.)	Fasertracheiden Parenchym (Gefäße)	+	+(+)	+	+	+(+)	-(+)
<i>K. deusta</i>	xxxx	Moderfäule Typ I	Fasertracheiden Parenchym	++	++	++	++	++	-
<i>P. squamosus</i>	xx	Simultane Fäule/ Sel. Delignifiz.	Fasertracheiden Holzstrahlen (Parenchym)	-	-	-	-	+(+)	-

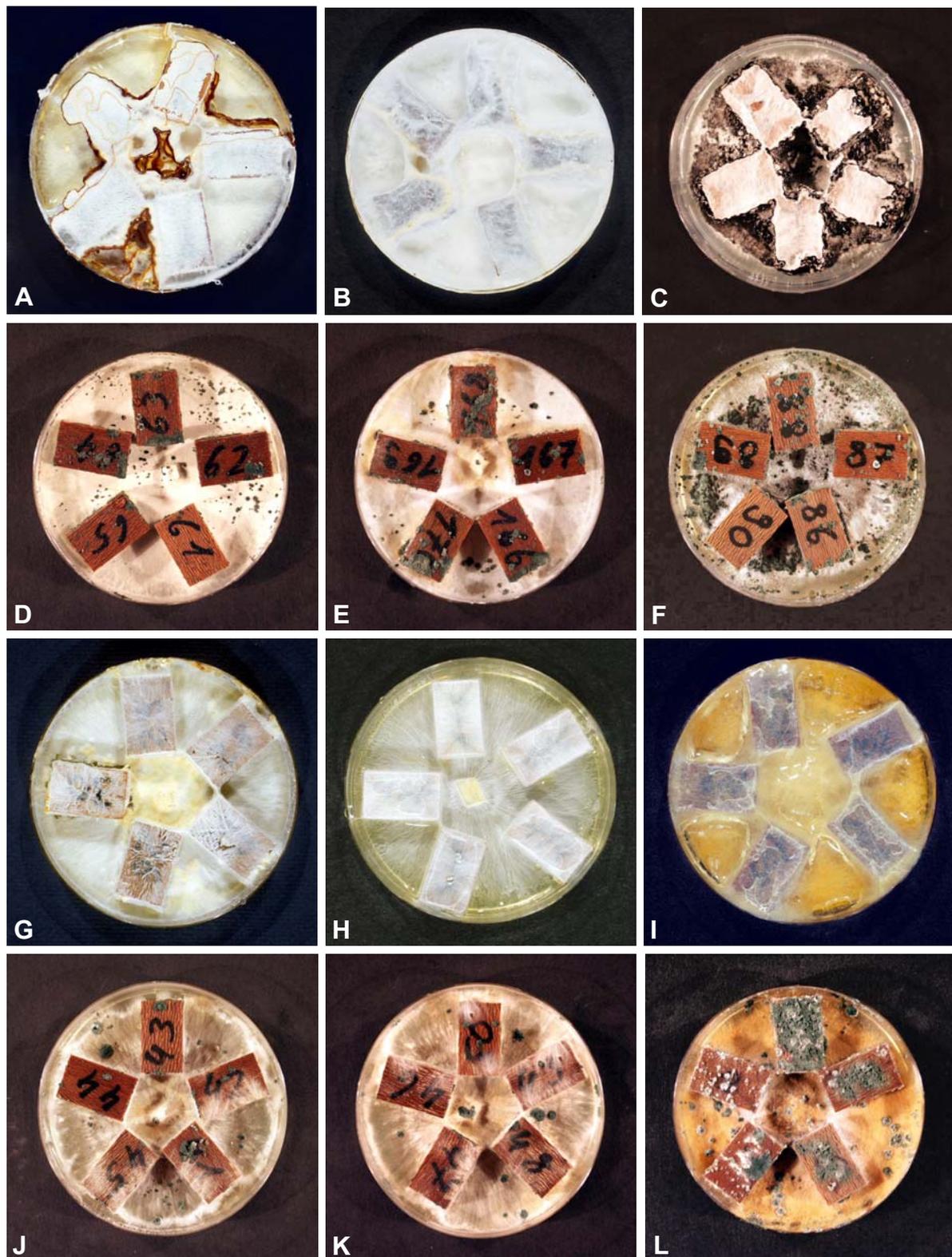
T1 = *Trichoderma atroviride* 15603.1 Karsten  
 T2 = *Trichoderma atroviride* 351.93 Karsten  
 T3 = *Trichoderma atroviride* 396.92 Karsten  
 T4 = *Trichoderma harzianum/polysporum* Bissett  
 T5 = *Trichoderma virens* Miller, Giddens & Foster  
 T6 = *Trichoderma fasciculatum (strictipile)* Bissett

Bereits nach der ersten Inkubationszeit bildete sich auf den mit *Trichoderma* spp. unbehandelten Holzproben (Kontrolle) eine dichte Myzelschicht der Holzersetzer aus, die insbesondere bei *K. deusta* und den beiden *Ganoderma*-Arten deutlich ausgeprägt war (Abbildung 15A-C). Im weiteren Verlauf (Ink. II und III) wurden die Proben durch die Holz abbauenden Pilze komplett besiedelt. Bei den mit *Trichoderma* spp. beimpften Proben konnten sowohl bei der Lösung I als auch bei der Lösung II Sporenlager auf den Holzproben beobachtet werden. Die Sporenlager

von *Trichoderma* spp., die als Indikator für eine Besiedlung der Proben dienten, ließen in den meisten Fällen (84%) bei der Lösung II (Glucose und Harnstoff) eine vermehrte und stärkere Ausbildung der Sporenlager erkennen (Abbildung 14C). Dies wurde als Indiz gewertet, dass die Proben mit der Variante II schneller bzw. stärker von *Trichoderma* spp. besiedelt worden sind. Ob die Lösung II die Effektivität von *Trichoderma* ssp. und damit die protektive Wirkung erhöht hat, konnte makroskopisch nicht festgestellt werden. Eine Besiedlung der Holzproben durch die Holz zersetzenden Pilze konnte durch *Trichoderma* spp. in 88% der Fälle verhindert werden (Abbildung 15D-F). In den Fällen, in denen *Trichoderma* spp. nicht in der Lage war, eine Besiedlung durch die Holzzersetzer zu unterbinden, konnten sie zumindest das Wachstum und damit das Fortschreiten verlangsamen (Abbildung 15J & K). Zusätzlich wurden auch Unterschiede in Bezug zur protektiven Wirkung zwischen den *Trichoderma*-Arten beobachtet. *Trichoderma virens* war in der Lage, bei allen eingesetzten Holz zerstörenden Pilzen die Besiedlung des Platanenholzes zu verhindern. So wiesen die Holzproben auch nach der 3. Inkubationszeit keine Strukturveränderungen auf (Abbildung 14A). *T. fasciculatum (strictipile)* konnte dagegen das Wachstum von *G. lipsiense* und insbesondere von *P. squamosus* und *K. deusta* nur eingeschränkt verlangsamen. Interessant war die Beobachtung, dass sich *Polyporus squamosus* in diesen Tests als besonders konkurrenzstark (resistent) erwies. So waren die restlichen *Trichoderma*-Arten zwar in der Lage, die Besiedlung der Platanenholzproben durch *Ganoderma* spp., *K. deusta* und *I. hispidus* 200792.1/221105.1 zu verhindern, aber nicht die Besiedlung durch *P. squamosus*.



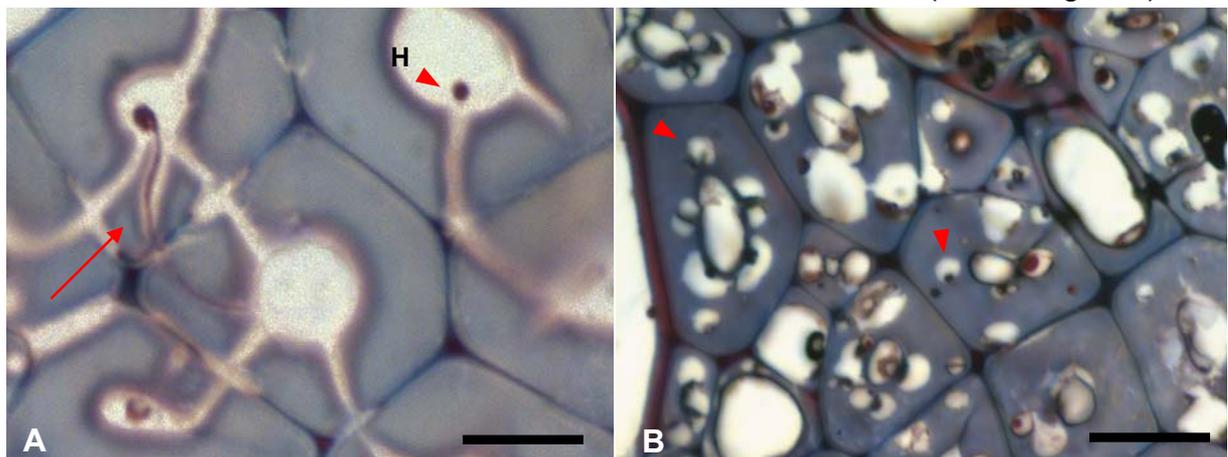
**Abb. 14:** **A:** 1 = Nullvariante. 2 = Holzprobe mit *T. virens* behandelt und mit *Polyporus squamosus* inokuliert. Die Proben ließen auch nach 18-wöchiger Inkubationszeit, bis auf eine Farbveränderung (Verdunklung), keine Holzmodifikationen erkennen. 3 = Platanenholz inokuliert mit *P. squamosus*. (Kontrolle). Das Holz wies bereits nach der Inkubationszeit II einen deutlichen Holzabbau auf. **B:** 1 = *Trichoderma atroviride* 15603.1 konnte eine Besiedlung und somit einen weit reichenden Holzabbau von *K. deusta* verhindern (Ink. III). 2 = An den Proben ohne vorheriger Beimpfung mit *Trichoderma* spp. konnte man bereits nach der 2. Inkubationszeit Zersetzungserscheinungen und Demarkationslinien im Holz verursacht durch *K. deusta* beobachten. **C:** 1 = Die mit der Lösung II beimpften Proben ließen eine verstärkte Bildung der Sporenlager von *Trichoderma* spp. auf dem Holz erkennen. 2 = Mit Sporenlösung I beimpfte Proben wiesen deutlich weniger Sporenlager auf.



**Abb. 15:** **A:** Dichtes, weißes Myzel mit amorpher Kruste von *G. adspersum* auf den Kontrollproben nach Ink. III. **B:** Kontrollproben von *G. lipsiense* nach Ink. III. **C:** *K. deusta* bildete neben einem dichten Myzelmantel auch Pseudosklerotien auf den Proben (Kontrolle) aus. **D:** *T. atroviride* 15603.1 verhinderte eine Besiedlung des Holzes durch *G. adspersum* (Ink. III). **E:** *T. harzianum/polysporum* (BINAB) konnte eine Besiedlung von *G. lipsiense* unterbinden (Ink. III) **F:** Die mit *T. atroviride* 15603.1 behandelten Proben ließen kein Myzelwachstum von *K. deusta* erkennen. **G + H:** Kontrolle von *P. squamosus* nach Ink. II und Ink. III **I:** Kontrolle von *I. hispidus* 221105.1 (Ink. III) **J + K:** *T. atroviride* 15603.1 und 351.93 konnten die Besiedlung von *P. squamosus* nicht verhindern (Ink. II und Ink. III) **L:** *T. atroviride* 396.92 ließ deutliche Sporenlager auf den Proben erkennen (Lösung I). Er konnte auch eine Besiedlung des Platanenholzes durch *I. hispidus* 221105.1 unterbinden (Ink. III).

### Holzabbaumuster

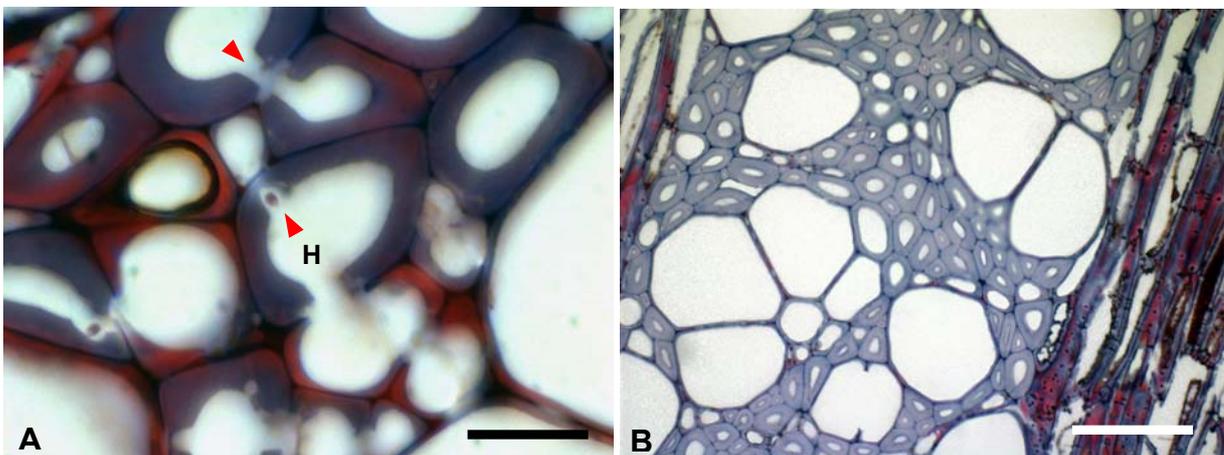
Die beiden *Inonotus hispidus* Stämme ließen in ihrem Holzersetzungsmuster keine Unterschiede erkennen und aus diesem Grund werden die Beobachtungen zusammengefasst dargestellt. Die Kontrollproben (ohne *Trichoderma*-Behandlung) inokuliert mit *I. hispidus* wiesen im Vergleich zu den restlichen Holzsetzern nach der Inkubationszeit III den geringsten Zersetzungsgrad auf. Vorwiegend erfolgte der Abbau in den Holzstrahlen, die ein vermehrtes Hyphenaufkommen zeigten. Daneben konnten Hyphen im Lumen auf der S<sub>3</sub>-Schicht der Fasertracheiden beobachtet werden, die mittels einer simultanen Fäule progressiv abgebaut wurden (Abbildung 16A). Neben einer Weißfäule (simultane Fäule) ließ *I. hispidus* auch ein Abbaumuster in Form einer Moderfäule des Typ I (Hypenwachstum innerhalb der S<sub>2</sub>-Schicht) erkennen. Dieser Fäuletyp konnte vorwiegend in den homogenen Holzstrahlen des Platanenholzes beobachtet werden. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der mit *Trichoderma* spp. vorbehandelten Proben ließen einen deutlichen reduzierten Zersetzungsgrad des Holzes erkennen. Weitgehende Bereiche des Platanenholzes waren intakt. Unterschiede zwischen den *Trichoderma*-Arten in Bezug zur protektiven Wirkung konnte hierbei nur graduell festgestellt werden. Interessant war die Tatsache, dass befallene Bereiche des mit *Trichoderma* spp. behandelten Holzes, bei denen Modifikationen an den Zellwänden zu erkennen waren, ausschließlich durch eine Moderfäule verursacht wurden (Abbildung 16B).



**Abb. 16:** **A:** Die Hyphen [H] von *I. hispidus* liegen im Lumen auf der S<sub>3</sub>-Schicht. Daneben waren Bohrlöcher in den Zellwänden erkennbar (Pfeil) (MS = 2µm). **B:** Neben einer simultanen Fäule konnte auch ein Zellwandabbau mittels einer Moderfäule des Typ I beobachtet werden (MS = 5µm).

Die *Ganoderma*-Arten (*G. adspersum* und *G. lipsiense*) zeigten ein sehr ähnliches Abbauverhalten. Die mit diesen Pilzen inokulierten Kontrollproben wiesen bereits nach der 6-wöchigen Inkubationszeit einen deutlichen Holzabbau auf. Hierbei wurde neben den Fasertracheiden des Früh- und Spätholzes insbesondere das axiale

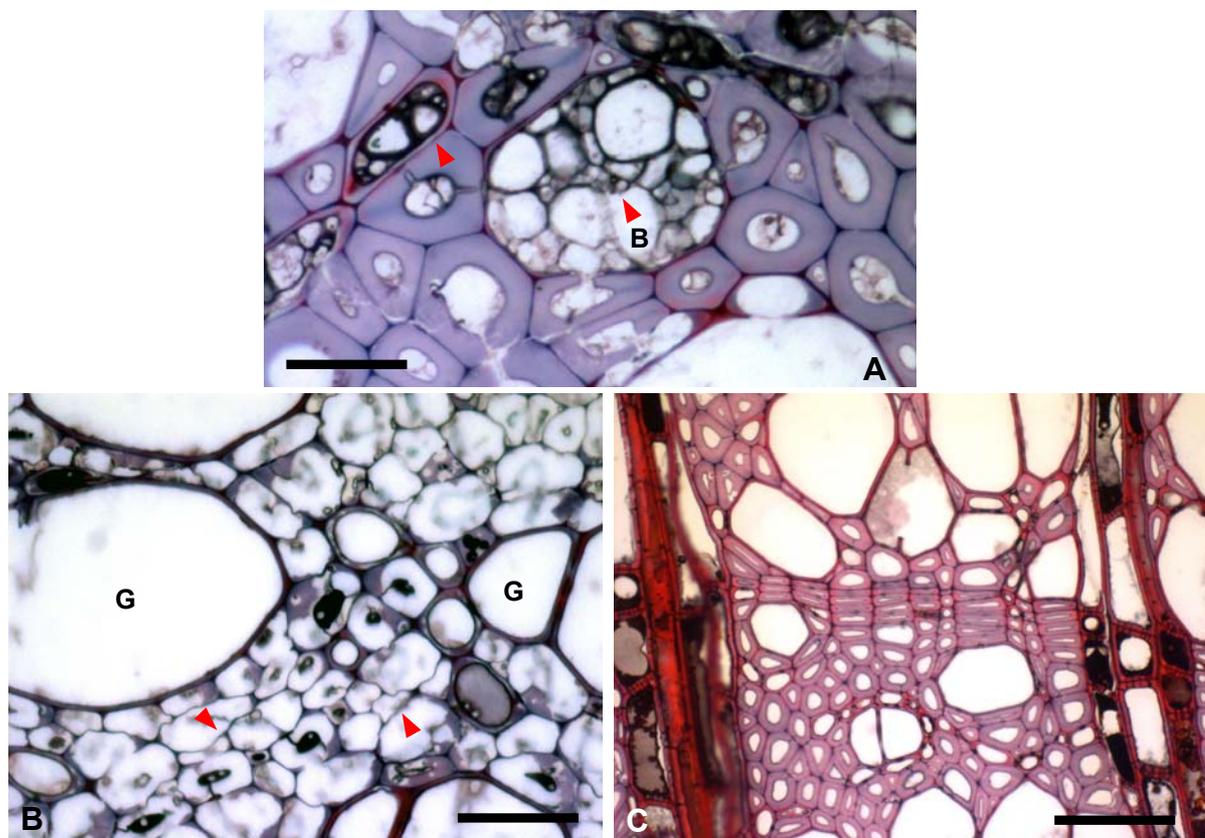
Parenchym, welches apotracheal-diffus bis diffus-gehäuft und paratracheal-spärlich im Grundgewebe verteilt ist, besiedelt und abgebaut. Zudem konnten vermehrt Hyphen von *G. lipsiense* in den Gefäßen beobachtet werden, die im Anfangsstadium aber keine Anzeichen einer Zersetzung aufwiesen. Im weiteren Verlauf ließen die Zellwände des Parenchyms deutliche Strukturveränderungen in Form einer simultanen Fäule erkennen, dagegen wurden die Fasertracheiden neben einer simultanen Fäule ebenfalls mittels einer selektiven Delignifizierung abgebaut (Abbildung 17A). In allen Fällen lagen die Hyphen der *Ganoderma*-Arten im Lumen auf der S<sub>3</sub>-Schicht. Die Gefäßzellen ließen nach der 18-wöchigen Inkubationszeit nur bei *G. lipsiense* Modifikationen erkennen. Der Holzabbau durch *G. adspersum* konnte durch alle *Trichoderma*-Arten deutlich reduziert werden. So waren die Zellwände und weitgehende Bereiche des Platanenholzes frei von Zersetzungserscheinungen (Abbildung 17B). Die protektive Wirkung von *Trichoderma* spp. gegen einen Holzabbau durch *G. lipsiense* konnte ebenfalls festgestellt werden. Hier wies das Holz im Vergleich zu den Kontrollproben einen deutlichen geringeren Zersetzungsgrad auf und nur vereinzelte Zellwände ließen Spuren eines Abbaues mittels simultaner Fäule und selektiver Delignifizierung erkennen. Insgesamt konnte der Holzabbau von *Ganoderma* spp. durch alle *Trichoderma*-Arten deutlich reduziert werden.



**Abb. 17:** **A:** Progressiver Zellwandabbau mittels simultaner Fäule. In unmittelbarer Umgebung der Hyphen [H] erfolgte der Abbau (MS = 5µm). **B:** Das mit *T. virens* vorbehandelte Holz war auch nach der 18-wöchigen Inkubationszeit weitgehend frei von Zersetzungserscheinungen (MS = 50µm)

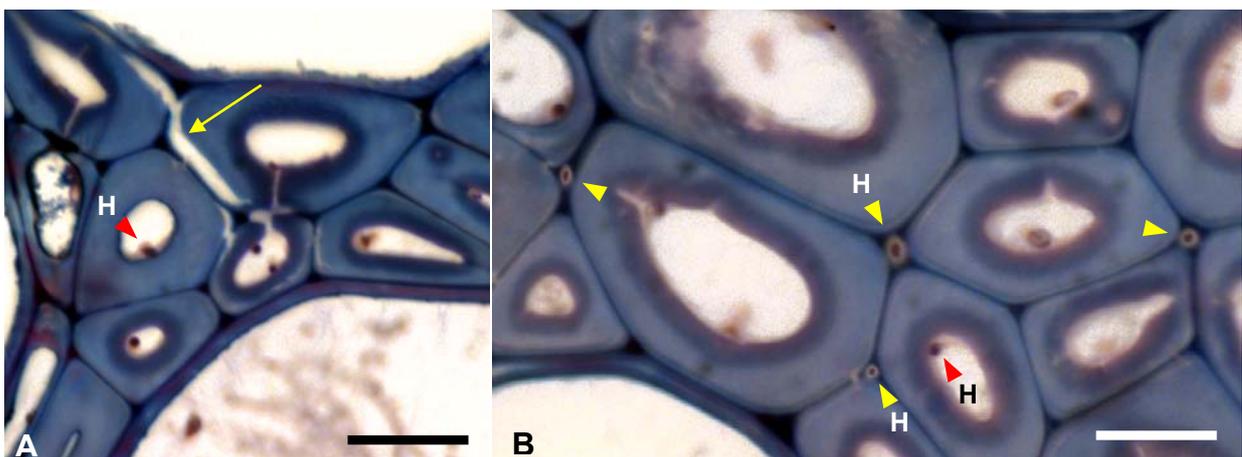
***Kretzschmaria deusta*** zersetzte das Holz der unbehandelten Proben (Kontrolle) von allen Holzzersetzern am stärksten. So wiesen unter dem Mikroskop neben dem Längsparenchym besonders die Fasertracheiden des Frühholzes bereits nach der 6-wöchigen Inkubationszeit starke Veränderungen in der Zellwand auf. Die Hyphen von

*K. deusta* wuchsen innerhalb der S<sub>2</sub>-Schicht und bauten in unmittelbarer Umgebung die Zellwand ab. Die Gefäßzellen sowie die Holzstrahlen ließen Hyphen im Lumen aber nur geringe Anzeichen einer Zersetzung erkennen. Im Spätstadium der Holzzersetzung wurden auch die Fasertracheiden des Spätholzes mittels einer Moderfäule (Typ I) abgebaut. Durch den bevorzugten Abbau von Zellulose und Hemizellulose blieb die Mittelschicht weitgehend erhalten (Abbildung 18B). Die für *K. deusta* typischen schwarzen Demarkationslinien, welche das zersetzte Holz durchziehen, wurden durch blasenartiges Auftreiben der Hyphen im Lumen der Gefäßzellen hervorgerufen (Abbildung 18A). Der Zersetzungsgrad konnte durch die Applikation von *Trichoderma* spp. deutlich minimiert werden. So waren auch nach der Inkubationszeit III weite Bereiche des Platanenholzes frei von Modifikationen (Abbildung 17C). Einzige Ausnahme hierbei bildeten die mit *T. fasciculatum* behandelten Proben. Dieser Pilz war nur eingeschränkt in der Lage, das Wachstum von *K. deusta* und damit das Holz vor einem Abbau zu schützen. So konnte insbesondere nach 18 Wochen Inkubationszeit deutliche Zeichen einer Moderfäule an den Zellwänden beobachtet werden.



**Abb. 18:** **A:** Die Demarkationslinien wurden durch blasenartiges Auftreiben der Hyphen von *K. deusta* [B] hervorgerufen (MS = 5µm). **B:** Nach der Inkubationszeit III war die zellulosereiche Sekundärwand der Fasertracheiden weitgehend abgebaut und nur die Mittelschicht, neben den Gefäßen [G], blieb in modifizierter Form erhalten (MS = 10µm). **C:** Intaktes Holz (MS = 50µm).

Das mit *Polyporus squamosus* künstlich inokulierte Platanenholz wies auch nach der 3. Inkubationszeit einen mäßigen Zersetzungsgrad auf. Die Ausbreitung von *P. squamosus* erfolgte vornehmlich über die Holzstrahlen, die im Anfangsstadium neben den Fasertracheiden des Frühholzes bevorzugt abgebaut wurden. Im Weiteren Verlauf konnten vermehrt Hyphen im Zelllumen der Holzstrahlen und Fasertracheiden des Früh- und Spätholzes beobachtet werden. Die Strukturveränderungen in den Zellwänden ließen neben einer simultanen Fäule (Abbau der Zellwand von Innen nach Außen) eine selektive Delignifizierung erkennen. Letzteres Zersetzungsmodell verursachte im Spätstadium ein Ablösen der S<sub>2</sub>-Schicht nach innen zum Lumen und durch den Abbau der Mittellamelle gar ein Lösen ganzer Zellen aus ihrem Verbund (Abbildung 19A). *Polyporus squamosus* erwies sich in diesen Interaktionstests als weitgehend resistent gegenüber *Trichoderma* spp. Einzig *T. virens* war in der Lage, ein Befall des Holzes zu verhindern und damit einem Holzabbau vorzubeugen. Die restlichen *Trichoderma*-Arten konnten die Besiedlung der Platanenproben nur verzögern. So zeigten sich unter dem Mikroskop ein deutliches Hyphenaufkommen und Zersetzungserscheinungen an den Zellwänden. Interessant war hierbei die Beobachtung, dass die Hyphen von *P. squamosus* sich nicht im Lumen, sondern vorwiegend auf der Mittellamelle befanden (Abbildung 19B). Diese Mittelschicht ließ in unmittelbarer Umgebung der Hyphen Anzeichen eines Abbaues erkennen.



**Abb. 19:** **A:** Das künstlich mit *P. squamosus* inokulierte Holz (Kontrolle) wies auch nach der 18-wöchigen Inkubationszeit eine geringe bis mäßige Zersetzungsrate auf. Das Holz wurde neben einer simultanen Fäule vorwiegend mittels einer selektiven Delignifizierung abgebaut. Dabei lagen die Hyphen [H] ausschließlich auf der S<sub>3</sub>-Schicht und durch den vorwiegenden Abbau des Lignins kam es zum Schwund und zu einem Lösen der S<sub>2</sub>-Schicht. Zusätzlich lösten sich durch den Abbau der Mittelschicht ganze Zellen aus ihrem Verbund (Pfeil) (MS = 5µm). **B:** *Polyporus squamosus* war weitgehend resistent gegenüber einer Behandlung mit *Trichoderma* spp. Nur *Trichoderma virens* war in der Lage, das Platanenholz gegen eine Besiedlung und damit vor einem Abbau zu schützen. Die Hyphen [H] von *P. squamosus* wuchsen bei den mit *Trichoderma* spp. vorbehandelten Proben sowohl im Lumen (roter Pfeilkopf) als auch auf der Mittellamelle (gelbe Pfeilköpfe) (MS = 2µm).

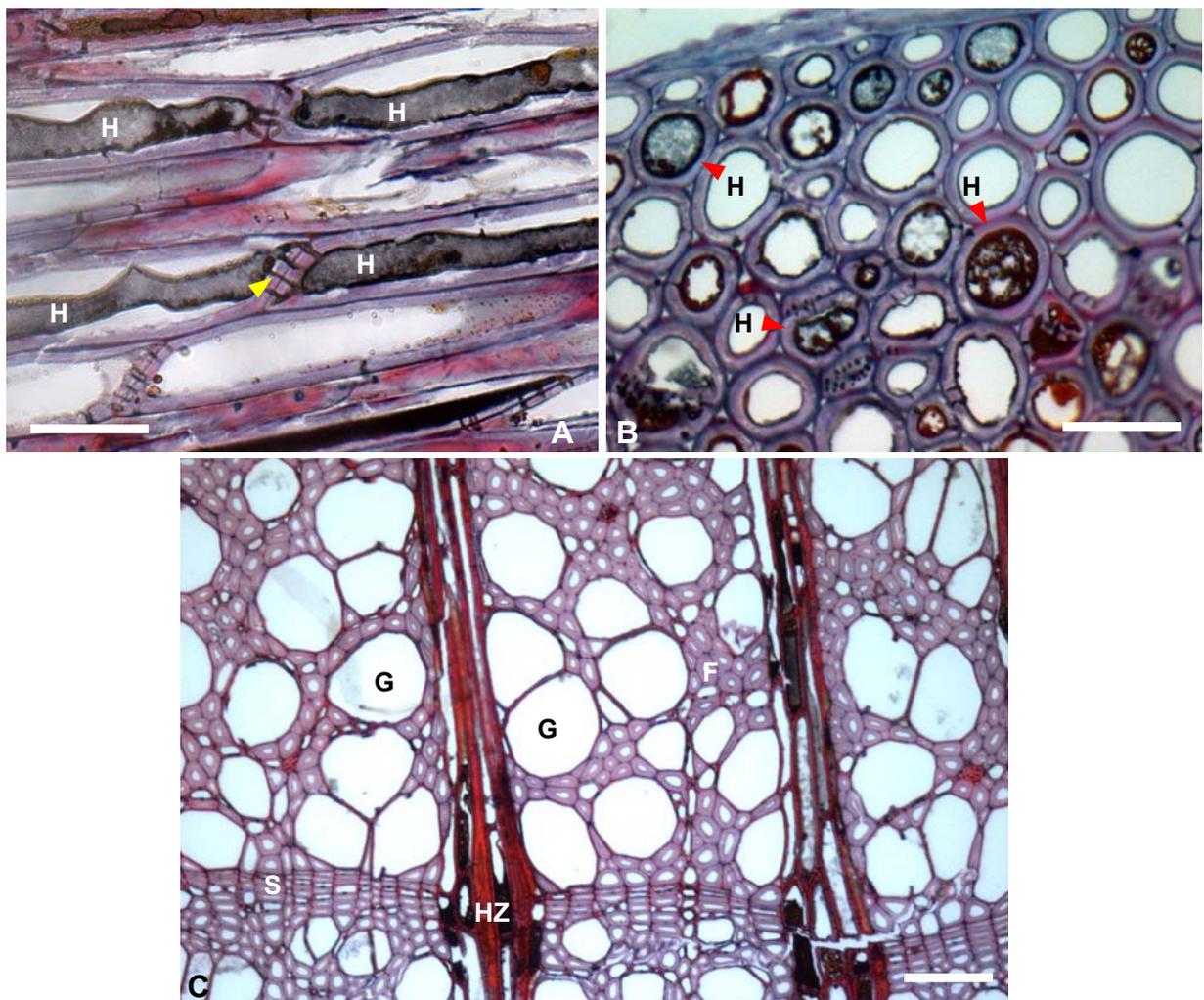
Unterschiede zwischen den applizierten Sporenlösungen I & II in Bezug zur Steigerung der Effektivität von *Trichoderma* spp., das Wachstum der Holz zersetzenden Pilze zu hemmen und damit einem Holzabbau vorzubeugen, konnten lichtmikroskopisch innerhalb der 6- und 12-wöchigen Inkubationszeiten nur graduell beobachtet werden. Nach der 18-wöchigen Inkubationszeit fielen die Unterschiede deutlicher aus. So wiesen die mit der Sporenlösung II beimpften Holzproben geringere Zersetzungsgrade auf. Hierbei muss betont werden, dass die Unterschiede zwar sichtbar, aber insgesamt wenig ausgeprägt waren.

### ***Trichoderma* spp.**

Die lichtmikroskopische Auswertung der Platanenholzproben, die nur mit *Trichoderma* spp. beimpft wurden (ohne Inokulation mit Holzzeretzern), sollte zum einen die Mechanismen aufzeigen, mit der das Holz besiedelt und ggf. abgebaut wurde und zum anderen, inwieweit die Zugabe von Glucose und Harnstoff (Sporenlösung II) diese Besiedlung verstärken konnte. Da zwischen *Trichoderma* spp. in der Besiedlungsstrategie keine Unterschiede festgestellt wurden, werden die Beobachtungen für alle Arten zusammengefasst ausgeführt.

Die Ausbreitung und Erschließung der Platanenholzproben durch die *Trichoderma*-Arten erfolgte nach dem Prinzip des geringsten Widerstandes. So breiteten sich die Hyphen in radialer Richtung vorwiegend in den breiten, mehrreihigen Holzstrahlen aus (Abbildung 20A & B). Zusätzlich konnte eine Expansion in axialer Richtung durch ein vermehrtes Hyphenwachstum innerhalb der zerstreut angeordneten Gefäßzellen beobachtet werden. Durch das geringe Vorkommen von Längsparenchym (apotracheal-diffus und paratracheal-spärlich) war die Ausbreitung in tangentialer Richtung eingeschränkt. Die Besiedlung benachbarter Zellen erfolgte ausschließlich über die Tüpfelverbindungen mittels feiner, dünner Hyphen (1-2µm); somit konnten keine Bohrlöcher in den Zellwänden beobachtet werden (Abbildung 20A). Das Grundgewebe (Fasertracheiden) des Platanenholzes ließ nur sehr spärlich Hyphen erkennen. Insgesamt konnte auch nur eine Besiedlung der Peripherie der Holzprobe festgestellt werden. So wurden auch nach der 18-wöchigen Inkubationszeit im Zentrum der Proben nur vereinzelt Hyphen in den Gefäßen und Holzstrahlen beobachtet. Einen gerichteten Zellwandabbau konnte zu keiner der 3 Inkubationszeiten durch *Trichoderma* spp. festgestellt werden. Nach der Inkubationszeit III zeigten sich Modifikationen vorwiegend in den Holzstrahlen. Diese

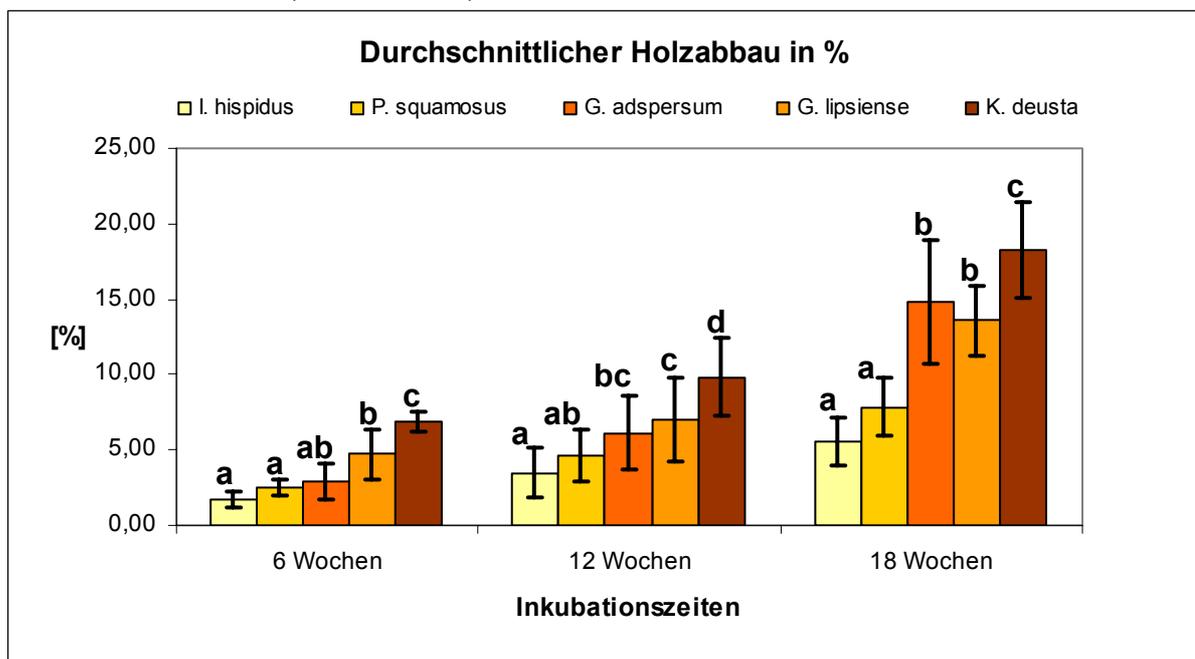
Veränderungen wurden durch keine der klassifizierten Holzabbaumuster (Weiß-, Moder- oder Braunfäule) hervorgerufen. Einen positiven Einfluss der Sporenlösung II auf die Besiedlung des Holzes wurde lichtmikroskopisch erst nach der 18-wöchigen Inkubationszeit deutlich. Hier war die Intensität des Hyphenaufkommens in den Gefäßen, Holzstrahlen und Axialparenchym sowie in den Fasertracheiden stärker als bei der Sporenlösung I. Dennoch wurden auch hier nur die Randbereiche der Probe besiedelt und die Probenmitte war weitgehend frei von *Trichoderma*-Hyphen (Abbildung 20C).



**Abb. 20:** **A:** Eine Besiedlung der Proben durch *Trichoderma* spp., welche nicht künstlich mit Holz zersetzenden Pilzen inokuliert wurden, erfolgte vorwiegend in den zerstreut angeordneten Gefäßen (axial) und in den mehrreihigen Holzstrahlen (radial). Innerhalb der Holzstrahlen wurden sehr dicke Hyphen [H] (2-4 $\mu$ m) ausgebildet, die sich über Tüpfelverbindungen in andere Zellen ausbreiteten (gelber Pfeilkopf) (MS = 5 $\mu$ m). **B:** Tangentialschnitt durch einen Holzstrahl. Gut zu erkennen sind die sehr dicken Hyphen [H] von *Trichoderma* spp. im Lumen der Zellen (MS = 5 $\mu$ m). Auch nach der Inkubationszeit III konnten nur graduelle Veränderungen an den Zellwänden beobachtet werden. **C:** Die *Trichoderma*-Arten waren auch innerhalb der 18-wöchigen Inkubationszeit nur in der Lage, die Peripherie der Holzprobe und nicht das Zentrum zu besiedeln. So wiesen die Gefäße [G], die Holzstrahlen [HZ], das Spätholz [S] und die Fasertracheiden des Frühholzes [F] keine Hyphen oder sonstige Besonderheiten auf (MS = 50 $\mu$ m).

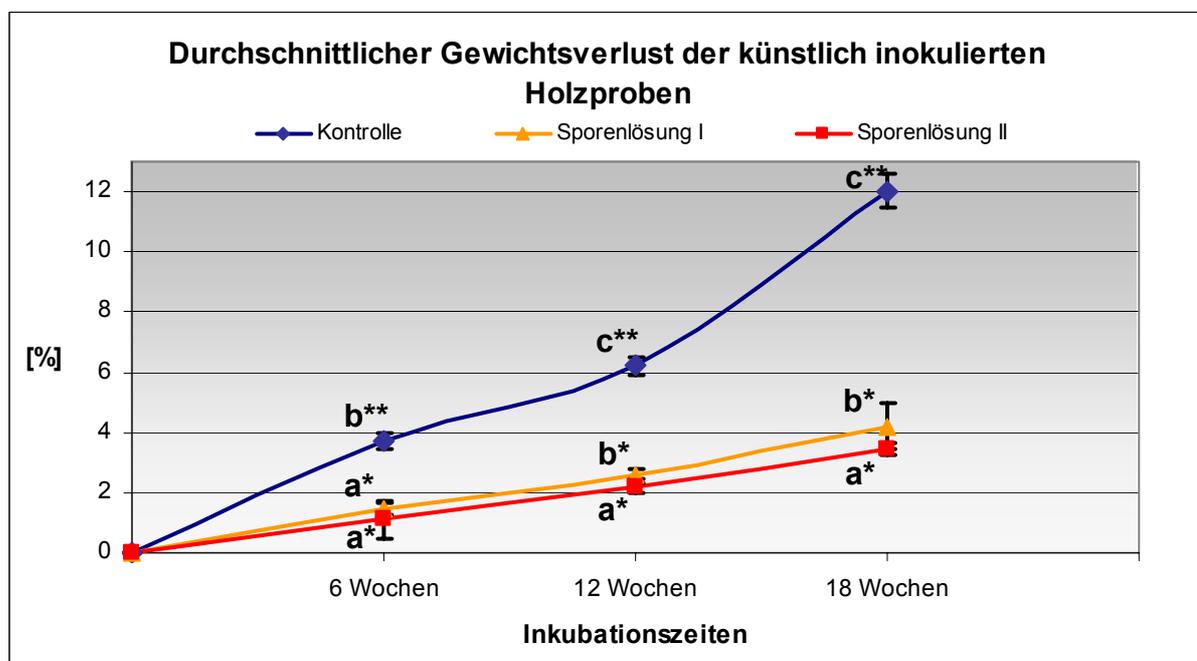
### 3.1.3.2 Gewichtsverlustmessungen

Die erzielten Ergebnisse der Gewichtsverlustmessungen stehen weitgehend im Einklang mit den vorangegangenen makro- und mikroskopischen Beobachtungen. Die Proben (Kontrolle), die künstlich mit den Holz zersetzenden Pilzen inokuliert und keiner vorherigen *Trichoderma*-Beimpfung unterzogen wurden, wiesen nach den Inkubationszeiten (I, II und III) einen deutlichen Gewichtsverlust auf (Abbildung 21). Nach der 6-wöchigen Inkubationszeit konnte im Mittel ein Gewichtsverlust von 3,7%, nach 12 Wochen ein Gewichtsverlust von 6,2% und nach 18 Wochen ein Gewichtsverlust von 12% festgestellt werden. Hierbei ließen die eingesetzten Holz abbauenden Pilze signifikante Unterschiede in der Abbaurate erkennen ( $p \leq 0,05$ ). So baute *Kretzschmaria deusta* neben den beiden *Ganoderma*-Arten das Holz über alle 3 Inkubationszeiten am stärksten ab ( $\emptyset$  Gewichtsverlust der Holzproben von 11,65% bzw. 8,21%). *Inonotus hispidus* und *Polyporus squamosus* hingegen wiesen im Vergleich die geringste Holzabbaurate auf ( $\emptyset$  Gewichtsverlust der Holzproben von 3,56% bzw. 4,97%). Bereits nach der ersten Inkubationszeit konnte an den mit *K. deusta* inokulierten Proben ein Gewichtsverlust von 6,85% ermittelt werden. Nach der dritten Inkubationszeit waren es gar 18,27%. Die *Ganoderma*-Arten verzeichneten einen Gewichtsverlust von 3,81% (Ink I), 6,21% (Ink II) und 14,23% (Ink III). Der Gewichtsverlust durch *I. hispidus* und *P. squamosus* lag hingegen nach der Inkubationszeit I bei 1,67% bzw. 2,46% und nach der 18-wöchigen Inkubationszeit bei 5,57% bzw. 7,83%.



**Abb. 21:** Gewichtsverlust der Holzproben (Kontrolle) durch die eingesetzten Holz abbauenden Pilze nach den Inkubationszeiten I, II und III. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Weltsch-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,05$ ).

Eine vorherige Beimpfung der Holzproben mit Sporenlösungen von *Trichoderma* spp. konnte den Verlauf der Holzzersetzung und damit den Gewichtsverlust durch die Holz abbauenden Pilze deutlich mindern (Abbildung 22). Hierbei ergab die statistische Auswertung (ANOVA Varianzanalyse und Post-Hoc-Tests), dass sowohl die Sporenlösung I als auch die Lösung II (Glucose und Harnstoff) den Gewichtsverlust in Bezug zur Kontrolle hochsignifikant reduzieren konnten ( $p \leq 0,001$ ). Im Mittel war der Gewichtsverlust durch die Sporenlösung I um 58,7%, durch die Lösung II gar um 67,2% reduziert. Bereits nach der ersten Inkubationszeit vermochten die Lösungen I und II den Gewichtsverlust hochsignifikant um 56,7% bzw. 66,4% zu reduzieren (59,3% bzw. 65,7% nach Inkubationszeit II) ( $p \leq 0,001$ ). Nach der Inkubationszeit III konnte eine hochsignifikante Reduzierung des Gewichtsverlusts von 60,1% (Sporenlösung I) und 69,6% (Sporenlösung II) verzeichnet werden ( $p \leq 0,001$ ). Ferner zeigte die statistische Auswertung bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ , dass Unterschiede in der protektiven Wirkung von Sporenlösung I und II existierten. Während nach der ersten Inkubationszeit noch keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren, konnten nach den Inkubationszeiten von 12 und 18 Wochen signifikante Differenzen ermittelt werden. Die Zugabe von Glucose und Harnstoff (Sporenlösung II) hatte den Effekt einer durchschnittlichen Steigerung der protektiven Wirkung von 12,65%.



**Abb. 22:** Durchschnittlicher Verlauf des Gewichtsverlusts der inokulierten Holzproben. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Welsh-Test (REGWQ). \* = signifikant ( $p \leq 0,05$ ); \*\* = hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ).

Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, konnten auch (hoch-) signifikante Unterschiede zwischen den *Trichoderma*-Arten in ihrer Effektivität, das Holz vor einem weit reichenden Abbau zu schützen, verzeichnet werden. So erzielte *Trichoderma atroviride* 15603.1 mit einer durchschnittlichen Reduktion des Gewichtsverlustes von 70,4% das beste Ergebnis, gefolgt von *T. atroviride* 351.93 und *T. virens* mit ähnlich guten Ergebnissen (69,8% und 68%). Das signifikant schlechteste Ergebnis erzielte *T. fasciculatum (strictipile)* mit einer mittleren Reduzierung des Gewichtsverlusts von 44,8%. Hochsignifikante Unterschiede konnten auch zwischen den drei *T. atroviride*-Stämmen ermittelt werden. So erzielte *T. atroviride* 396.92 mit einer mittleren Reduktion des Gewichtsverlusts von 61,7% von den 3 eingesetzten Stämmen signifikant die geringste Wirkung ( $p \leq 0,001$ ). *Trichoderma harzianum/polysporum* (BINAB) lag mit 60,9% in der Größenordnung wie *T. atroviride* 396.92.

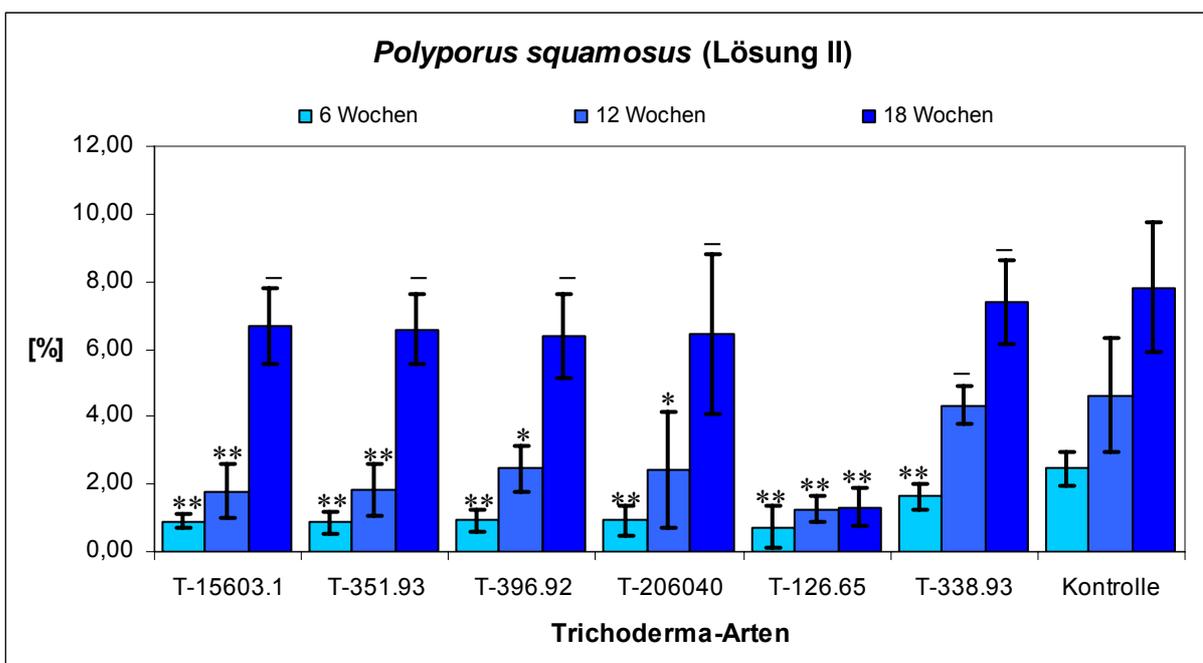
**Tabelle 14:** Reduzierung des Gewichtsverlusts (Holzabbau) in % durch *Trichoderma* spp.

	Sporenlösung I (b*) (58,7%)			Sporenlösung II (a*) (67,2%)			gesamt	p≤0,05	p≤0,001
	Ink I	Ink II	Ink III	Ink I	Ink II	Ink III			
<b>T-15603.1</b>	67,8% [±4,27]	70,2% [±4,17]	63% [±4,03]	75,6% [±4,22]	76,4% [±4,22]	82% [±4,17]	70,4%	+ (a)	+ (a)
<b>T-351.93</b>	66,9% [±4,07]	68,3% [±4,03]	69,2% [±3,94]	72,4% [±4,22]	70,2% [±4,17]	72,1% [±4,17]	69,8%	+ (a)	+ (a)
<b>T-396.92</b>	55,8% [±3,98]	60,9% [±4,03]	59,2% [±4,17]	63,4% [±4,22]	66,7% [±4,22]	64,2% [±4,27]	61,7%	+ (b)	+ (b)
<b>T-206040</b>	57,3% [±4,27]	65,1% [±4,12]	48,2% [±4,07]	65,1% [±4,17]	68,2% [±4,03]	61,4% [±4,07]	60,9%	+ (b)	+ (b)
<b>T-126.65</b>	54,1% [±3,94]	62,5% [±3,98]	72,5% [±3,90]	67,5% [±4,07]	70,1% [±4,12]	81,2% [±4,07]	68,0%	+ (a)	+ (a)
<b>T-338.93</b>	38% [±4,03]	28,8% [±4,07]	48,3% [±3,94]	54,3% [±4,07]	42,7% [±4,03]	56,7% [±4,03]	44,8%	+ (c)	+ (c)

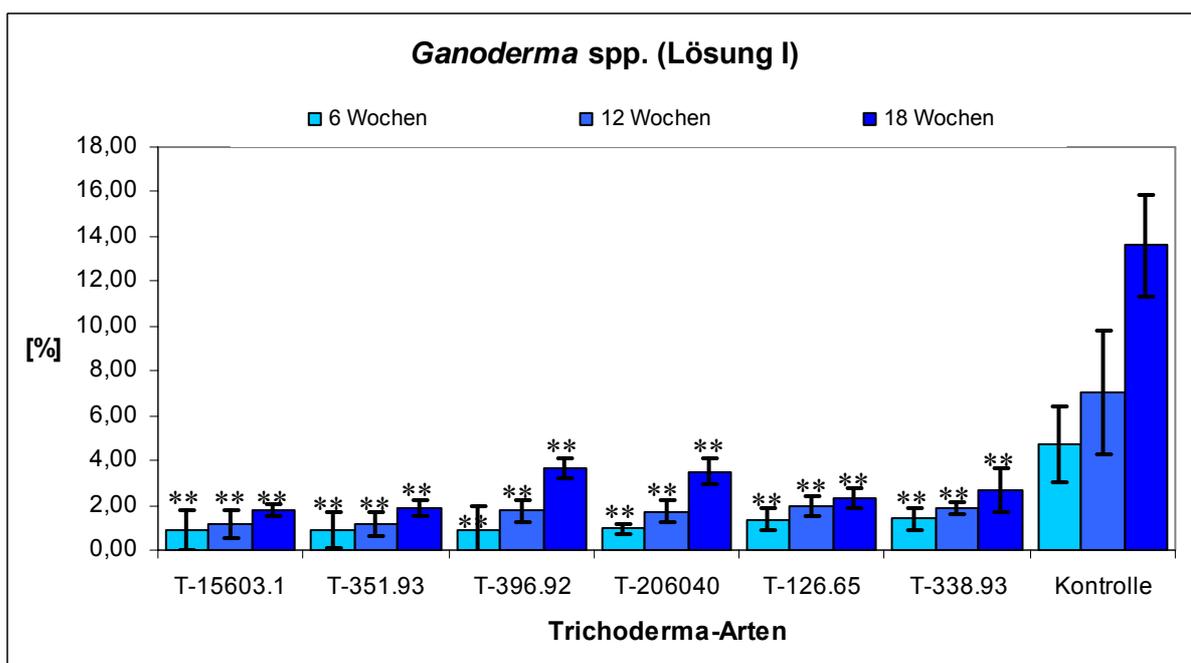
Eine signifikante Hemmung des Gewichtsverlustes (Holzabbau) ist mit + gekennzeichnet (Test nach Dunnett). Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial- Weltsch-Test (REGWQ).

Zwischen den Holz abbauenden Pilzen existierten in Bezug auf Sensitivität (Anfälligkeit) bzw. Resistenz (Widerstandskraft) gegenüber den *Trichoderma*-Arten (hoch-) signifikante Unterschiede. So ließ *Polyporus squamosus* im Schnitt sowohl bei der Behandlung mit der Sporenlösung I als auch II die stärkste Resistenz gegenüber *Trichoderma* spp. erkennen (Abbildung 23). Während nach der ersten Inkubationszeit alle *Trichoderma*-Arten noch in der Lage waren, den Holzabbau zu reduzieren, konnte nach der Inkubationszeit II bei *T. fasciculatum (strictipile)* bereits keine signifikante Wirkung festgestellt werden. Nach der 3. Inkubationszeit war ausschließlich *T. virens* in der Lage, den Gewichtsverlust hochsignifikant zu

reduzieren ( $p \leq 0,001$ ). Die signifikant höchste Sensitivität gegenüber einer *Trichoderma*-Behandlung ließen die *Ganoderma*-Arten erkennen (Abbildung 24). Nach allen 3 Inkubationszeiten war *Trichoderma* spp. in der Lage, den Gewichtsverlust hochsignifikant zu reduzieren ( $p \leq 0,001$ ). Die Pilzarten *Inonotus hispidus* (Stamm 200792.1 & 221105.1) und *Kretzschmaria deusta* wiesen eine etwas geringere Sensitivität als *Ganoderma* spp. auf.

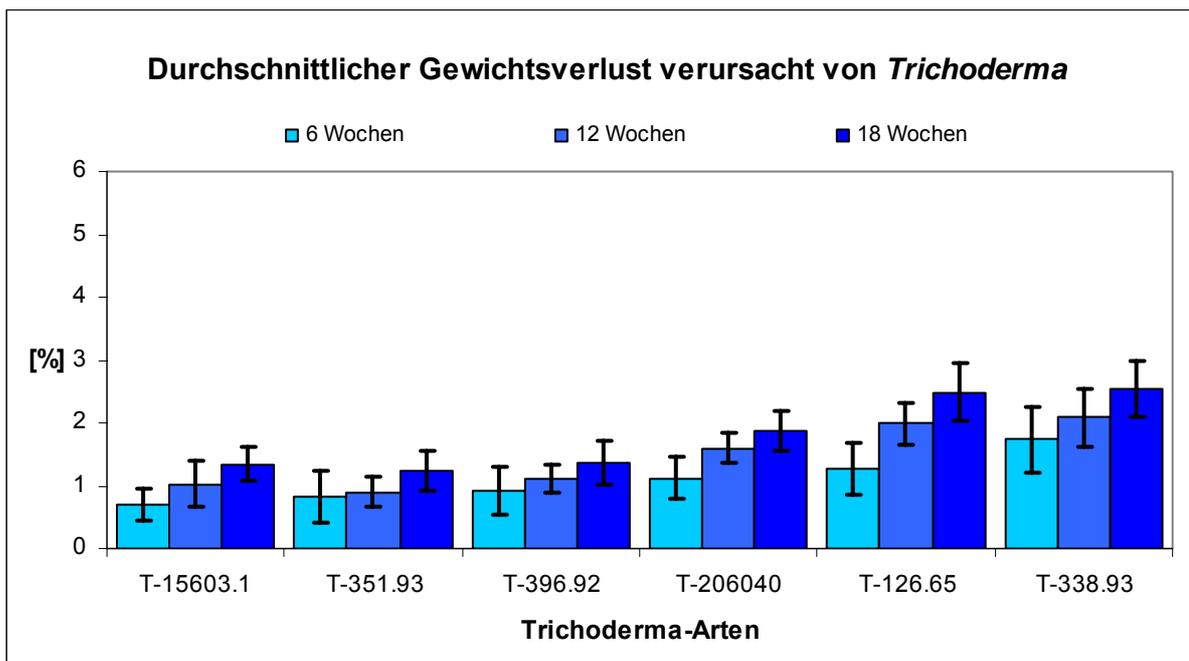


**Abb. 23:** Eine signifikante Hemmung des Gewichtsverlusts ist mit \* gekennzeichnet (Test nach Dunnett). \* = signifikant ( $p \leq 0,05$ ); \*\* = hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ).

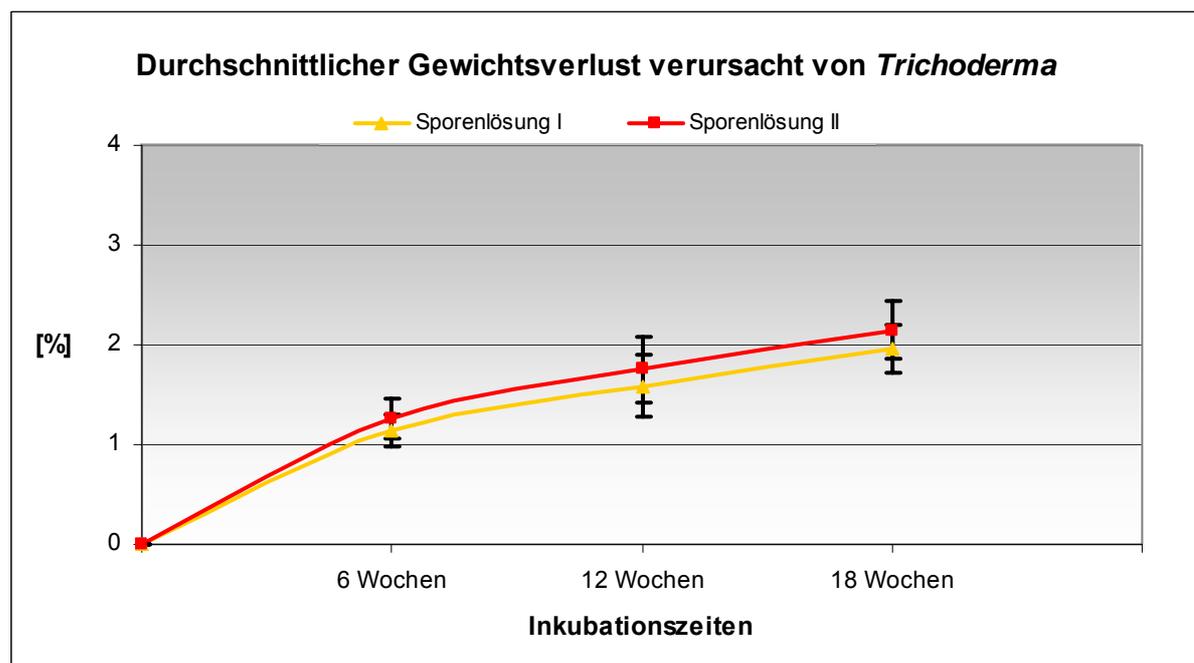


**Abb. 24:** Eine signifikante Hemmung des Gewichtsverlusts ist mit \* gekennzeichnet (Test nach Dunnett). \* = signifikant ( $p \leq 0,05$ ); \*\* = hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ).

Ein Gewichtsverlust der mit *Trichoderma* spp. beimpften Holzproben ohne eine zusätzliche Inokulation mit den Holzzeretzern konnte in Maßen verzeichnet werden. Hierbei erzielten *T. virens* und *T. fasciculatum* die größten Gewichtsverluste (Im Mittel 1,91% bzw. 2,12%). Es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Arten festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ). In Abbildung 26 wird deutlich, dass die Applikation der Lösung II den Gewichtsverlust verursacht durch *Trichoderma* spp. erhöhen konnte. Aber auch hier waren die Unterschiede nicht signifikant ( $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 25:** Gewichtsverlust der mit *Trichoderma* spp. beimpften Proben ohne Inokulation mit Holz zersetzenden Pilzen nach der Inkubationszeit von 6, 12 und 18 Wochen.



**Abb. 26:** Die Sporensuspension II hatte eine Steigerung des Gewichtsverlusts verursacht durch *Trichoderma* spp. nach den Inkubationszeiten von 6, 12 und 18 Wochen zur Folge.

### 3.1.4 Wachstums- und Sporenkeimungsraten

Die Durchführung der Wachstums- und Sporenkeimungstests erfolgte unter kontrollierten Bedingungen. Diese Tests sollten die Wachstum beeinflussenden Faktoren (Nährstoffe, pH-Wert, Temperatur, Wasseraktivität) determinieren und für ein besseres Verständnis über die ökologischen Ansprüche der einzelnen Pilzarten sorgen. Im nachfolgenden werden die erzielten Ergebnisse dargestellt.

#### 3.1.4.1 Wachstumsraten

Die Wachstumsraten (mm/7 Tage) und die Ergebnisse der statistischen Auswertungen (ANOVA Varianzanalyse und Post-Hoc-Tests) der Holz abbauenden Pilze sind in Tabelle 15 zusammengefasst dargestellt. So unterschieden sich alle Holzersetzer, bis auf die beiden *Ganoderma*-Arten, in ihrem Wachstum signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Während *Ganoderma* spp. im Mittel die höchste Wachstumsrate (29,5 bzw. 28,2) zeigte, besaß *K. deusta* mit einem durchschnittlichen Wachstum von 14,5 die geringste Rate. Des Weiteren konnten signifikante Unterschiede zwischen den Medien verzeichnet werden ( $p \leq 0,001$ ). Das Wachstum der Pilze war auf dem nährstoffreichen Medium MEA im Schnitt höher als auf dem nährstoffarmen LNA-Medium. Eine Einstellung des pH-Wertes auf 7 hatte zur Folge, dass das Wachstum der Pilze, im Gegensatz zu einem pH-Wert im sauren Bereich (5), reduziert wurde. Signifikanzen konnten hierbei allerdings nur auf dem Medium LNA ermittelt werden.

**Tabelle 15:** Wachstumsraten der Holzersetzer auf unterschiedlichen Medien bei 25°C

	MEA		LNA		gesamt	p≤0,001
	pH-Wert 5 (29,6) a	pH-Wert 7 (27,1) a	pH-Wert 5 (22,5) b	pH-Wert 7 (16,6) c		
	mm/7 Tage	mm/7 Tage	mm/7 Tage	mm/7 Tage		
<i>I. hispidus</i> 200792.1	30,8 [± 0,41]	25,1 [±2,63]	29,7 [±0,33]	18,3 [±1,20]	25,9	<b>b</b>
<i>I. hispidus</i> 221105.1	29,4 [± 0,38]	26,6 [±1,76]	29,3 [±0,43]	19,1 [±1,27]	26,1	<b>b</b>
<i>G. adspersum</i>	37,9 [±0,73]	41,0 [±1,16]	23,7 [±0,93]	15,3 [±0,60]	29,5	<b>a</b>
<i>G. lipsiense</i>	40,1 [±1,84]	41,2 [±1,74]	17,5 [±1,26]	14 [±0,29]	28,2	<b>a</b>
<i>K. deusta</i>	19,3 [±0,41]	15,8 [±0,44]	12,5 [±0,29]	10,3 [±0,17]	14,5	<b>d</b>
<i>P. squamosus</i>	20,2 [±0,43]	12,8 [±0,33]	22,3 [±0,17]	23,0 [±1,04]	19,6	<b>c</b>

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Welsh-Test (REGWQ).

In Tabelle 16 sind die Wachstumsraten (mm/24h) und die Ergebnisse der statistischen Auswertungen (ANOVA Varianzanalyse) dargestellt. Bei einem Vergleich der Wachstumsraten von *Trichoderma* spp. mit denen der Holz zersetzenden Pilze wird deutlich, dass *Trichoderma* spp. über ein hochsignifikant schnelleres Wachstum verfügt ( $p \leq 0,001$ ). Aber auch innerhalb der *Trichoderma*-Arten konnten signifikante Unterschiede in Bezug auf die Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt werden ( $p \leq 0,001$ ). So wies *T. virens* im Mittel die höchste Wachstumsrate (20,6mm/24h) auf. Das geringste Wachstum wurde bei *T. fasciculatum* beobachtet (11mm/24h). Hingegen konnten bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001$  keine Unterschiede zwischen den *T. atroviride*-Stämmen verzeichnet werden. Die Wirkungen der unterschiedlichen Medien auf das Wachstum von *Trichoderma* spp. waren auch in diesem Fall (hoch-) signifikant ( $p \leq 0,001$ ). So war die Wachstumsrate im Mittel auf dem Medium MEA (pH 5) am höchsten. Deutlich geringere Wachstumsraten konnten auf den Medien LNA pH 5 und 7 verzeichnet werden. Wie schon bei den Holzzeretzern, war die Wirkung eines pH-Wertes im neutralen Bereich (pH-Wert 7) für das Wachstum der *Trichoderma*-Arten sowohl auf MEA als auch auf LNA im Mittel nachteilig.

**Tabelle 16:** Wachstumsraten von *Trichoderma* spp. auf unterschiedlichen Medien bei 25°C

	MEA		LNA		gesamt	p≤0,001
	pH-Wert 5 (18,9) a	pH-Wert 7 (17,8) b	pH-Wert 5 (12,7) c	pH-Wert 7 (10,9) d		
	mm/24h	mm/24h	mm/24h	mm/24h		
<b>T-15603.1</b>	17,5 [±0,50]	18,2 [±0,44]	7,8 [±0,44]	10 [±0,57]	13,4	<b>c</b>
<b>T-351.93</b>	19,8 [±0,17]	17,3 [±0,44]	9,5 [±0,29]	8,7 [±0,33]	13,8	<b>c</b>
<b>T-396.92</b>	19 [±0,58]	17,7 [±0,17]	9,7 [±1,17]	9,5 [±0,76]	14	<b>c</b>
<b>T-206040</b>	21,8 [±0,44]	20,2 [±0,17]	16,5 [±0,29]	11,8 [±0,17]	17,6	<b>b</b>
<b>T-126.65</b>	20,2 [±0,44]	18,2 [±0,17]	23,8 [±0,44]	20,3 [±0,33]	20,6	<b>a</b>
<b>T-338.93</b>	14,8 [±0,17]	15,3 [±0,33]	8,7 [±0,17]	5,3 [±0,17]	11	<b>d</b>

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Weltsch-Test (REGWQ).

Der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf das Wachstum von *Trichoderma* spp. ist in Tabelle 17 zusammengefasst dargestellt.

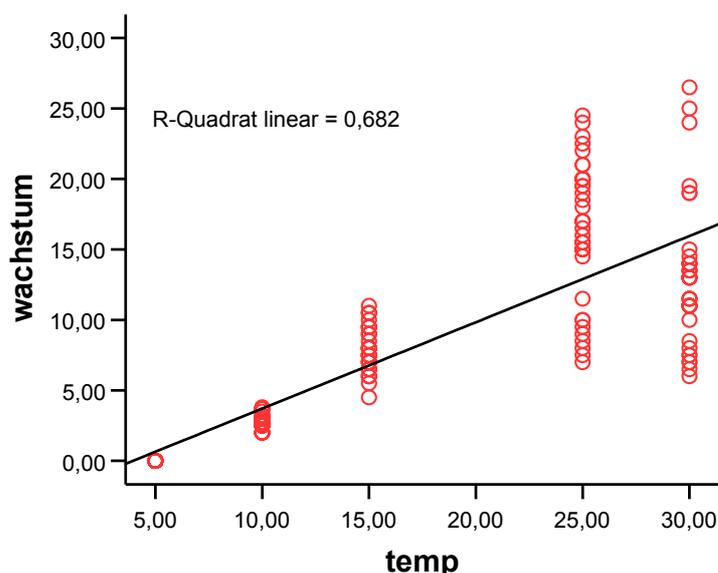
**Tabelle 17:** Einfluss der Temperatur auf das Wachstum (mm/24h) von *Trichoderma* spp.

	MEA pH-Wert 5 (a)					LNA pH-Wert 5 (a)					p≤0,05	p≤0,001
	5°C	10°C	15°C	25°C	30°C	5°C	10°C	15°C	25°C	30°C		
T-15603.1	0 [-]	2,7 [±0,15]	9,8 [±0,44]	17,5 [±0,50]	14,5 [±0,29]	0 [-]	2,4 [±0,21]	6,7 [±0,17]	7,8 [±0,44]	13,2 [±0,17]	c	c
T-351.93	0 [-]	2,3 [±0,33]	7,5 [±0,29]	19,8 [±0,17]	13,8 [±0,17]	0 [-]	2,5 [±0,29]	6,0 [±1,04]	9,5 [±0,29]	11,2 [±0,17]	c	cd
T-396.92	0 [-]	3,7 [±0,08]	10,3 [±0,44]	19 [±0,58]	9,7 [±0,89]	0 [-]	3,4 [±0,17]	7,8 [±0,17]	9,7 [±1,17]	10,3 [±0,93]	c	c
T-206040	0 [-]	3,1 [±0,07]	9,7 [±0,44]	21,8 [±0,44]	13,2 [±0,17]	0 [-]	2,6 [±0,07]	6,2 [±0,17]	16,5 [±0,29]	11,2 [±0,17]	b	b
T-126.65	0 [-]	2,6 [±0,07]	6,7 [±0,44]	20,2 [±0,44]	19,2 [±0,17]	0 [-]	2,4 [±0,21]	7,2 [±0,17]	23,8 [±0,44]	25,2 [±0,73]	a	a
T-338.93	0 [-]	3,0 [±0,15]	9,3 [±0,17]	14,8 [±0,17]	6,8 [±0,44]	0 [-]	2,7 [±0,15]	8,0 [±0,29]	8,7 [±0,17]	7,0 [±0,29]	d	d

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Weltsch-Test (REGWQ).

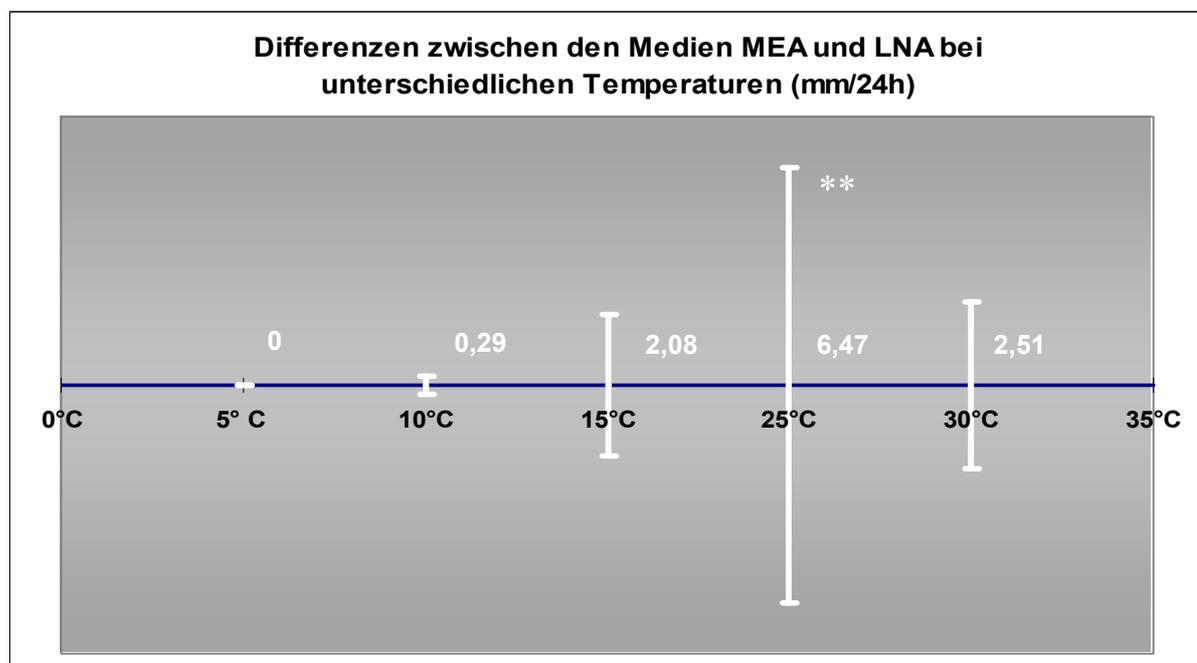
Bei einer Temperatur von 5°C konnte sowohl auf MEA als auch auf LNA kein Wachstum von *Trichoderma* spp. nach 24h beobachtet werden. Erstes Wachstum wurde auf den Medien MEA und LNA bei einer Temperatur von 10°C beobachtet (Ø Wachstumsrate 2,9 bzw. 2,7mm/24h). Bei steigenden Temperaturen wurde auch ein verstärktes Wachstum von *Trichoderma* spp. auf MEA und LNA verzeichnet. Einzige Ausnahme waren Kulturen auf dem Medium MEA. Dort zeigten die *Trichoderma*-Arten ihr Wachstumsoptimum bei 25°C (Ø Wachstumsrate 18,9mm/24h). Eine Erhöhung der Temperatur auf 30°C hatte auf MEA ein Sinken der Wachstumsrate auf Ø 12,9mm/24h zur Folge. Hingegen wurde die höchste Wachstumsrate (Ø 13mm/24h) auf LNA bei einer Temperatur von 30°C erzielt. Die Beziehung zwischen Temperatur und Wachstumsrate

konnte statistisch ermittelt werden. So ergab die Korrelationsanalyse nach Bravais-Pearson (p≤0,05) einen Korrelationskoeffizienten r von 0,862 und damit eine positive Korrelation. In Abbildung 27 ist diese Beziehung mit Hilfe der Regressionsgeraden nochmals grafisch dargestellt.



**Abb. 27:** Korrelation zwischen Temperatur und Wachstum.

Die ANOVA Varianzanalysen mit anschließenden Post-Hoc-Tests ließen (hoch-)signifikante Unterschiede zwischen *Trichoderma* spp. in Bezug auf das Wachstum erkennen (Tabelle 15). *Trichoderma virens* besaß im Mittel die signifikant größte Wachstumsrate (Ø 10,7mm/24h), gefolgt von *T. harzianum/polysporum* (BINAB) mit einem durchschnittlichen Wachstum von 8,4mm/24h ( $p \leq 0,001$ ). Das geringste Ergebnis erzielte mit einem durchschnittlichen Wachstum von 6,7mm *T. fasciculatum (strictipile)*. Zwischen den Stämmen der Art *T. atroviride* konnten auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  keine Unterschiede verzeichnet werden. In Abbildung 28 wird deutlich, dass bei unterschiedlichen Temperaturen kein signifikanter Einfluss des nährstoffreichen MEA im Vergleich zu LNA auf das durchschnittliche Wachstum von *Trichoderma* spp. festgestellt werden konnte. Einzige Ausnahme bildet hier die Differenz zwischen den Medien bei einer Temperatur von 25°C.



**Abb. 28:** Differenzen der Medien MEA und LNA bei unterschiedlichen Temperaturen. Signifikanzen sind mit \* gekennzeichnet. \* = signifikant ( $p \leq 0,05$ ); \*\* = hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ).

Neben Studien zur Determinierung des Einflusses der Temperatur auf das Wachstumsverhalten von *Trichoderma* spp. wurden zusätzlich Untersuchungen zum Effekt verschiedener Wasseraktivitäten ( $a_w$  0,998, 0,995 & 0,892) in Kombination mit unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse und statistischen Auswertungen zusammengefasst dargestellt. Aus dieser Tabelle geht deutlich der Einfluss der Wasseraktivitäten ( $a_w$ ) auf das Wachstum von *Trichoderma* spp. sowie die signifikant differente Wirkung der  $a_w$ -Werte hervor ( $p \leq 0,05$  &  $p \leq 0,001$ ).

**Tabelle 18:** Einfluss der Wasseraktivität ( $a_w$ ) und der Temperatur auf das Wachstum (mm/24h) von *Trichoderma* spp.

	MEA pH-Wert 5 (a*)												LNA pH-Wert 5 (a*)											
	$a_w$ 0,998 (a**)				$a_w$ 0,995 (b**)				$a_w$ 0,892 (c**)				$a_w$ 0,998 (a**)				$a_w$ 0,995 (b**)				$a_w$ 0,892 (c**)			
	10°C	15°C	25°C	30°C	10°C	15°C	25°C	30°C	10°C	15°C	25°C	30°C	10°C	15°C	25°C	30°C	10°C	15°C	25°C	30°C	10°C	15°C	25°C	30°C
<b>T1</b>	2,7 [±0,15]	9,8 [±0,44]	17,5 [±0,50]	14,5 [±0,29]	0 [-]	0 [-]	7 [±0,21]	6,7 [±1,04]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	2,4 [±0,21]	6,7 [±0,17]	7,8 [±0,44]	13,2 [±0,17]	0 [-]	0 [-]	8 [±0,17]	7,7 [±0,93]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]
<b>T2</b>	2,3 [±0,33]	7,5 [±0,29]	19,8 [±0,17]	13,8 [±0,17]	0 [-]	0 [-]	6,7 [±0,58]	6,2 [±0,29]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	2,5 [±0,29]	6,0 [±1,04]	9,5 [±0,29]	11,2 [±0,17]	0 [-]	0 [-]	7,7 [±0,58]	7 [±0,29]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]
<b>T3</b>	3,7 [±0,08]	10,3 [±0,44]	19 [±0,58]	9,7 [±0,89]	0 [-]	0 [-]	7 [±0,17]	5,7 [±0,44]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	3,4 [±0,17]	7,8 [±0,17]	9,7 [±1,17]	10,3 [±0,93]	0 [-]	0 [-]	6 [±0,33]	5,7 [±0,44]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]
<b>T4</b>	3,1 [±0,07]	9,7 [±0,44]	21,8 [±0,44]	13,2 [±0,17]	0 [-]	0 [-]	7,2 [±1,04]	5,3 [±0,21]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	2,6 [±0,07]	6,2 [±0,17]	16,5 [±0,29]	11,2 [±0,17]	0 [-]	0 [-]	7,3 [±0,21]	6,7 [±0,73]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]
<b>T5</b>	2,6 [±0,07]	6,7 [±0,44]	20,2 [±0,44]	19,2 [±0,17]	0 [-]	0 [-]	5 [±0,29]	4,3 [±0,58]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	2,4 [±0,21]	7,2 [±0,17]	23,8 [±0,44]	25,2 [±0,73]	0 [-]	0 [-]	9,3 [±0,17]	8,3 [±1,17]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]
<b>T6</b>	3,0 [±0,15]	9,3 [±0,17]	14,8 [±0,17]	6,8 [±0,44]	0 [-]	0 [-]	5,7 [±0,44]	5,3 [±1,04]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	2,7 [±1,04]	8,0 [±0,29]	8,7 [±0,17]	7,0 [±0,29]	0 [-]	0 [-]	6,7 [±0,21]	6 [±0,17]	0 [-]	0 [-]	0 [-]	0 [-]

**Trichoderma spp.:**

T1	<i>Trichoderma atroviride</i> 15603.1 Karsten
T2	<i>Trichoderma atroviride</i> 351.93 Karsten
T3	<i>Trichoderma atroviride</i> 396.92 Karsten
T4	<i>Trichoderma harzianum/polysporum</i> Bissett
T5	<i>Trichoderma virens</i> Miller, Giddens & Foster
T6	<i>Trichoderma fasciculatum (strictipile)</i> Bissett

p≤0,05

c
cd
d
b
a
e

p≤0,001

bc
c
c
b
a
d

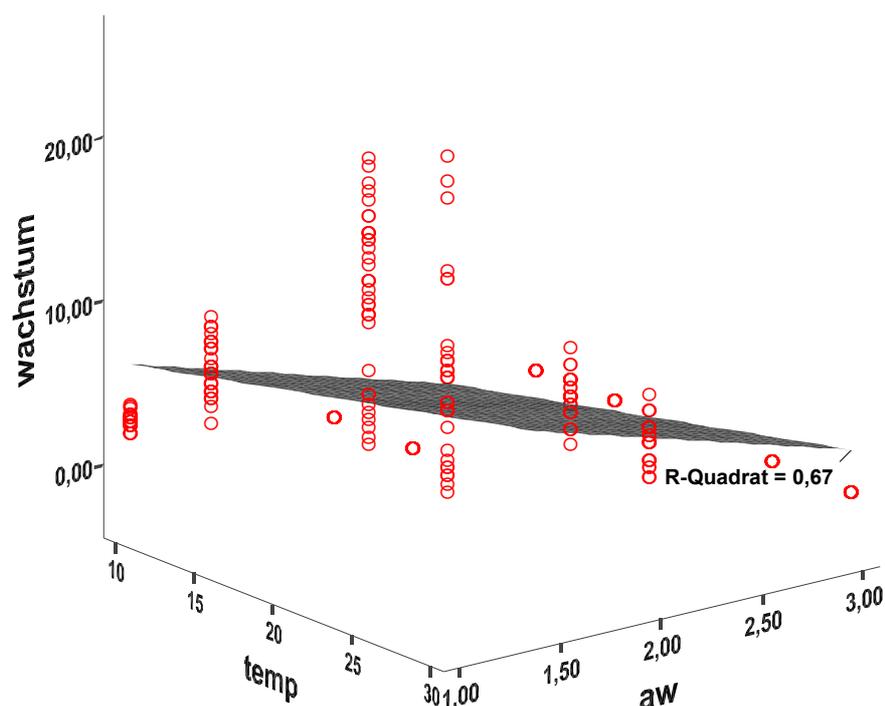
**ANOVA Varianzanalyse (Gruppenvergleich nach Ryan-Einot-Gabrial-Weltsch):**

Gleiche Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant

\* - signifikant (p≤0,05)

\*\* - hochsignifikant (p≤0,001)

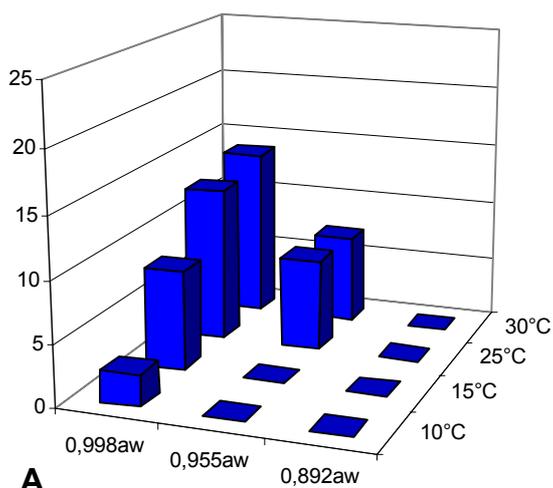
Bei einer Wasseraktivität von 0,892 konnte unabhängig von der Temperatur auch nach einer Woche kein Wachstum von *Trichoderma* spp. verzeichnet werden. Bei einem  $a_w$ -Wert von 0,995 wurde sowohl auf MEA als auch auf LNA bei einer Temperatur von 25°C das erste Wachstum ( $\varnothing$  6,9mm/24h) beobachtet und gleichzeitig das Wachstumsoptimum erreicht. So waren auf beiden Medien bei 30°C und einem  $a_w$ -Wert von 0,995 die Wachstumsraten ( $\varnothing$  6,2mm/24h) etwas geringer als bei 25°C ( $\varnothing$  6,9mm/24h). Interessant war in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass bei diesem  $a_w$ -Wert (0,995) das nährstoffarme Medium LNA im Mittel höhere Wachstumsraten ( $\varnothing$  7,2mm/24h) aufwies als das nährstoffreiche MEA ( $\varnothing$  6,0mm/24h). Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Insgesamt fielen die durchschnittlichen Wachstumsraten bei dem  $a_w$ -Wert von 0,995 deutlich geringer aus als die bei einem  $a_w$ -Wert von 0,998 ermittelten Wachstumsraten. Einen entscheidenden Einfluss der Medien (Nährstoffgehalt) auf das Wachstum konnte nur bei einem  $a_w$ -Wert von 0,998 verzeichnet werden. Insgesamt jedoch wurden im Durchschnitt keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung der Nährmedien ermittelt ( $p \leq 0,05$ ). Die Korrelationsanalyse nach Bravais-Pearson ( $p \leq 0,05$ ) ergab eine positive Korrelation zwischen Temperatur und Wachstum (Korrelationskoeffizienten  $r=0,433$ ) sowie zwischen  $a_w$ -Wert und Wachstum ( $r=0,697$ ). In Abbildung 29 ist die Beziehung mit Hilfe der Regressionsanpassung grafisch dargestellt.



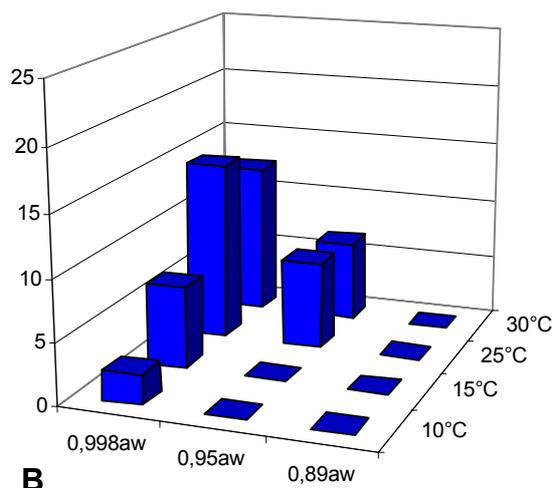
**Abb.29:** Korrelation zwischen Temperatur-Wachstum und  $a_w$ -Wert-Wachstum.

Die *Trichoderma*-Arten unterschieden sich deutlich in ihren durchschnittlichen Wachstumsraten. So ergab die statistische Berechnung (ANOVA Varianzanalyse mit Post-Hoc-Tests) auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001$ , dass *T. virens* die signifikant höchste Wachstumsrate ( $\varnothing$  5,6mm/24h) aufwies, hingegen *T. fasciculatum* mit einem durchschnittlichen Wachstum von 3,5mm/24h die geringste Rate besaß. Auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  konnten auch Divergenzen zwischen den Stämmen von *T. atroviride* verzeichnet werden. *T. atroviride* 396.92 schnitt von den Stämmen mit einer durchschnittlichen Wachstumsrate von 4,1mm/24h am schlechtesten ab. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass zwar Unterschiede in den Wachstumsraten von *Trichoderma* spp. festgestellt werden konnten, aber alle Arten ihr Wachstumsoptimum bei ähnlichen Temperaturen, Nährstoffgehalten und  $a_w$ -Werten hatten und sie somit in ihren ökologischen Anforderungen nur geringfügig divergierten (Abbildung 30A-F).

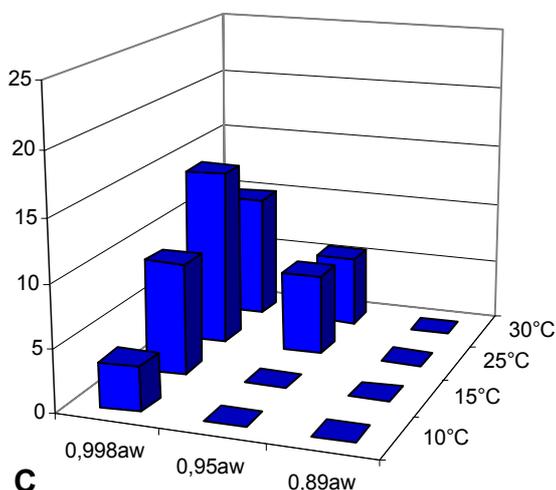
***Trichoderma atroviride* 15603.1**



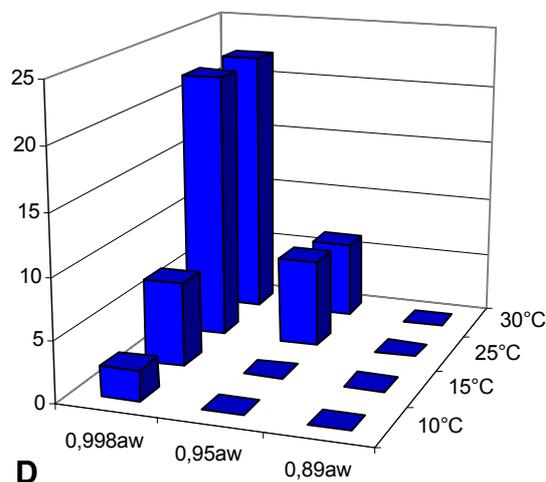
***Trichoderma atroviride* 351.93**



***Trichoderma atroviride* 396.92**

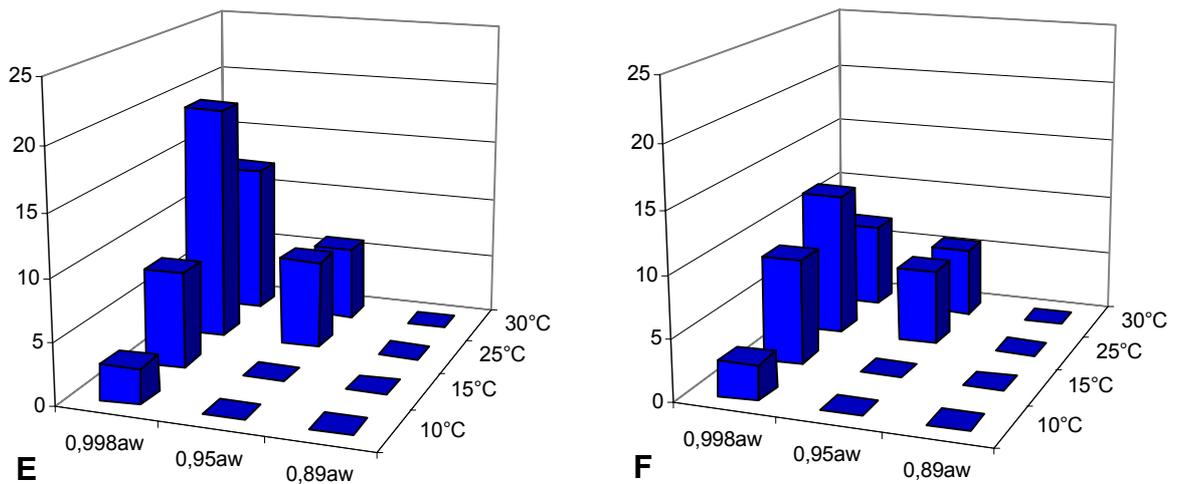


***Trichoderma virens***



***Trichoderma harzianum/polysporum* (BINAB)**

***Trichoderma fasciculatum* (*strictipile*)**



**Abb. 30: A-F:** *Trichoderma* spp. ließ zwar Unterschiede in den Wachstumsraten erkennen, aber in seinem Wachstumsverhalten konnten nur geringfügige Divergenzen in den Ansprüchen an Temperatur, Nährstoffgehalt und Wasseraktivität  $a_w$  festgestellt werden.

**3.1.4.2 Sporenkeimungsraten**

Neben Studien zum Einfluss des Nährstoffgehaltes, der Temperatur sowie der Wasseraktivität  $a_w$  auf das Wachstumsverhalten, wurden auch unter denselben Parametern Untersuchungen zur Sporenkeimung von *Trichoderma* spp. durchgeführt. Die Ergebnisse der Keimungsraten sowie der statistischen Analyse sind in Tabelle 19 zusammengefasst aufgeführt. Ähnlich wie bei den Wachstumsstudien besaß die Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Sporenkeimungsrate von *Trichoderma* spp. So konnte bei einer Temperatur von 5° auch nach 48h keine Sporenkeimung verzeichnet werden. Bei 10°C wurden die ersten keimenden Sporen nach 24h, bei 15°C bereits nach 16h beobachtet. Bereits nach 6h konnte bei den Temperaturen von 25°C und 30°C eine Sporenkeimung festgestellt werden. Das Optimum für die Sporenkeimung lag bei einer Temperatur von 25°C. Bei dieser Temperatur war die Keimungsrate am höchsten (Ø 73,9%) und nahm bei einer Temperatur von 30°C wieder leicht ab (Ø 72,5%). Die ANOVA Varianzanalyse mit anschließenden Post-Hoc-Tests ließ signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturen erkennen. So waren auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001$  die Einflüsse der Temperaturen auf die Keimungsrate unterschiedlich. Einzige Ausnahme bildeten die Temperaturen 25°C und 30°C. In Abbildung 31 ist die Keimungsrate unter dem Einfluss der Temperaturen im Verlauf grafisch dargestellt.

**Tabelle 19:** Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Sporenkeimungsrate von *Trichoderma* spp. bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

	pH-Wert 5																			
	5 °C (a**)				10°C (b**)				15°C (c**)				25°C (d**)				30°C (d**)			
	6h	16h	24h	48h	6h	16h	24h	48h	6h	16h	24h	48h	6h	16h	24h	48h	6h	16h	24h	48h
<b>T-15603.1</b>	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	28,3% [3,39]	42,5% [11,62]	0% [0]	28,2% [3,05]	60% [6,64]	100% [163,6]	19,6% [1,48]	95% [24,4]	100% [149,9]	100% k. M.	4,7% [1,07]	93,1% [17,6]	100% [114,0]	100% k. M.
<b>T-351.93</b>	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	30,4% [4,14]	67,5% [12,77]	0% [0]	32,5% [4,27]	62,5% [7,20]	100% [142,5]	9% [1,81]	97,5% [30,4]	100% [148,3]	100% k. M.	0% [0]	96,9% [31,99]	97,6% [96,46]	97,5% k. M.
<b>T-396.92</b>	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	13% [2,58]	32,5% [6,03]	0% [0]	27,5% [2,49]	57,5% [6,87]	97,4% [125,5]	21,4% [1,09]	80% [20,3]	97,8% [177,9]	100% k. M.	2,4% [0,85]	90,9% [18,0]	97,2% [73,02]	100% k. M.
<b>T-206040</b>	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	12% [4,26]	31,3% [2,99]	0% [0]	60% [4,78]	92,5% [11,50]	97,5% [125,6]	0% [0]	97,5% [44,5]	100% [142,7]	100% k. M.	4,9% [1,35]	97,4% [24,25]	100% [100,9]	100% k. M.
<b>T-126.65</b>	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	4,8 [3,14]	72,5% [10,43]	0% [0]	12,5% [1,08]	24,3% [3,34]	85% [41,83]	7,7% [1,61]	85% [17,3]	98,5% [252,9]	100% k. M.	2,5% [1,81]	93,1% [52,32]	100% [414,9]	100% k. M.
<b>T-338.93</b>	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	10% [1,95]	0% [0]	8,1% [0,96]	19,4% [2,13]	87,5% [32,55]	0% [0]	70% [14,2]	96,5% [70,2]	100% k. M.	0% [0]	70,4% [13,87]	94,4% [64,54]	97,5% k. M.

**Trichoderma:**

T-15603.1	<i>Trichoderma atroviride</i> Karsten
T-351.93	<i>Trichoderma atroviride</i> Karsten
T-396.92	<i>Trichoderma atroviride</i> Karsten
T-206040	<i>Trichoderma harzianum/polysporum</i> Bissett
T-126.65	<i>Trichoderma virens</i> Miller, Giddens & Foster
T-338.93	<i>Trichoderma fasciculatum (strictipile)</i> Bissett

	<b>p≤0,05</b>	<b>p≤0,001</b>
T-15603.1	<b>a</b>	<b>a</b>
T-351.93	<b>a</b>	<b>a</b>
T-396.92	<b>b</b>	<b>ab</b>
T-206040	<b>a</b>	<b>a</b>
T-126.65	<b>b</b>	<b>b</b>
T-338.93	<b>c</b>	<b>c</b>

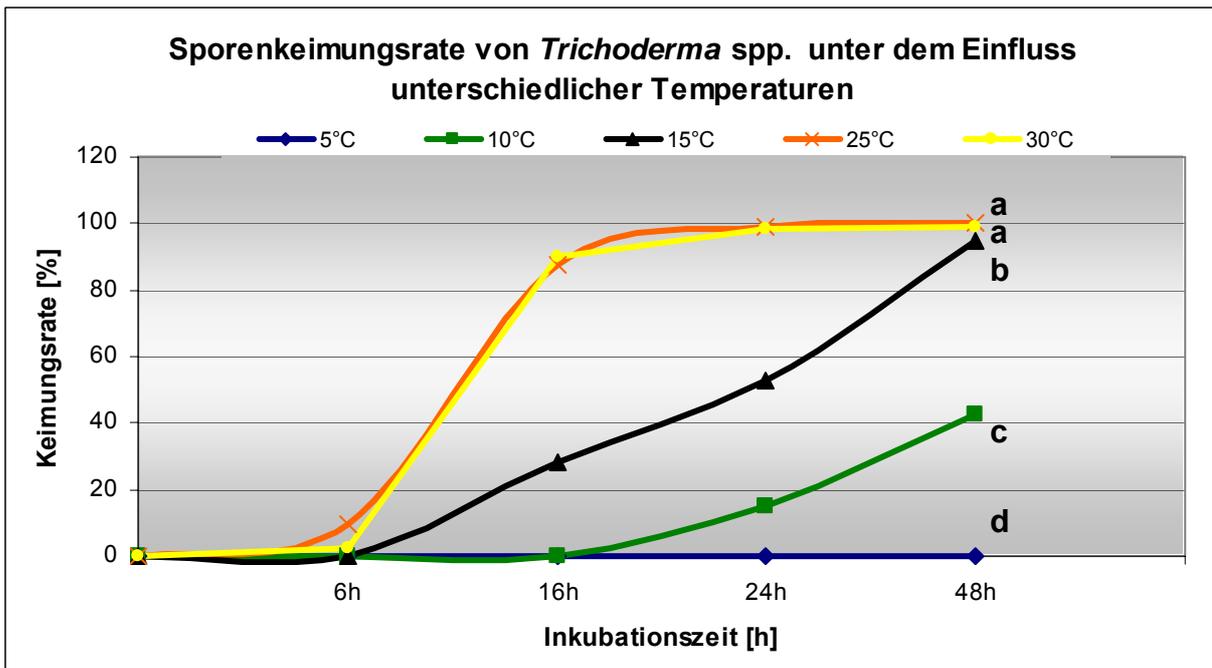
% = Keimungsrate  
 [...] = Ø Hyphenlänge in µm  
 k. M. = Keine Messung der Hyphenlänge

**ANOVA Varianzanalyse (Gruppenvergleich nach Ryan-Einot-Gabrial-Weltsch):**

Gleiche Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant

\* - signifikant (p≤0,05)

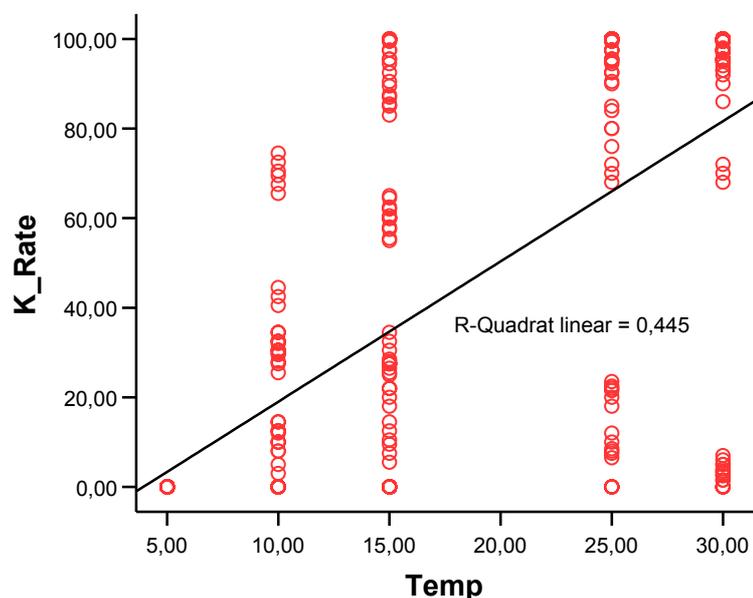
\*\* - hochsignifikant (p≤0,001)



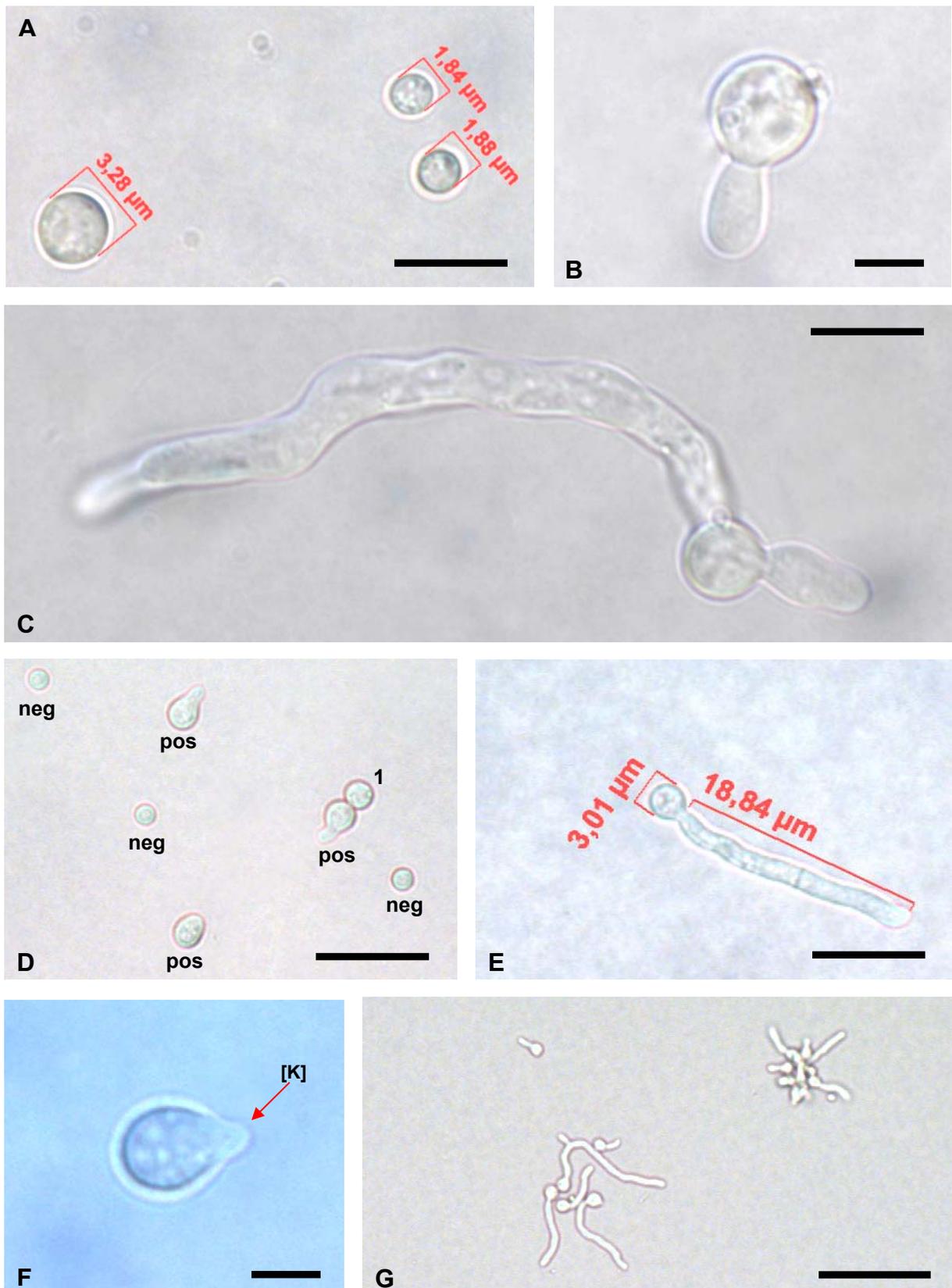
**Abb. 31:** Verlauf der Sporenkeimung von *Trichoderma* spp. bei unterschiedlichen Temperaturen. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Weltsch-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,001$ ).

Neben den signifikanten Unterschieden zwischen den *Trichoderma*-Arten wird aus Tabelle 19 die positive Beziehung zwischen Temperatur und Keimungsrate deutlich. So ergab die Analyse nach Bravais-Pearson einen Korrelationskoeffizienten von  $r=0,667$  und damit eine signifikante Korrelation. In Abbildung 32 ist diese positive Beziehung mit Hilfe der Regressionsgeraden grafisch dargestellt. Die Arten *T. harzianum* (BINAB), *T. atroviride* 15603.1 sowie *T. atroviride* 351.93 ließen im Mittel die höchste Sporenkeimungsrate erkennen ( $p \leq 0,001$ ). Die geringsten Raten wiesen *T. atroviride* 396.92, *T. virens* und *T. fasciculatum* auf ( $p \leq 0,001$ ). Auf einem

Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  wurden ebenfalls Differenzen zwischen den *T. atroviride*-Stämmen ermittelt. So schnitt *T. atroviride* 396.92 am schlechtesten ab. Besonderheiten der Sporenkeimung sind in Abbildung 33 dargestellt.



**Abb. 32:** Korrelation zwischen Temperatur und Keimung.



**Abb. 33:** **A:** Kurz vor der Keimung schwellen die Sporen auf die 1½ fache Größe an (MS = 5μm). **B:** Spore mit Hyphe von *T. atroviride* 15603.1 nach der Keimung (MS = 2μm). **C:** Bei einer Temperatur von 25 °C konnte bereits nach 6h eine Keimung sowie deutliches Hyphenwachstum verzeichnet werden (MS = 5μm). **D:** Bei einer Temperatur von 10°C wurde erst nach 24h eine Keimung beobachtet [1 = Spore angeschwollen – kein Keimschlauch] (MS = 10μm). **E:** Keimung und Hyphenwachstum nach 16h bei 30°C (MS = 10μm). **F:** Spore mit Keimschlauch [K] (MS = 2μm). **G:** Bei einer Temperatur von 25°C lag nach 24h die Sporenkeimung nahezu bei 100% (MS = 20μm).

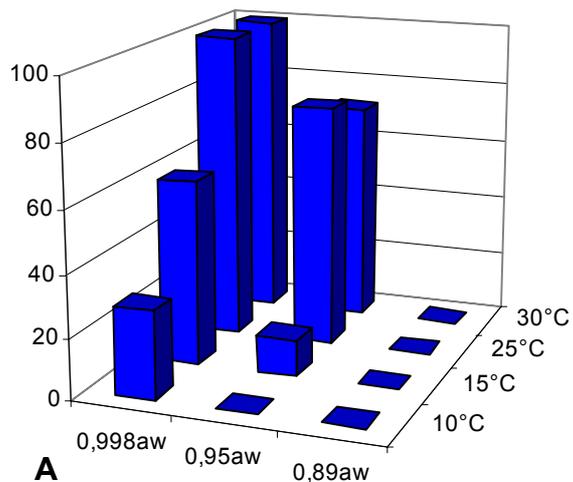
Die Ergebnisse der Keimungsraten in Kombination mit unterschiedlichen Temperaturen und Wasseraktivitäten ( $a_w$ ) sind in Tabelle 20 zusammengefasst aufgelistet. Die Wirkung der Wasseraktivität auf die Sporenkeimung war sehr ausgeprägt (signifikant). So war die Keimungsrate (%/24h) bei einem  $a_w$ -Wert von 0,998 (Ø 66,1%) gegenüber den restlichen  $a_w$ -Werten mit Abstand am höchsten ( $p \leq 0,001$ ). Hier konnte bereits bei einer Temperatur von 10°C ein Keimen verzeichnet werden. Unter dem Einfluss des niedrigsten  $a_w$ -Wertes von 0,892 konnte bei keiner Temperatur eine Keimung der Sporen beobachtet werden. Bei einer Wasseraktivität von 0,995 wurden die ersten vereinzelt Sporenkeimungen bei einer Temperatur von 15°C beobachtet. Insgesamt lag allerdings die Keimungsrate bei einem  $a_w$ -Wert von 0,995 deutlich (signifikant) niedriger (Ø 27,2%) als bei dem höchsten  $a_w$ -Wert 0,998 ( $p \leq 0,001$ ). Zudem wurden (hoch-) signifikante Unterschiede zwischen den *Trichoderma*-Arten ermittelt ( $p \leq 0,001$ ). Während die Arten *T. atroviride* 15603.1 (Ø 37,6%), *T. atroviride* 351.93 (Ø 37,4%) und *T. virens* (32,8%) die höchsten Keimungsraten aufwiesen, ließ *T. fasciculatum* die geringste Rate (Ø 18,5%) erkennen. Auf einem Signifikanzniveau  $p \leq 0,001$  wurden zudem Divergenzen zwischen den Stämmen von *T. atroviride* deutlich. So besaß *T. atroviride* 396.92 gegenüber den restlichen Stämmen die geringste Sporenkeimungsrate (Ø 31,8). Insgesamt ließen die *Trichoderma*-Arten deutliche Unterschiede in der Keimung erkennen, hatten aber ihre Optima bei ähnlichen Parametern (Abbildung 34).

**Tabelle 20:** Einfluss der Temperatur und Wasseraktivität ( $a_w$ ) auf die Keimungsrate (%/24h)

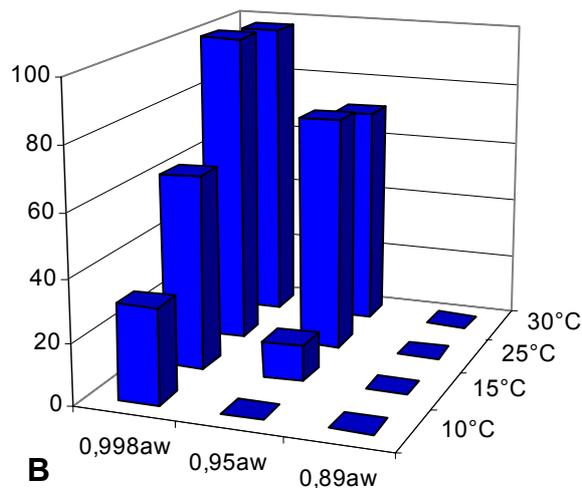
	pH-Wert 5											
	$a_w$ 0,998 (a <sup>**</sup> )				$a_w$ 0,995 (b <sup>**</sup> )				$a_w$ 0,892 (c <sup>**</sup> )			
	10°C	15°C	25°C	30°C	10°C	15°C	25°C	30°C	10°C	15°C	25°C	30°C
<b>T-15603.1</b> a <sup>**</sup>	28,3% [3,39]	60% [6,64]	100% [149,9]	100% [114,0]	0% [0]	12% [5,84]	79% [113,4]	72,2% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]
<b>T-351.93</b> a <sup>**</sup>	30,4% [4,14]	62,5% [7,20]	100% [148,3]	97,6% [96,5]	0% [0]	11,5% [5,30]	76% [121,7]	71,3% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]
<b>T-396.92</b> b <sup>**</sup>	13% [2,58]	57,5% [6,87]	97,8% [177,9]	97,2% [73,0]	0% [0]	8% [4,56]	56% [109,4]	52% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]
<b>T-206040</b> c <sup>**</sup>	12% [4,26]	92,5% [11,50]	100% [142,7]	100% [100,9]	0% [0]	5% [4,65]	18% [106,4]	14% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]
<b>T-126.65</b> b <sup>**</sup>	4,8 [3,14]	24,3% [3,34]	98,5% [252,9]	100% [414,9]	0% [0]	7,5% [6,12]	82% [134,6]	77% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]
<b>T-338.93</b> d <sup>**</sup>	0% [0]	19,4% [2,13]	96,5% [70,2]	94,4% [64,5]	0% [0]	2% [3,21]	5,5% [90,3]	4,2% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]	0% [0]

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Weltsch-Test (REGWQ). \* = signifikant  $p \leq 0,05$ ; \*\* = hochsignifikant  $p \leq 0,001$ .

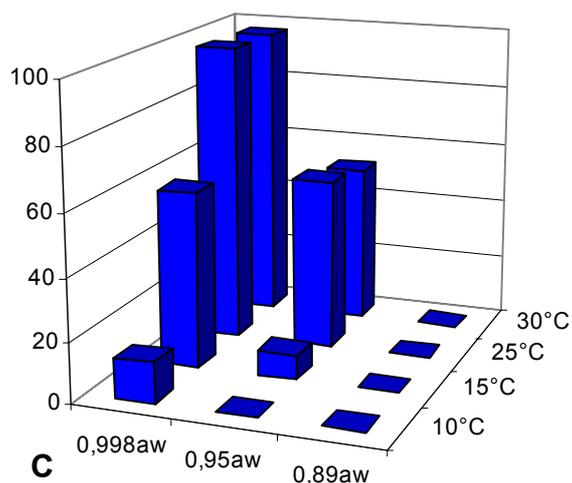
**Trichoderma atroviride 15603.1**



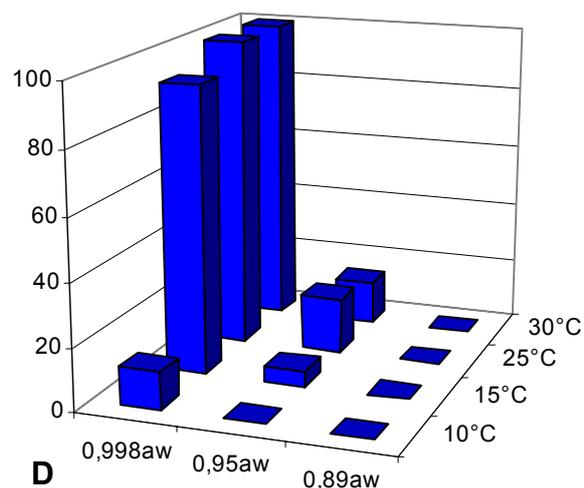
**Trichoderma atroviride 351.93**



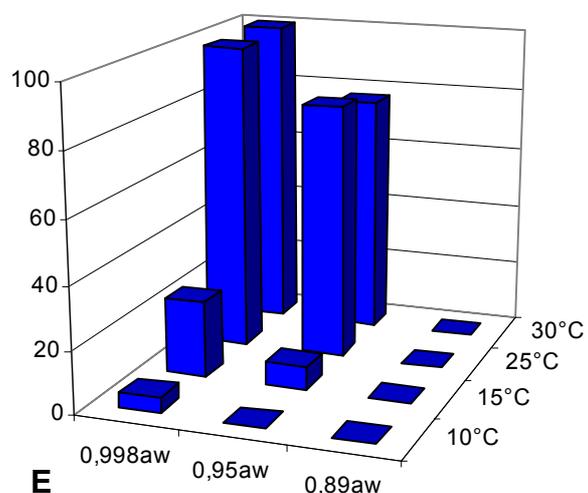
**Trichoderma atroviride 396.92**



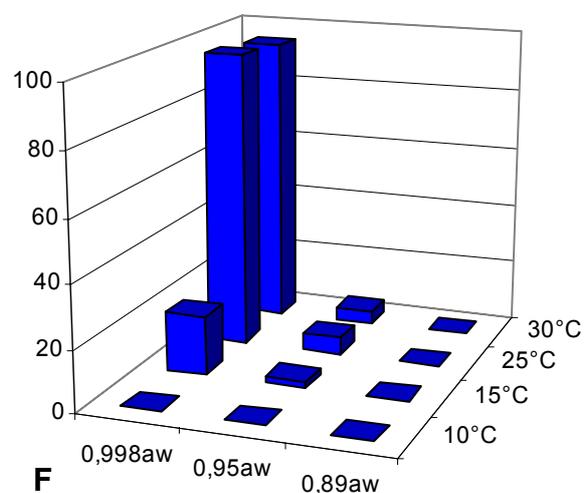
**Trichoderma harzianum/polysporum (BINAB)**



**Trichoderma virens**



**Trichoderma fasciculatum (strictipile)**



**Abb. 34:** A-F: *Trichoderma* spp. wies deutliche Unterschiede in den Keimungsraten auf, zeigten aber ihre Keimungsoptima bei ähnlichen Wasseraktivitäten a<sub>w</sub> und Temperaturen.

Die positive Beziehung zwischen steigenden Temperaturen, Wasseraktivitäten und Sporenkeimung wurde statistisch nachgewiesen ( $p \leq 0,05$ ). So ergab die Korrelationsanalyse nach Bravais-Pearson einen Korrelationskoeffizienten für die Temperatur von  $r=0,477$  und für die Wasseraktivität von  $r=0,678$ . In Abbildung 35 ist die Beziehung mittels der Regressionsanpassung grafisch dargestellt.

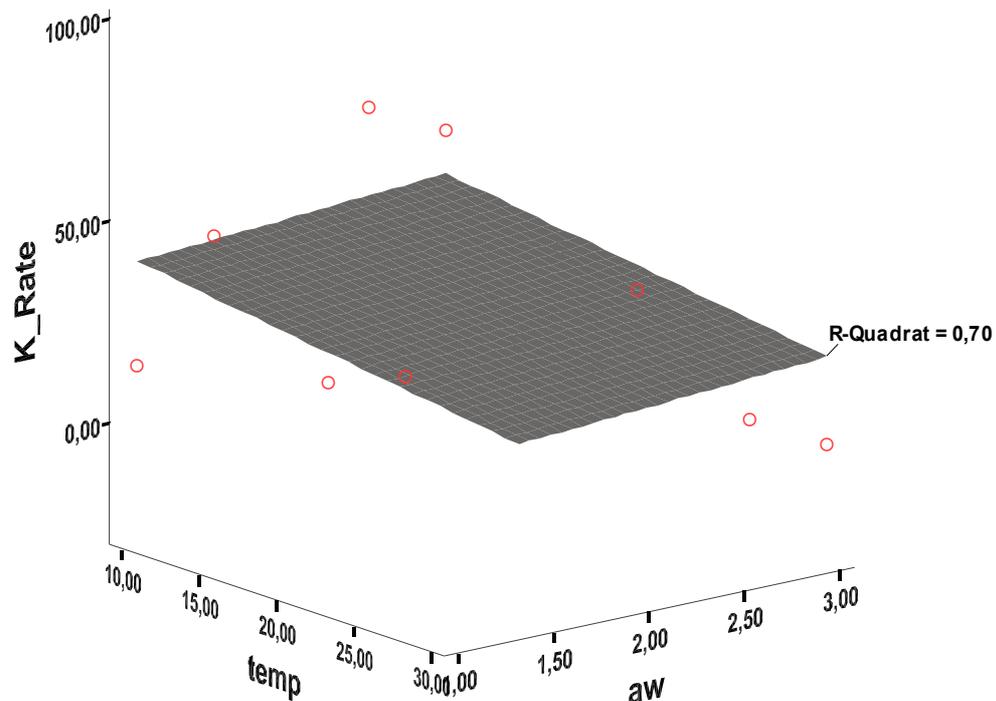


Abb. 35: Korrelation zwischen Temperatur,  $a_w$ -Wert und Keimungsrate.

### 3.1.5 Gesamtauswertung der $I_D$ -Indices

Wie aus Tabelle 21 ersichtlich, divergiert das antagonistische Potenzial von *Trichoderma* spp. nicht nur zwischen den Arten, sondern auch zwischen den 3 *T. atroviride*-Stämmen auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . So verfügten die Arten *T. virens*, *T. atroviride* 15603.1 und *T. atroviride* 351.93 mit einem  $I_D$ -Wert von 3,6 über ein hohes antagonistisches Potenzial. Hingegen *T. fasciculatum (strictipile)* mit einem  $I_D$ -Wert von 2,2 nur ein eingeschränktes Antagonismuspotenzial aufwies. *Trichoderma atroviride* 396.92 ließ mit einem  $I_D$ -Wert von 3,0 einen signifikanten Unterschied zwischen den restlichen zwei *T. atroviride*-Stämmen erkennen ( $p \leq 0,05$ ). Zudem wurde deutlich, dass die Ausscheidung flüchtiger antibiotischer Verbindungen, auf Grund ihrer geringen Hemmwirkung, im Antagonismuskomplex von *Trichoderma* spp. insgesamt eine eher untergeordnete Rolle spielte.

**Tabelle 21:** Matrix für die Vergabe der I<sub>D</sub>-Indices

<b>Index of Dominance I<sub>D</sub></b>							
	<b>T-15603.1</b>	<b>T-351.92</b>	<b>T-396.92</b>	<b>T-206040</b>	<b>T-120.65</b>	<b>T-338.93</b>	<b>I<sub>D</sub>-Indices</b>
<b>Dualkultur-Tests</b>						2	1
							2
							3
	4	4	4	4			4
					5		5
<b>Wirksamkeit volatiler Stoffe</b>			1		1	1	1
	2	2		2			2
							3
							4
							5
<b>Interaktionstests an Holz</b>							1
							2
			3	3		3	3
	4	4			4		4
							5
<b>Wachstums- raten</b>							1
							2
						3	3
	4	4	4	4			4
					5		5
<b>Sporekeimungs- raten</b>							1
							2
			3	3	3	2	3
	4	4					4
							5
<b>Ø<sub>D</sub></b>	<b>3,6 (a)</b>	<b>3,6 (a)</b>	<b>3,0 (b)</b>	<b>3,2 (b)</b>	<b>3,6 (a)</b>	<b>2,2 (c)</b>	

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Weltsch-Test (REGWQ) (p≤0,05).

- T-15603.1 *Trichoderma atroviride* Karsten
- T-351.93 *Trichoderma atroviride* Karsten
- T-396.92 *Trichoderma atroviride* Karsten
- T-206040 *Trichoderma harzianum/polysporum* Bissett
- T-126.65 *Trichoderma virens* Miller, Giddens & Foster
- T-338.93 *Trichoderma fasciculatum (strictipile)* Bissett

- I<sub>D</sub> -Wert 0-1 = kein antagonistisches Potenzial
- I<sub>D</sub> -Wert 1-2 = geringes antagonistisches Potenzial
- I<sub>D</sub> -Wert 2-3 = eingeschränktes antagonistisches Potenzial
- I<sub>D</sub> -Wert 3-4 = hohes antagonistisches Potenzial
- I<sub>D</sub> -Wert 4-5 = sehr hohes antagonistisches Potenzial

### 3.2 AD PLANTA STUDIEN MIT *TRICHODERMA ATROVIRIDE* KARSTEN

#### 3.2.1 VERSUCH A: Schnittflächenbeimpfung an Bäumen

Für das Monitoring von *Trichoderma atroviride* 15603.1 im Feld erfolgten aus den mit unterschiedlichen Verfahren beimpften Schnittflächen (Ø 8cm) mit einem standardisierten Verfahren in regelmäßigen Abständen Abisolierungen. Die Re-Isolationsergebnisse von *Trichoderma* sp. sowie die Ergebnisse der durchgeführten Pilzanalyse werden für die Standorte Ludwigshafen und Straßburg nachfolgend aufgeführt.

##### 3.2.1.1 Re-Isolationsergebnisse

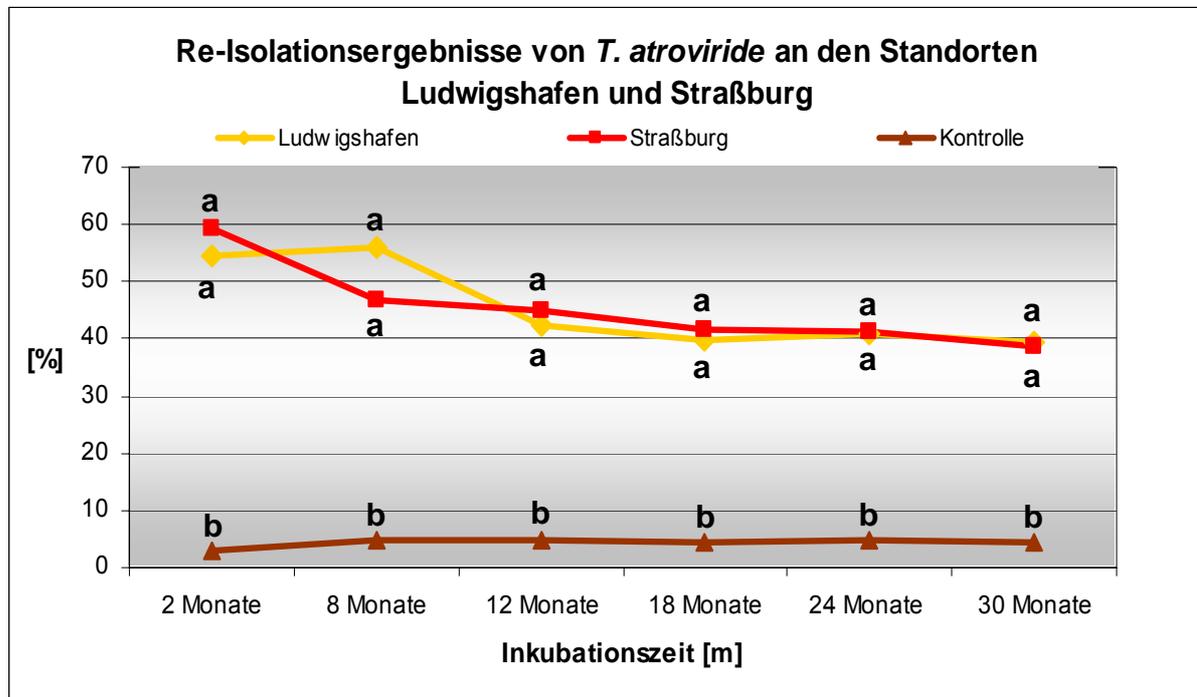
Zusammenfassend sind in Tabelle 22 die Ergebnisse der Re-Isolationenkampagnen gelistet. Insgesamt lag der Re-Isolationserfolg von *Trichoderma atroviride* über einen Zeitraum von 30 Monaten am Standort Ludwigshafen im Schnitt bei 45,52% und am Standort Straßburg bei 45,39%. Auf Grund der ähnlichen Ergebnisse der Standorte konnten keine Divergenzen auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  ermittelt werden (Abbildung 36). Wie aus der Abbildung ebenfalls ersichtlich ist, konnten allerdings im Schnitt (hoch-)signifikante Unterschiede zwischen den beimpften Schnittflächen und den Kontrollwunden verzeichnet werden (Test nach Dunnett  $p \leq 0,001$ ).

**Tabelle 22:** Re-Isolationsergebnisse der Standorte Ludwigshafen und Straßburg in [%]

		Re-Isolationsergebnisse						
		2 Monate	8 Monate	12 Monate	18 Monate	24 Monate	30 Monate	Ø
Ludwigshafen	K	3,3%	4,5%	4,8%	4,7%	5%	4,8%	4,5%
	A	31,5%	52,5%	30%	27%	27,8%	26,4%	32,5%
	B	50%	32,5%	25%	22,5%	23%	21,4%	29,1%
	C	81%	82,5%	72,5%	70%	72%	71%	74,8%
Straßburg	K	2,5%	5%	5%	3,3%	4,3%	3,8%	4,0%
	A	52,5%	35%	27,5%	29%	28%	27,3%	33,2%
	B	65%	60%	52,5%	49%	49,5%	45,9%	53,7%
	C <sup>s</sup>	60%	51%	47,5%	46,7%	45,9%	43,2%	49,1%

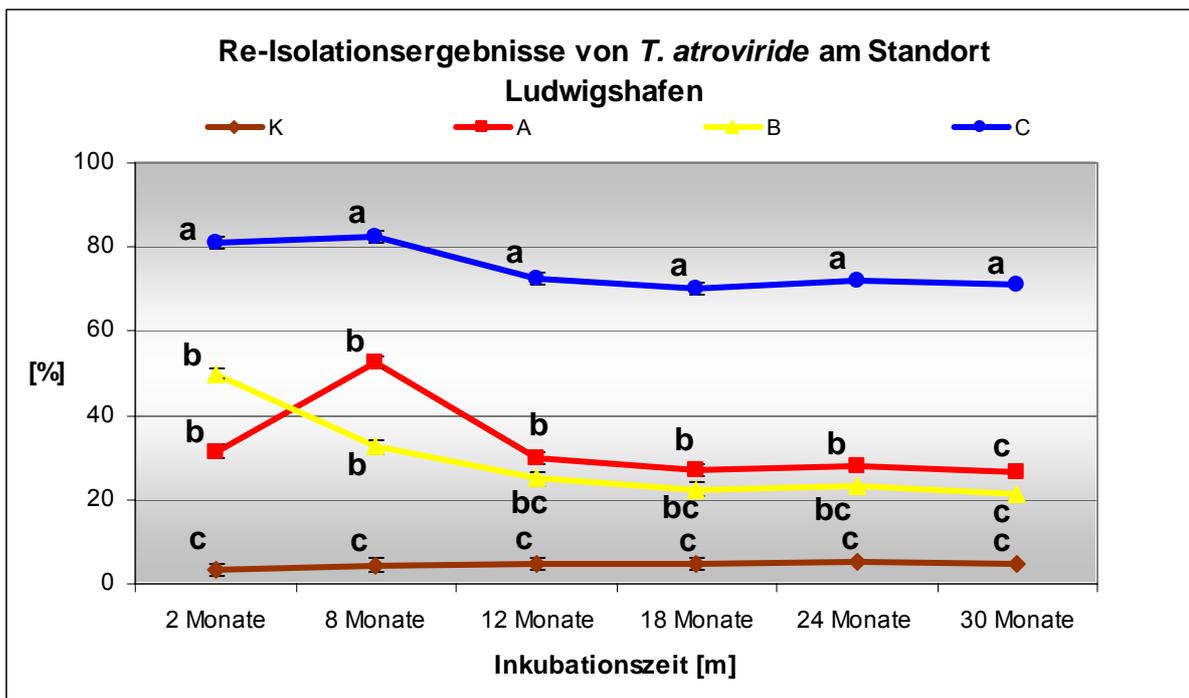
So lag der Isolationserfolg von *Trichoderma* sp. aus den behandelten Schnittflächen an den Standorten Ludwigshafen und Straßburg über den gesamten Zeitraum

signifikant höher als aus den Kontrollwunden ( $p \leq 0,001$ ). Im Mittel lag an den Standorten Ludwigshafen ( $\bar{x}$  4,51%) und Straßburg ( $\bar{x}$  3,98%) die Isolationsrate von *Trichoderma* spp. aus den Kontrollwundflächen bei 4,35%.

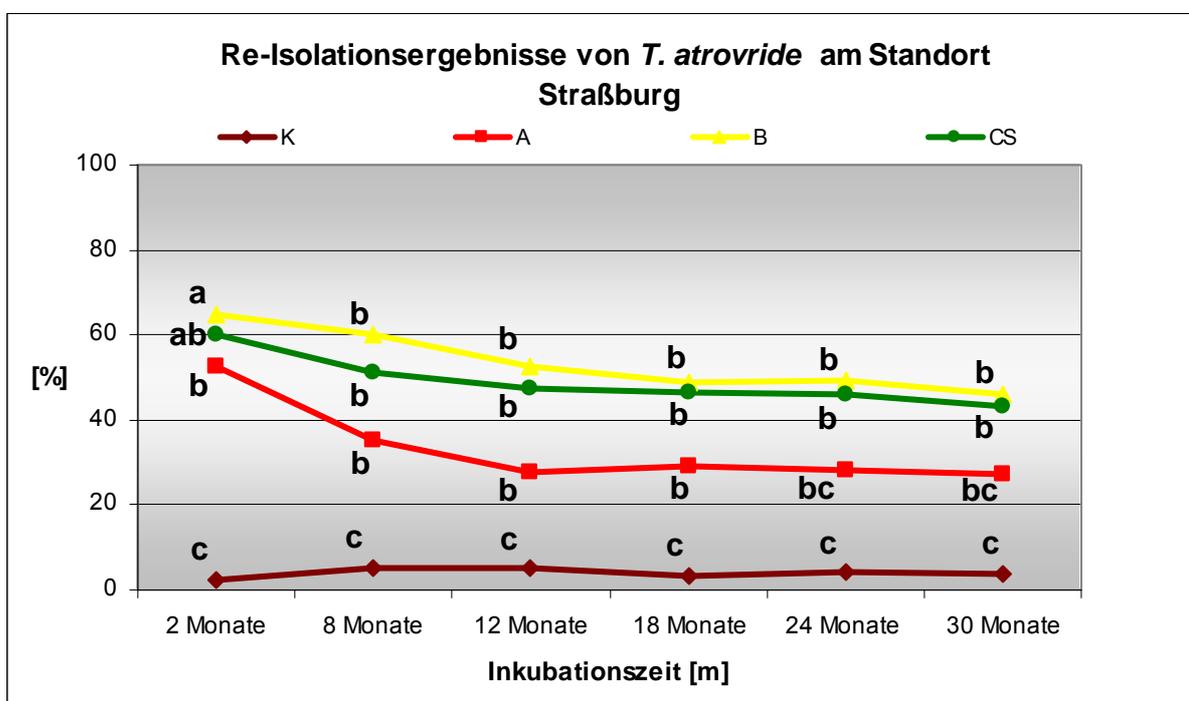


**Abb. 36:** Durchschnittlicher Re-Isolationserfolg von *T. atroviride* an den Standorten Ludwigshafen und Straßburg. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Welsh-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,001$ ).

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die unterschiedlichen Verfahren (A, B, C ( $C^S$ )) in Bezug auf die Isolationsrate von *Trichoderma atroviride* sowohl am Standort Ludwigshafen als auch in Straßburg signifikante Unterschiede aufwiesen ( $p \leq 0,05$ ). Die Ergebnisse im zeitlichen Verlauf sind aus der Tabelle 22 sowie in den Abbildungen 37 und 38 ersichtlich. Mit einer mittleren Re-Isolationsrate von 74,8% schnitt das Verfahren C (Luquasorb 1030 als Trägersubstanz) gegenüber den Verfahren A ( $\bar{x}$  32,5%) und B ( $\bar{x}$  29,1%) (hoch-)signifikant am besten ab ( $p \leq 0,001$ ). Zwischen den Verfahren A und B konnten keine signifikanten Divergenzen ermittelt werden. Während die Isolationsrate des Verfahrens C über den gesamten Zeitraum signifikant höher lag als die Rate aus den Kontrollwunden, konnte bereits nach 12 Monaten auf einem Signifikanzniveau von ( $p \leq 0,05$ ) keine Unterschiede zwischen dem Verfahren B und der Kontrolle festgestellt werden. Nach 30 Monaten wurden zudem keine Unterschiede mehr zwischen den Raten von Verfahren A im Vergleich zur Kontrolle ermittelt.



**Abb. 37:** Re-Isolationsergebnisse von *Trichoderma atroviride* am Standort Ludwigshafen (BASF). Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Welsh-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,05$ ).

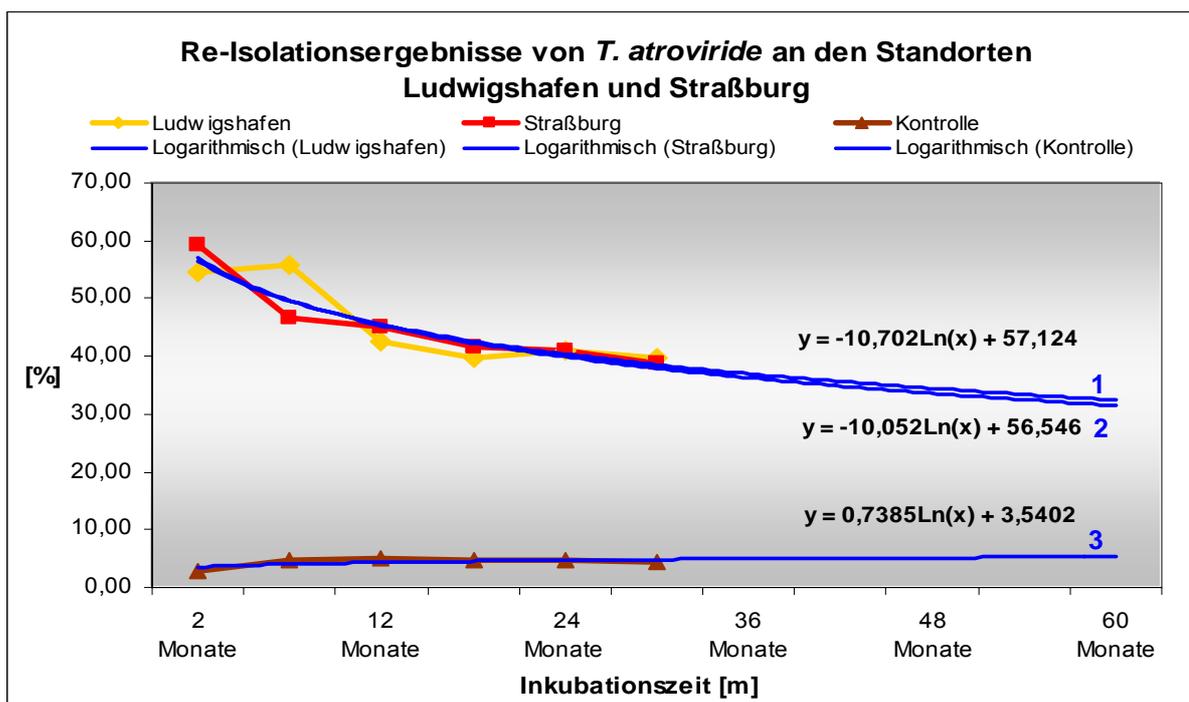


**Abb. 38:** Re-Isolationsergebnisse von *Trichoderma atroviride* am Standort Straßburg. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial-Welsh-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,05$ ).

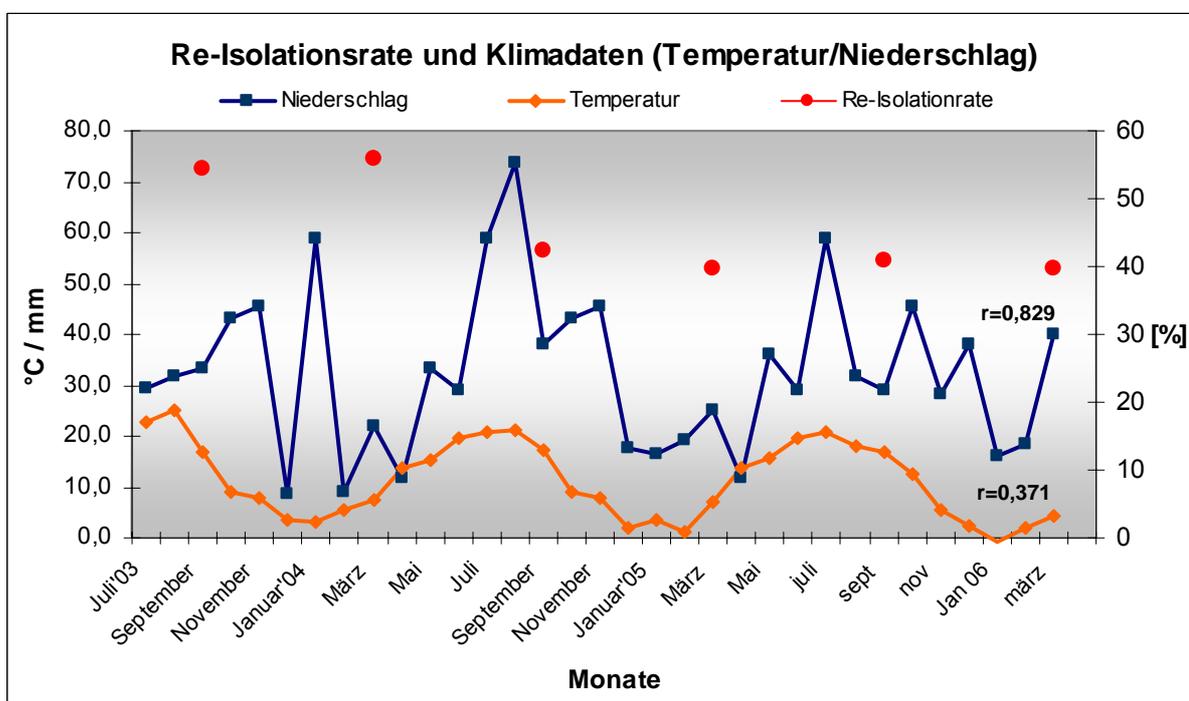
Die Isolationsraten vom Standort Straßburg lassen, anders als am Standort Ludwigshafen, nur marginale Divergenzen zwischen den Verfahren erkennen. Hier muss allerdings erwähnt werden, dass das Verfahren C (feuchtigkeitsspeicherndes Gel als Trägersubstanz) am Standort Straßburg nicht zur Verfügung stand und daher als Alternative das Verfahren C<sup>S</sup> appliziert wurde (Kapitel 2.7.1.1).

Im Schnitt wurden in Straßburg keine Unterschiede auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  zwischen den Verfahren A ( $\bar{\emptyset}$  33,2%), B ( $\bar{\emptyset}$  53,7%) und dem Verfahren C<sup>S</sup> ( $\bar{\emptyset}$  49,1%) verzeichnet. Einzig nach 2 Monaten differierte die Rate des Verfahrens A mit den Raten der Verfahren B und C<sup>S</sup> ( $p \leq 0,05$ ). Bereits nach 8 Monaten konnten aber keine Signifikanzen mehr festgestellt werden. Fast über den gesamten Zeitraum von 30 Monaten lagen die Isolationsraten der Verfahren höher als die der Kontrolle. Nur bei dem Verfahren A konnte zwischen der Isolationsrate nach 24 Monaten und der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede mehr ermittelt werden ( $p \leq 0,05$ ).

Ebenfalls auffällig ist die Tatsache, dass im zeitlichen Verlauf die Re-Isolationsraten von *Trichoderma atroviride* 15603.1 sowohl am Standort Ludwigshafen als auch in Straßburg und über alle Verfahren hinweg abnahmen. So lagen bspw. die mittleren Raten für Ludwigshafen bzw. für Straßburg nach 2 Monaten ( $\bar{\emptyset}$  54,44% bzw. 59,2%) noch deutlich höher als nach 30 Monaten ( $\bar{\emptyset}$  39,6% bzw. 38,8%). Die abnehmenden Re-Isolationsraten im zeitlichen Verlauf werden zudem in Abbildung 39 durch die Trendlinien (1 = Ludwigshafen, 2 = Straßburg) noch einmal verdeutlicht. Wenn man eine logarithmische Funktion zu Grunde legt, so zeigen die Trendlinien 1 und 2 eine negative Steigung, während die Trendlinie 3 (Kontrolle) gleich bleibend (stetig) ist. Dies lässt den Schluss zu, dass im weiteren langfristigen Verlauf (mehrere Jahre) die Isolationsraten von *Trichoderma* sp. der Standorte Ludwigshafen und Straßburg sich der Rate der Kontrolle annähern werden. Dieser abnehmende Trend bedeutet, dass *Trichoderma atroviride* auf dem Substrat Holz über lange Sicht nur über eine eingeschränkte Persistenz verfügt. In Abbildung 40 sind die durchschnittlichen Re-Isolationsergebnisse von Ludwigshafen mit den Klimadaten Temperatur und Niederschlag dargestellt. Eine Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho ergab auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  eine positive Beziehung zwischen Niederschlag und Re-Isolationsrate (Korrelationskoeffizient  $r=0,829$ ). Hingegen konnte statistisch keine Korrelation zwischen Rate und Temperatur nachgewiesen werden ( $r=0,371$ ). So wird die Persistenz von *T. atroviride* maßgeblich von der Feuchtigkeit beeinflusst.



**Abb. 39:** Die Trendlinien (logarithmische Funktion) lassen für die Standorte Ludwigshafen und Straßburg im weiteren Verlauf (mehrere Jahre) eine Abnahme der Isolationsrate von *Trichoderma* sp. und eine Annäherung an die Funktion (Isolationsrate) der Kontrolle erkennen.

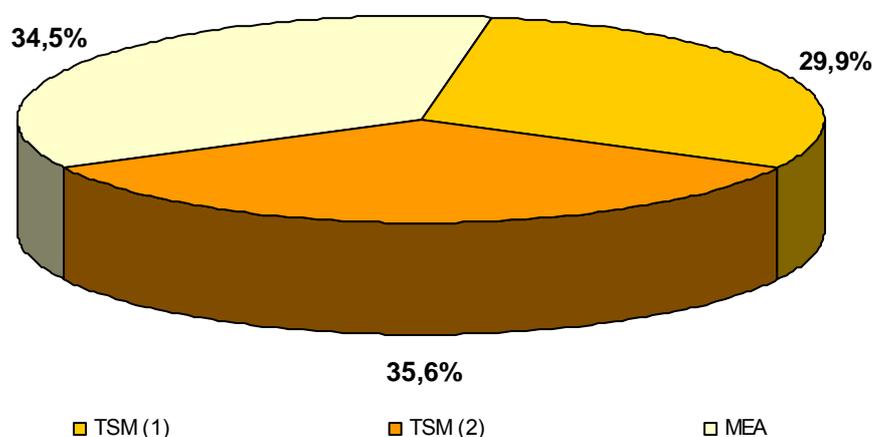


**Abb. 40:** Die Re-Isolationsergebnisse von *T. atroviride* für den Standort Ludwigshafen dargestellt mit den Klimadaten Temperatur und Niederschlag. Die statistische Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  ergab einen signifikanten Einfluss des Niederschlages auf die Persistenz von *Trichoderma* sp. ( $r=0,829$ ). Hingegen konnte kein signifikanter Einfluss der Temperatur ermittelt werden ( $r=0,371$ ).

Im Folgenden werden weitere Faktoren, die die Re-Isolation von *Trichoderma atroviride* beeinflussen konnten, wie verwendete Nährmedien, Baumarten, Himmelsrichtung, Wundgröße und Anteil Kern-Splintholz, determiniert und dargestellt.

Um die Effektivität und damit den Einfluss der Medien TSM (1) und TSM (2) (*Trichoderma Selective Medium*) untereinander und mit dem unselektiven Medium MEA in Bezug auf die Isolation von *Trichoderma* spp. zu bestimmen, wurden die Anteile der jeweiligen Medien an der Gesamtanzahl positiver Re-Isolationen (Straßburg & Ludwigshafen) ermittelt. Wie in Abbildung 41 ersichtlich, ließen alle Medien in etwa die gleichen Anteile (MEA 34,5%; TSM (1) 29,9%, TSM (2) 35,6%) erkennen. Somit konnten keine Differenzen in Bezug auf die Effektivität festgestellt werden. Dies wurde zudem durch die statistische Analyse (CHI-Quadrat-Test [ $\chi^2$ ]) bestätigt, da auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  keine Unterschiede in der Verteilung (Gleichverteilung) ermittelt werden konnten.

**Anteil der unterschiedlichen Medien an der Gesamtanzahl positiver Re-Isolationen von *T. atroviride***

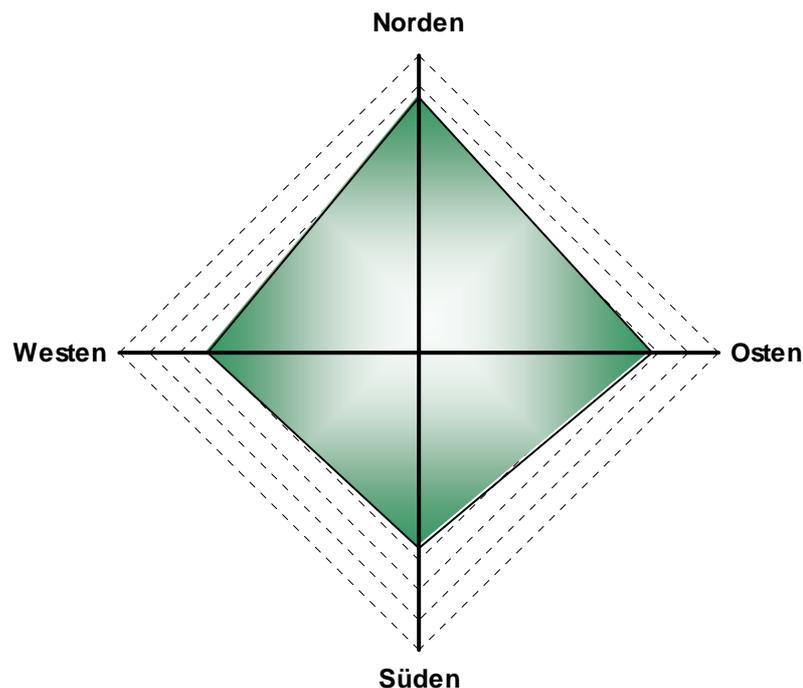


**Abb.41:** Anteil der Medien MEA, TSM (1) und TSM (2) an der Gesamtanzahl positiver *Trichoderma atroviride* Isolationen.

Ein Faktor, der die Etablierung und Persistenz von *Trichoderma atroviride* auf dem Substrat Holz (Schnittflächen) beeinflusst haben könnte, ist die Himmelsrichtung. Für eine Aussage bezüglich des Einflusses wurden, wie in Abbildung 42 grafisch dargestellt, die durchschnittlichen positiven Re-Isolationen der Standorte Ludwigshafen und Straßburg auf die 4 Himmelsrichtungen verteilt. Hierbei lag der

Schwerpunkt der Verteilung mit 27,2% im Norden, gefolgt von 25,6% positiver Isolationen im Osten. Eine etwas geringere Verteilung ergab sich auf die Himmelsrichtungen Westen (24,1%) und Süden (23,1%). Allerdings konnte mittels dem CHI-Quadrat-Test [ $\chi^2$ ] keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung ermittelt werden.

#### Verteilung der positiven Re-Isolationen auf die Himmelsrichtungen



**Abb.42:** Verteilung der positiven Re-Isolationen von *T. atroviride* auf die Himmelsrichtungen.

Inwieweit die Wundgröße und damit verbunden der Anteil von Splint- und Kernholz die Re-Isolationsergebnisse beeinflusst haben, wird aus den Abbildungen 43 und 44 deutlich. Die Verteilung der durchschnittlichen positiven Re-Isolationen der beiden Standorte aus den Verfahren A, B, und C (ohne C<sup>S</sup>) auf die Größenklassen bis 5cm, bis 10cm, bis 15cm und >20cm ergab, dass die Isolationsrate über alle Verfahren hinweg ab der Größenklasse bis 15cm bereits leicht abnahm und bei der Klasse >20cm sich auf dem niedrigsten Niveau befand. Diese Verteilung wurde im zeitlichen Verlauf immer evidenter. Während nach 2 bzw. 8 Monaten Inkubationszeit die Verteilung weitgehend ausgeglichen war, waren die Unterschiede am Ende der Inkubationszeit von 30 Monaten deutlich ausgeprägt. Die Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho ( $p \leq 0,05$ ) ergab einen Koeffizienten von  $r = -0,779$  und damit eine negative Beziehung zwischen Wundgröße und Re-Isolationsrate von *T. atroviride*.

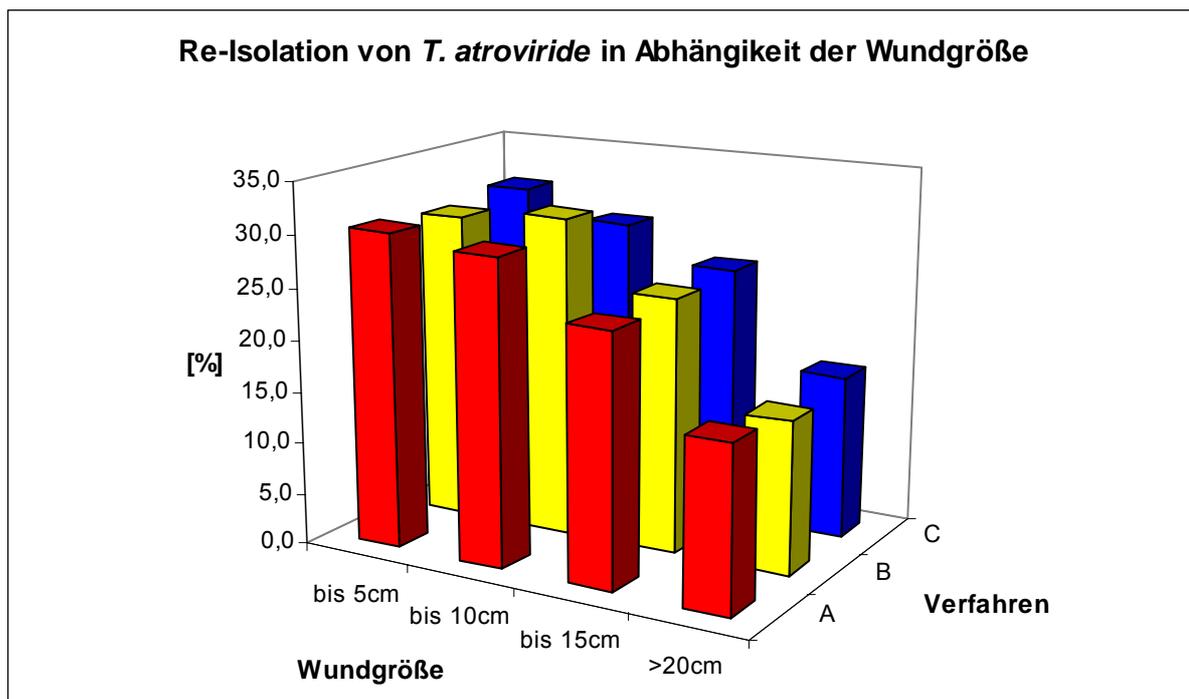


Abb. 43: Verteilung der durchschnittlichen Re-Isolationen von *Trichoderma atroviride* auf 4 eingeteilte Größenklassen (Schnittflächen).

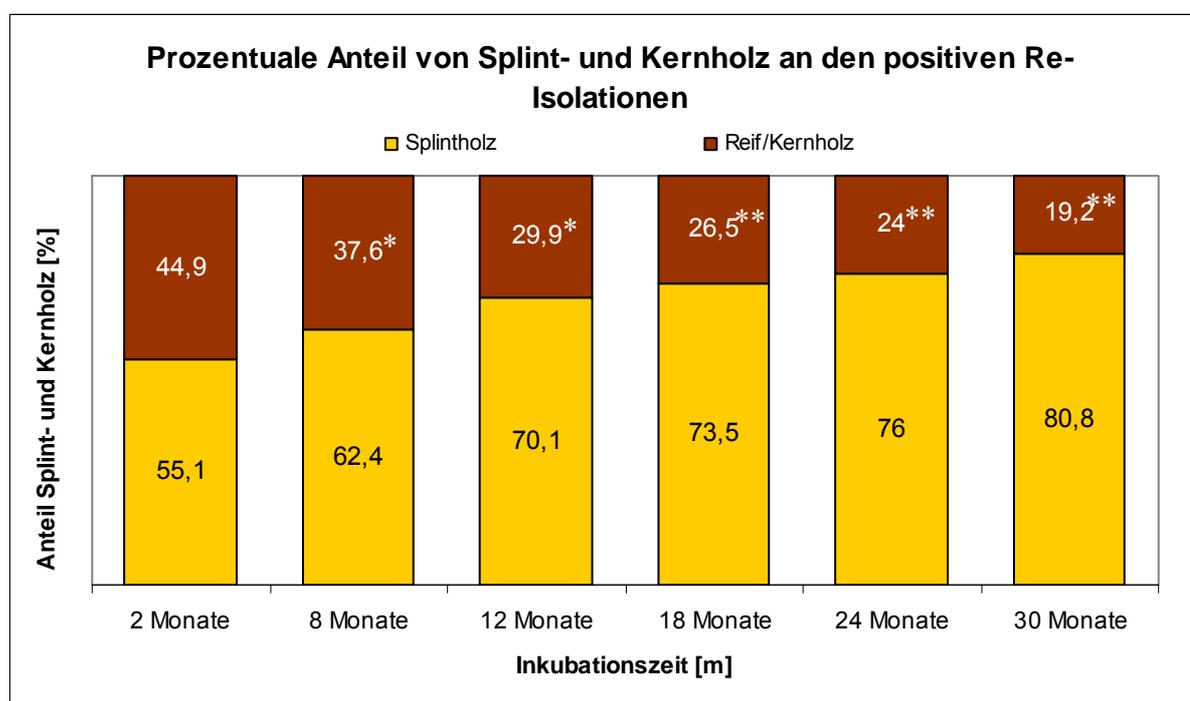


Abb. 44: Anteil des Splint- und Kernholzes an der Re-Isolation von *Trichoderma atroviride*. Signifikante Unterschiede zwischen Splint- und Kernholz sind mit \* gekennzeichnet. \* = signifikant ( $p \leq 0,05$ ); \*\* = hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ).

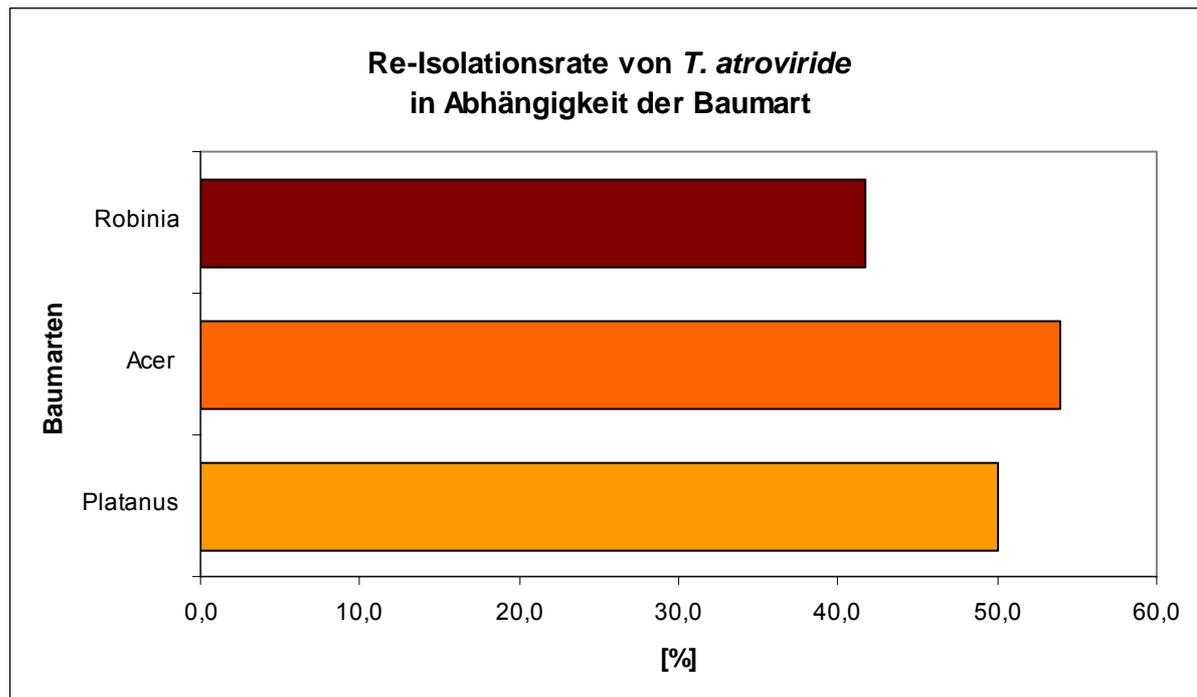
Durch die Zunahme der Wundgröße ist bei Kernholzbäumen auch eine Zunahme des Anteils von Kern- im Verhältnis zum lebenden Splintholz zu verzeichnen. In Abbildung 44 ist im zeitlichen Verlauf der prozentuale Anteil an den positiven Re-

Isolationen von Splint- und Kernholz grafisch dargestellt. Es wird deutlich, dass nach 2 Monaten Inkubationszeit der Anteil zwischen Splint- und Kernholz noch weitgehend ausgeglichen war, während nach 8 Monaten Inkubationszeit der Anteil aus dem Kernholzbereich (37,6%) an den positiven Re-Isolationen bereits deutlich (signifikant) unter dem Anteil aus dem Splintholz (62,4%) lag ( $p \leq 0,05$ ). Dieser Trend wurde im weiteren Verlauf noch ausgeprägter. So verzeichnete nach 30 Monaten das Splintholz einen Anteil von 80,8% an den positiven Re-Isolationen, wogegen der Anteil aus dem Kernholz nur noch bei 19,2% lag. Erwähnt werden muss, dass in diesem Kontext nur graduelle Unterschiede zwischen den Verfahren verzeichnet werden konnten (Tabelle 23). Einzige Ausnahme war das Verfahren C. Hier lag zumindest nach 2 Monaten Inkubationszeit der Anteil an positiven *Trichoderma*-Isolationen aus dem Splintholz- sowie insbesondere aus dem Kernholzbereich deutlich höher als bei den restlichen Verfahren. Bereits nach 8 Monaten waren diese Unterschiede zwischen den Verfahren jedoch weniger ausgeprägt.

**Tabelle 23:** Verteilung des Anteils in [%] der Verfahren auf den Splint- und Kernholzbereich.

	Splintholz			Kernholz		
	A	B	C	A	B	C
<b>2 Monate</b>	16,3	13,9	24,9	10,8	9,2	23,9
<b>8 Monate</b>	19,1	18,5	24,8	12,8	9,5	15,3
<b>12 Monate</b>	23,4	22,8	23,9	10,3	8,6	11
<b>18 Monate</b>	23,6	23,7	26,2	7,4	10,9	8,2
<b>24 Monate</b>	27,5	25,2	23,3	6,3	10,4	7,3
<b>30 Monate</b>	27,6	24,5	28,1	5	6,3	7,9

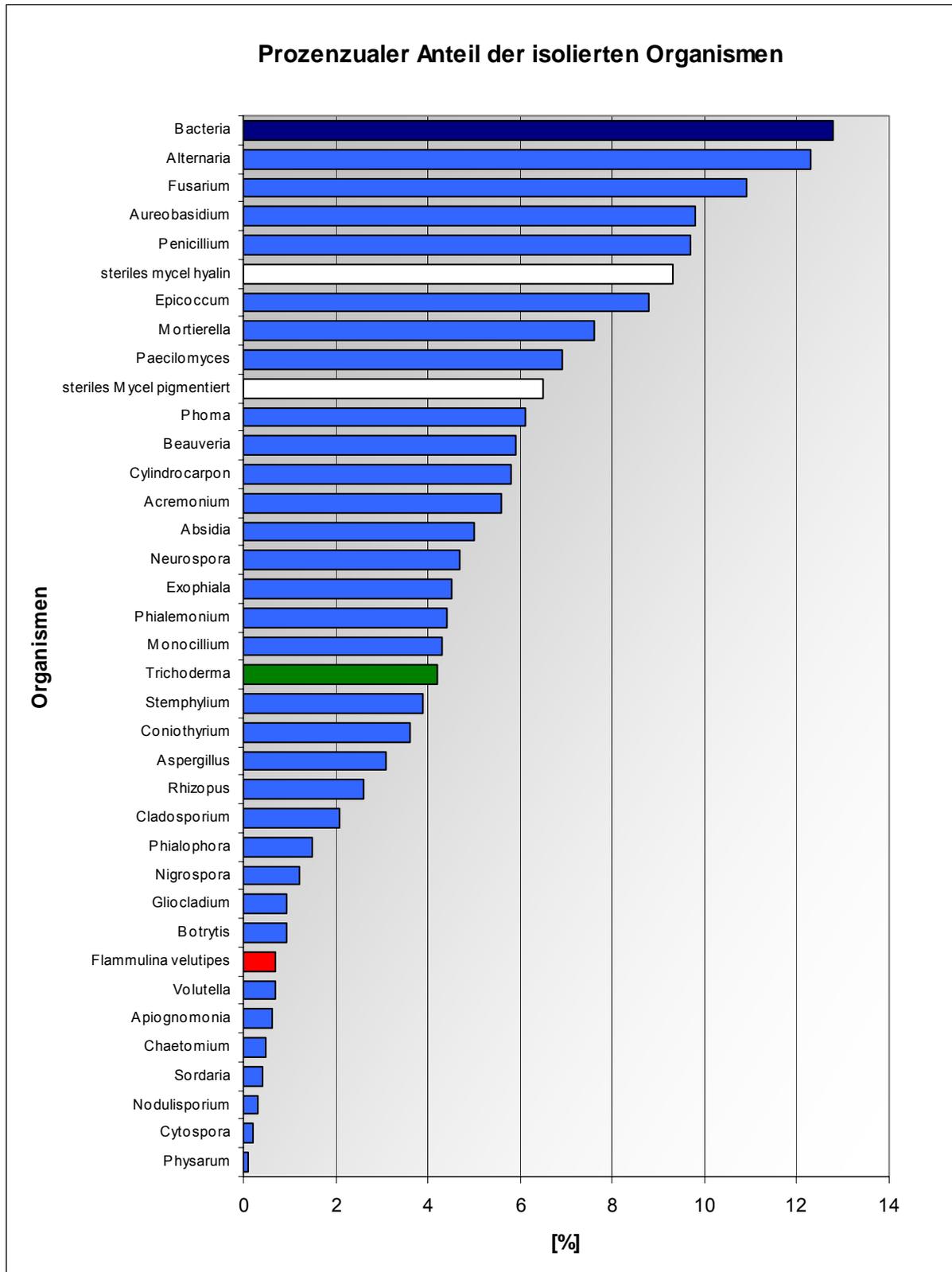
Das Verhältnis Splint- zu Kernholz wird maßgeblich von der jeweiligen Baumart bestimmt. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die mittlere Isolationsrate von *T. atroviride* aller Verfahren (A, B & C (C<sup>S</sup>)) in Abhängigkeit von der Baumart ermittelt. In Abbildung 45 wird ersichtlich, dass die höchste Re-Isolationsrate von *T. atroviride* an der Baumgattung *Acer* spp. (Splintholzbaum) mit 53,7% erzielt wurde, gefolgt von dem Kernholzbaum *Platanus x hispanica* (50,6%). Das schlechteste Ergebnis wurde an *Robinia pseudoacacia*, ebenfalls ein Kernholzbaum, erzielt. Hier betrug die Isolationsrate 43,3%. Die statistische Auswertung (CHI-Quadrat-Test [ $X^2$ ]) ergab auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ , dass die Re-Isolationsraten einer Gleichverteilung entsprechen und somit keine Unterschiede zwischen den Baumarten in Bezug auf die Isolation von *Trichoderma atroviride* existierten.



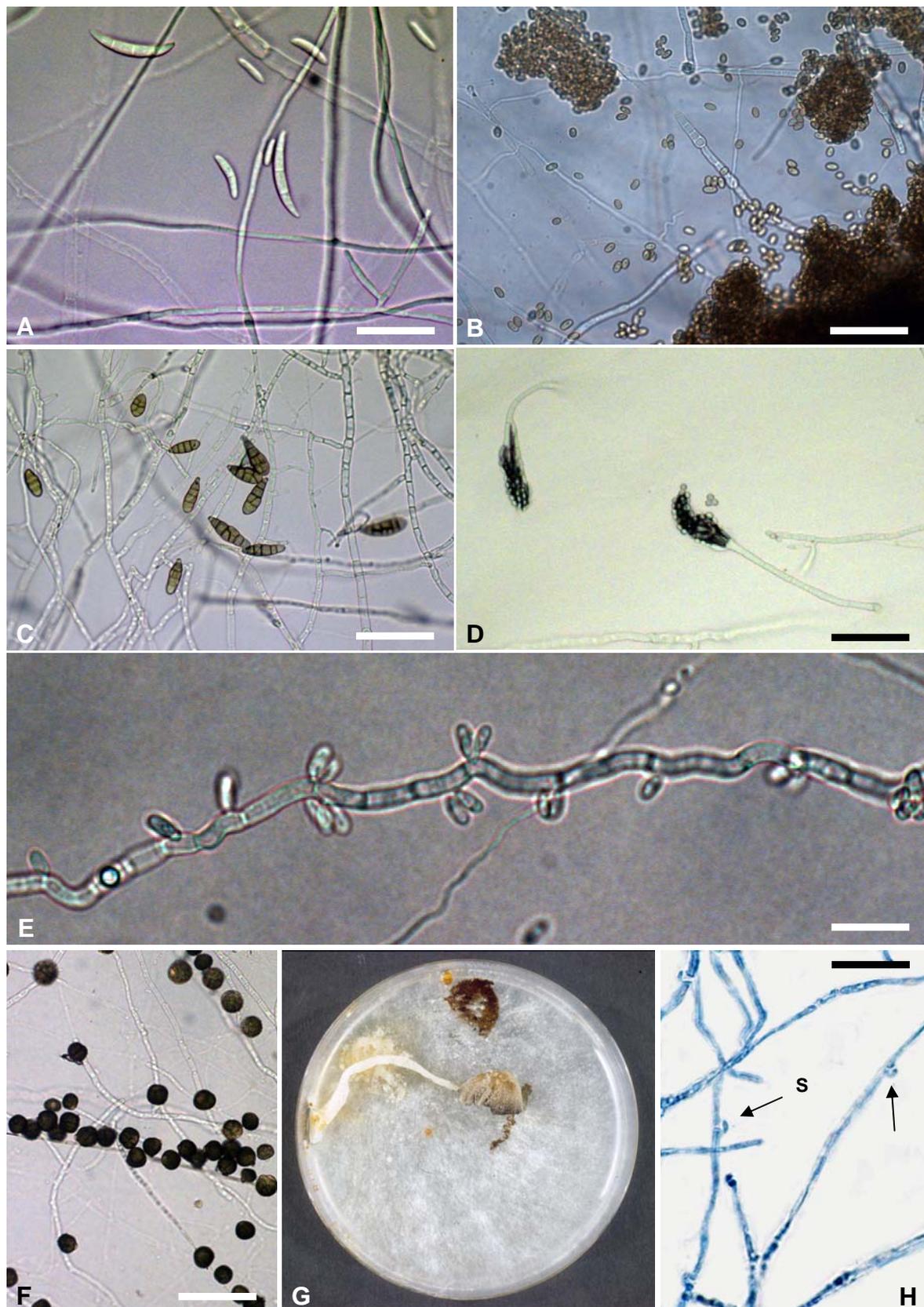
**Abb. 45:** Re-Isolationsrate von *Trichoderma atroviride* in Abhängigkeit der Baumart. Nach dem CHI-Quadrat-Test entsprechen die gewonnenen Werte einer Normalverteilung und sind somit nicht signifikant unterschiedlich ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2.1.2 Pilzanalyse

Neben *Trichoderma* sp. wurden weitere Organismen isoliert und, wie in Kapitel 2.5 näher beschrieben, weitestgehend bestimmt. In Abbildung 46 ist die Gesamtauswertung der isolierten Organismen dargestellt. Insgesamt wurden aus den behandelten und unbehandelten Schnittflächen 37 verschiedene Organismen isoliert. Den prozentual größten Anteil besaßen die Bakterien mit 12,8%, gefolgt von den Pilzgattungen *Alternaria* spp. und *Fusarium* spp. mit 12,3 bzw. 10,9%. Daneben wurde mit einem prozentualen Anteil von 9,3% steriles Myzel hyalin und mit 6,5% steriles Myzel pigmentiert vorgefunden. Für den Prozentwert von 4,3% für die Gattung *Trichoderma* spp. wurden nur die Isolate, welche aus den unbeimpften Wunden (Kontrolle) isoliert wurden gezählt. Zudem konnte aus den Kontrollwunden ein Pilz aus der Klasse der Basidiomyceten isoliert werden. Dieser Holz zersetzende Pilz aus der Familie der Marasmiaceae, *Flammulina velutipes* (Samtfußröbling) besaß einen Anteil von 0,7%. Zusätzlich konnte die Gattung *Physarum* spp., die der Abteilung Myxomycota (Schleimpilze) angehört, mit einem Anteil von 0,1% isoliert werden. Die 34 isolierten Gattungen (ohne Bakterien & Mycelia sterilia) verteilten sich auf folgende taxonomische Klassen: Deuteromycetes (17), Ascomycetes (11), Zygomycetes (3), Basidiomycetes (1) und Myxomycetes (1).



**Abb.46:** Gesamtauswertung der isolierten Organismen. Neben Bakterien bildeten die Gattungen *Alternaria* spp. und *Fusarium* spp. den größten Anteil. Für die Auswertung von *Trichoderma* spp. wurden nur die Isolate gewertet, die aus den unbehandelten Wunden (Kontrolle) isoliert wurden. Aus den Schnittflächen wurde zudem der Holz abbauende Pilz *Flammulina velutipes* isoliert.



**Abb. 47:** **A:** *Fusarium* sp. mit Mikro- und Makrokonidien (MS = 20µm). **B:** Sporen von *Phoma* sp. (MS = 5µm). **C:** Sporen von *Alternaria alternata*. Dieser Pilz wurde neben Bakterien am häufigsten aus den Schnittflächen isoliert (MS = 10µm). **D:** Konidiophore von *Paecilomyces* sp. (MS = 20µm). **E:** *Aureobasidium pullulans* (MS = 5µm). **F:** *Epicoccum* sp. (MS = 10µm). **G:** Fruchtkörper des Basidiomyceten *Flammulina velutipes* **H:** Schnallenmyzel von *F. velutipes* [S] (MS = 10µm).

Die Analyse der Pilzpopulationen mit Hilfe der Diversitätsindices (Kapitel 2.7.3) ergab, dass insgesamt ein Gattungsreichtum (ohne Bakterien & Mycelia sterilia) auf den Schnittflächen von  $R1=8,7$  vorlag. Der Shannon-Weaver-Index ergab einen  $H'$ -Wert von 1,378 und für die Verteilung (Evenness)  $E$  konnte der Wert 0,879 berechnet werden. Durch diese Werte kommt zum Ausdruck, dass auf den untersuchten Schnittflächen eine gewisse Vielfalt an Pilzgattungen vorgefunden wurde. Zudem besagt der  $E$ -Wert mit 0,879, dass die Individuen relativ gleichmäßig auf die Gattungen verteilt waren und somit keine dominante Gattung auf den Schnittflächen ausgemacht werden konnte. In Tabelle 24 sind die Diversitätsparameter für die Standorte Ludwigshafen und Straßburg aufgeführt. Es wird deutlich, dass die Diversität auf den Schnittflächen am Standort Straßburg ( $R1=7,9$ ,  $H'=1,128$ ,  $E=0,743$ ) etwas geringer ausfiel als die Diversität am Standort Ludwigshafen ( $R1=9,1$ ,  $H'=1,424$ ,  $E=0,835$ ).

**Tabelle 24:** Diversitätsindices für die Standorte Ludwigshafen und Straßburg

Diversitätsindices	Ludwigshafen	Straßburg
S	34	28
R1	9,1	7,9
H'	1,424	1,128
E	0,835	0,743

Inwieweit die unterschiedlichen Baumarten und damit verbunden das Verhältnis Splint- zu Kernholz sich auf die Diversität der Pilzpopulationen auswirkten wird in den Tabellen 25 und 26 dargestellt. So konnte an der Baumart *Acer pseudoplatanus* die höchste Diversität verzeichnet werden ( $R1=9,2$ ,  $H'=1,598$ ,  $E=0,823$ ). Die geringste Diversität hingegen wies die Art *Robinia pseudoacacia* mit einem  $R1$ -Wert von 7,5, einem  $H'$ -Wert von 0,776 und einem  $E$ -Wert von 0,698 auf. *Platanus x hispanica* nahm eine Mittelstellung ein ( $R1=8,1$ ,  $H'=1,168$ ,  $E=0,765$ ).

**Tabelle 25:** Vergleich der Diversität an unterschiedlichen Baumarten

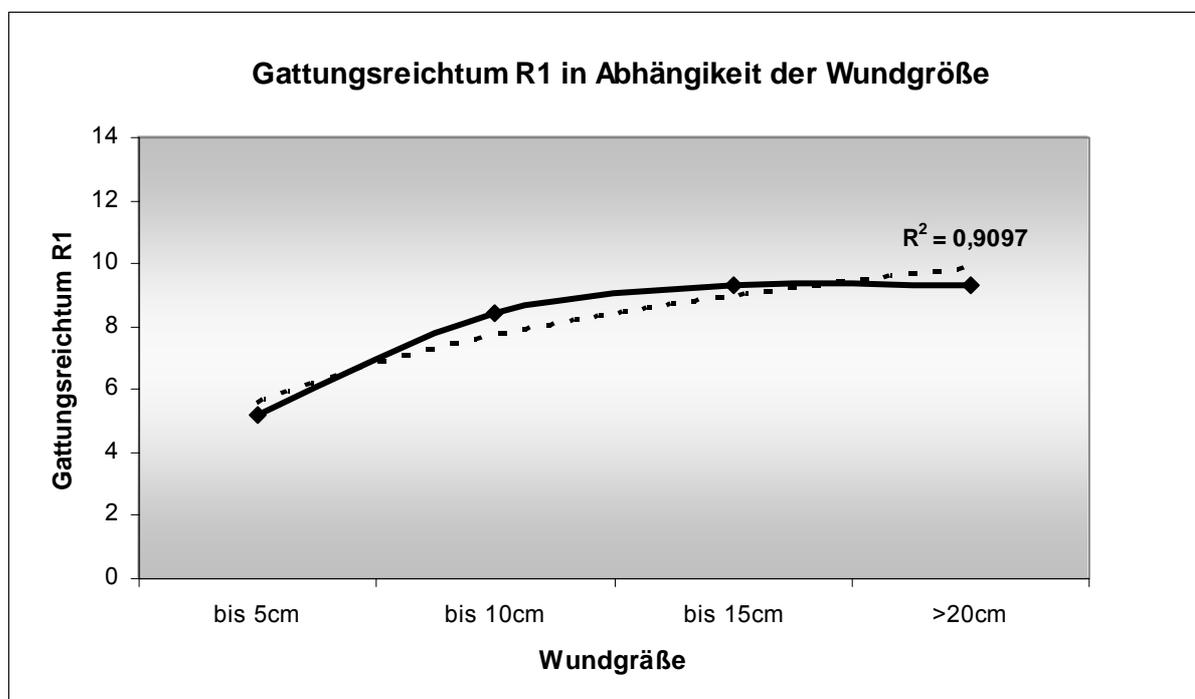
Diversitätsindices	<i>Acer</i>	<i>Platanus</i>	<i>Robinia</i>
S	33	31	25
R1	9,2	8,1	7,5
H'	1,598	1,168	0,776
E	0,823	0,765	0,698

Interessant ist die Tatsache, dass das Splintholz eine wesentlich größere Diversität an Pilzgattungen aufwies als das Kernholz (Tabelle 26). So besaß der Splintbereich einen R1-Wert von 9,5, einen H'-Wert von 1,621 und einen E-Wert von 0,821, hingegen das Kernholz nur R1=5,9, H'=0,723 und E=0,512 erkennen ließ. Insbesondere der geringe E-Wert des Kernholzes deutet darauf hin, dass der größte Anteil der Individuen auf wenige, dominante Gattungen verteilt ist.

**Tabelle 26:** Vergleich der Diversität von Splint- und Kernholz

Diversitätsindices	Splintholz	Kernholz
S	34	17
R1	9,5	5,9
H'	1,621	0,723
E	0,821	0,512

In Abbildung 48 wird die Korrelation zwischen Gattungsreichtum und Schnittflächengröße dargestellt. Man erkennt, dass bei steigender Wundgröße auch der Index R1 (Gattungsreichtum) ansteigt, sich aber ab einer gewissen Wundgröße sehr schnell eine Sättigungskurve einstellt. Dies bedeutet, dass auch bei steigender Schnittflächengröße mit keiner Zunahme des Gattungsreichtums zu rechnen ist.



**Abb. 48:** Die Korrelation Schnittflächengröße und Gattungsreichtum R1 ist mit der Regressionsgeraden dargestellt (gepunktete Linie). Ab einer gewissen Wundgröße stellt sich eine Sättigungskurve ein. Von diesem Punkt ab ist auch bei steigender Schnittflächengröße mit keiner Zunahme des Gattungsreichtums zu rechnen.

Inwieweit sich die *Trichoderma*-Applikation auf die Diversität der Schnittflächen ausgewirkt hat, ist in der Tabelle 27 dargestellt. Hier wird deutlich, dass die Wunden, aus denen durch die Beimpfung vermehrt *Trichoderma atroviride* isoliert werden konnte, eine geringere Diversität als die unbehandelten Wunden (Kontrolle) aufwiesen. Insbesondere die Schnittflächen, die mit dem Verfahren C (Höchste Isolationsrate von *Trichoderma* sp.) behandelt wurden, ließen im Gegensatz zur Kontrolle (R1=9,1, H'=1,547, E=0,846) die geringste Diversität erkennen (R1=5,9, H'=0,651, E=0,242). Aber auch die restlichen Verfahren (A, B, C<sup>S</sup>) wiesen geringere Diversitätszahlen auf als die unbehandelten Schnittflächen. In diesem Zusammenhang müssen die sehr niedrigen Verteilungs-Werte, insbesondere der E-Wert des Verfahrens C (E=0,242) betont werden. Diese Werte deuten zum einen darauf hin, dass der Grossteil der isolierten Individuenzahl auf wenige dominante Gattungen, wie bspw. *Trichoderma* verteilt war, und zum anderen dass *Trichoderma* sp. womöglich in der Lage war, andere Pilzarten zu verdrängen (substituieren).

**Tabelle 27:** Einfluss der *Trichoderma*-Beimpfung auf die Diversität

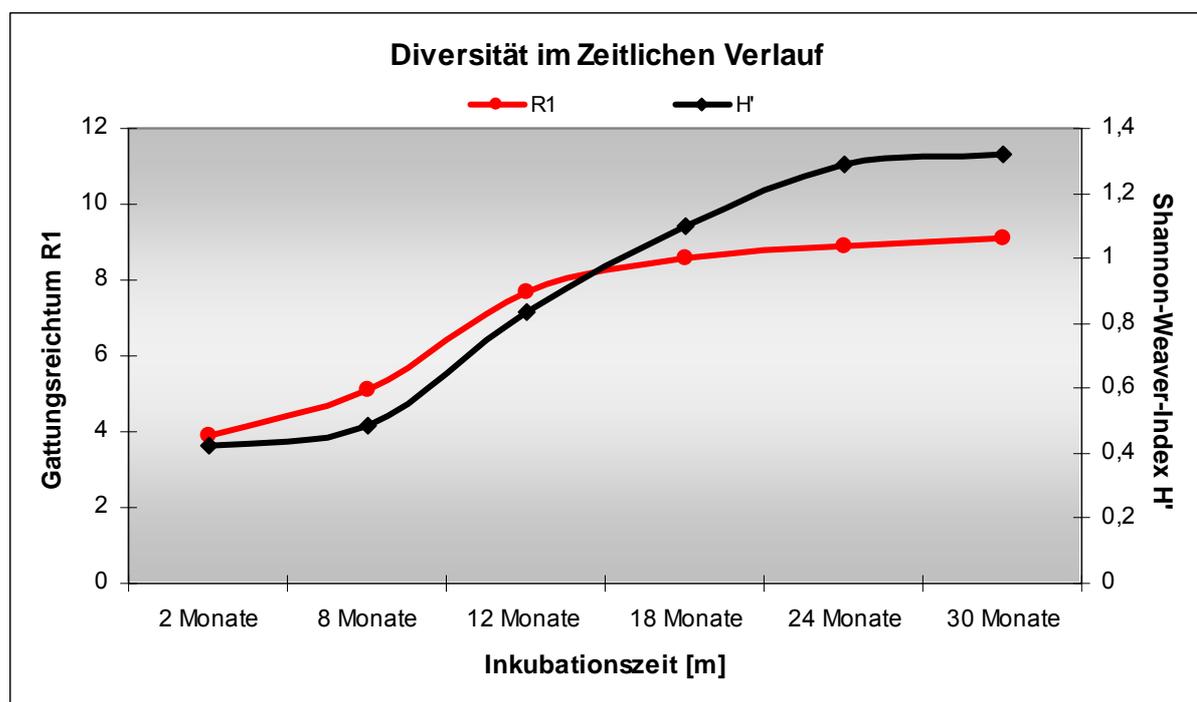
Diversitätsindices	A	B	C <sup>S</sup>	C	K
S	25	32	33	20	35
R1	7,4	8,6	8,8	5,9	9,1
H'	0,811	1,024	1,136	0,651	1,547
E	0,468	0,534	0,578	0,242	0,846

Abschließend wurde mit Hilfe der Diversitätsparameter die Sukzession auf den Schnittflächen analysiert. In Tabelle 28 sowie in Abbildung 49 sind die Indices im zeitlichen Verlauf (30 Monate) dargestellt.

**Tabelle 28:** Darstellung der Sukzession mit Hilfe der Diversitätsindices

Diversitätsindices	2 Monate	8 Monate	12 Monate	18 Monate	24 Monate	30 Monate
S	11	14	29	33	35	35
R1	3,9	5,1	7,7	8,6	8,9	9,1
H'	0,423	0,484	0,834	1,098	1,288	1,314
E	0,356	0,412	0,777	0,832	0,811	0,823

Es wird deutlich, dass nach einer Inkubationszeit von 2 Monaten die Diversitätsindices deutlich geringere Werte aufwiesen als nach 30 Monaten. So konnte nach 2 Monaten ein R1-Index von 3,9, ein H'-Index von 0,423 und einen E-Wert von 0,356 verzeichnet werden. Diese Werte belegen, dass die Diversität auf den Schnittflächen sehr gering war. Insbesondere der kleine Verteilungswert (E) deutet auf einige dominante Gattungen hin. Bereits nach 8 Monaten stiegen die Indexwerte an (R1=5,1, H'=0,484; E=0,412). Die größte Zunahme der Diversität wurde nach 12 Monaten beobachtet. Hier stieg der R1-Index auf 7,7 an und der H'-Wert verzeichnete ebenfalls eine deutliche Zunahme mit 0,834. Der hierbei ermittelte Verteilungswert E ließ auf keine dominanten Gattungen mehr schließen. Nach diesen 12 Monaten erhöhte sich die Diversität nur noch langsamer. Die größte Diversität wurde nach 30 Monaten verzeichnet. Hier lagen die Werte bei R1= 9,1, H'=1,314, E=0,823. Der Kurvenverlauf der Diversitätsindices (R1 & H') in Abbildung 49 gleicht für beide Indices einer Sättigungskurve. Dies lässt den Schluss zu, dass im weiteren zeitlichen Verlauf mit keiner bzw. mit einer sehr geringen Zunahme (ggf. Abnahme) der Diversität zu rechnen ist.



**Abb. 49:** Veränderung der Diversität im zeitlichen Verlauf. Sowohl der R1-Index als auch der H'-Index stiegen im Laufe der Zeit an. Die deutlichste Zunahme wurde nach 12 Monaten verzeichnet. Die höchste Diversität wurde nach 30 Monaten ermittelt. Der Kurvenverlauf für die Diversitäts-Indices (R1 & H') gleicht einer Sättigungskurve. Dies bedeutet, dass im weiteren Verlauf nur noch mit einem geringen bzw. mit keinem Anstieg der Diversität auf den Schnittflächen zu rechnen ist.

### 3.2.2 VERSUCH B: Infektionsversuche an Bäumen

Aus den mit *Trichoderma atroviride* als Antagonisten vorbehandelten und mit 3 Holz zersetzenden Pilzen (*Inonotus hispidus* 200792.1, *Ganoderma adpersum* & *Polyporus squamosus*) künstlich inokulierten Schnittflächen erfolgte im Winter 2005/06 die standardisierte Probenentnahme (Kapitel 2.7.2.2). Bei der Auswertung lag der Fokus vor allem auf die Persistenz des Antagonisten (Re-Isolationsrate), auf vorhandene Pilzinfektionen und auf die Ausmaße der Wundparameter wie Verfärbung und Überwallung (Kalluskoeffizient). Daneben stellte ebenfalls die Bestimmung des Wirkungsgrades von *T. atroviride* einen zentralen Bestandteil der Analyse dar. In den folgenden Kapiteln werden die erzielten Ergebnisse besprochen und dargestellt.

#### 3.2.2.1 Re-Isolationsergebnisse

Die durchschnittliche Re-Isolationsrate von *T. atroviride* lag nach einer ca. 30-monatigen Inkubationszeit bei 46,1% und somit in einem ähnlichen Bereich wie die Raten des Versuchs A. Bei einem Vergleich der Verfahren (A, B & C) konnte die signifikant höchste Isolationsrate mit 71,4% aus den mit dem Verfahren C behandelten Schnittflächen ermittelt werden ( $p \leq 0,001$ ). Zwischen den Verfahren A mit 30% und Verfahren B mit 36% konnten auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  keine Unterschiede verzeichnet werden. Allerdings ist zu betonen, dass alle Verfahren signifikant ( $p \leq 0,05$ ) höhere Isolationsraten von *Trichoderma* sp. aufwiesen als die Rate (3,4%) aus den Kontrollwunden (unbehandelte Schnittflächen). Die statistische Auswertungen mittels dem CHI-Quadrat-Test [ $\chi^2$ ] ließen, wie bereits die Ergebnisse des Versuch A zeigten, keinen Einfluss der Himmelsrichtung und der unterschiedlichen Baumarten (*Tilia platyphyllos*, *Populus nigra*, *Acer pseudoplatanus* & *Quercus rubra*) auf die Re-Isolation von *T. atroviride* erkennen ( $p \leq 0,05$ ). Auf eine Analyse des Einflusses der Wundgröße und damit des Kern- und Splintholzes auf die Isolationsrate wurde an dieser Stelle, auf Grund der geringen mittleren Wundgröße von 4,8cm, verzichtet. Vielmehr lag der Schwerpunkt der Auswertung auf der Tiefenwirkung von *T. atroviride* bzw. auf der Frage, bis zu welcher Tiefe (1, 3 & 5cm) der Antagonist in der Lage war, vorzudringen. In Tabelle 29 und 30 sind die Re-Isolationsergebnisse zusammengefasst dargestellt. Die signifikant höchste Isolationsrate *T. atroviride* nach 30 Monaten wurde mit 46,1% in 1cm Tiefe erzielt ( $p \leq 0,05$ ). In 3cm Tiefe fiel die Re-Isolationsrate bereits deutlich (signifikant) geringer

aus. Hier lag der Anteil von *T. atroviride* bei nur noch 13,5% ( $p \leq 0,05$ ). Die höchste Rate in 3cm tiefe konnte bei dem Verfahren C mit 7% ermittelt werden. Wie aus Tabelle 30 ersichtlich, war dieser Wert auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu den Werten des Verfahrens A (3,5%) und des Verfahrens B (2,3) am höchsten. Zwischen den Verfahren A und B wurden in 3cm Tiefe, in Bezug auf die Re-Isolationsrate von *T. atroviride*, keine signifikanten Unterschiede festgestellt. In einer Tiefe von 5cm konnte in keinem Fall *T. atroviride* isoliert werden (0%).

**Tabelle 29:** Re-Isolationsergebnisse von *T. atroviride* in % des Standortes Lehen, Freiburg

	<i>Tilia</i>	<i>Populus</i>	<i>Acer</i>	<i>Quercus</i>	Ø
<b>1 cm</b>	48,3 a	47,1 a	46,2 a	42,9 a	<b>46,1</b>
<b>3 cm</b>	10,3 a	17,7 a	14,9 a	11,5 a	<b>13,5</b>
<b>5 cm</b>	0 a	0 a	0 a	0 a	<b>0</b>

Werte in einer Zeile mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial- Weltsch-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,05$ ).

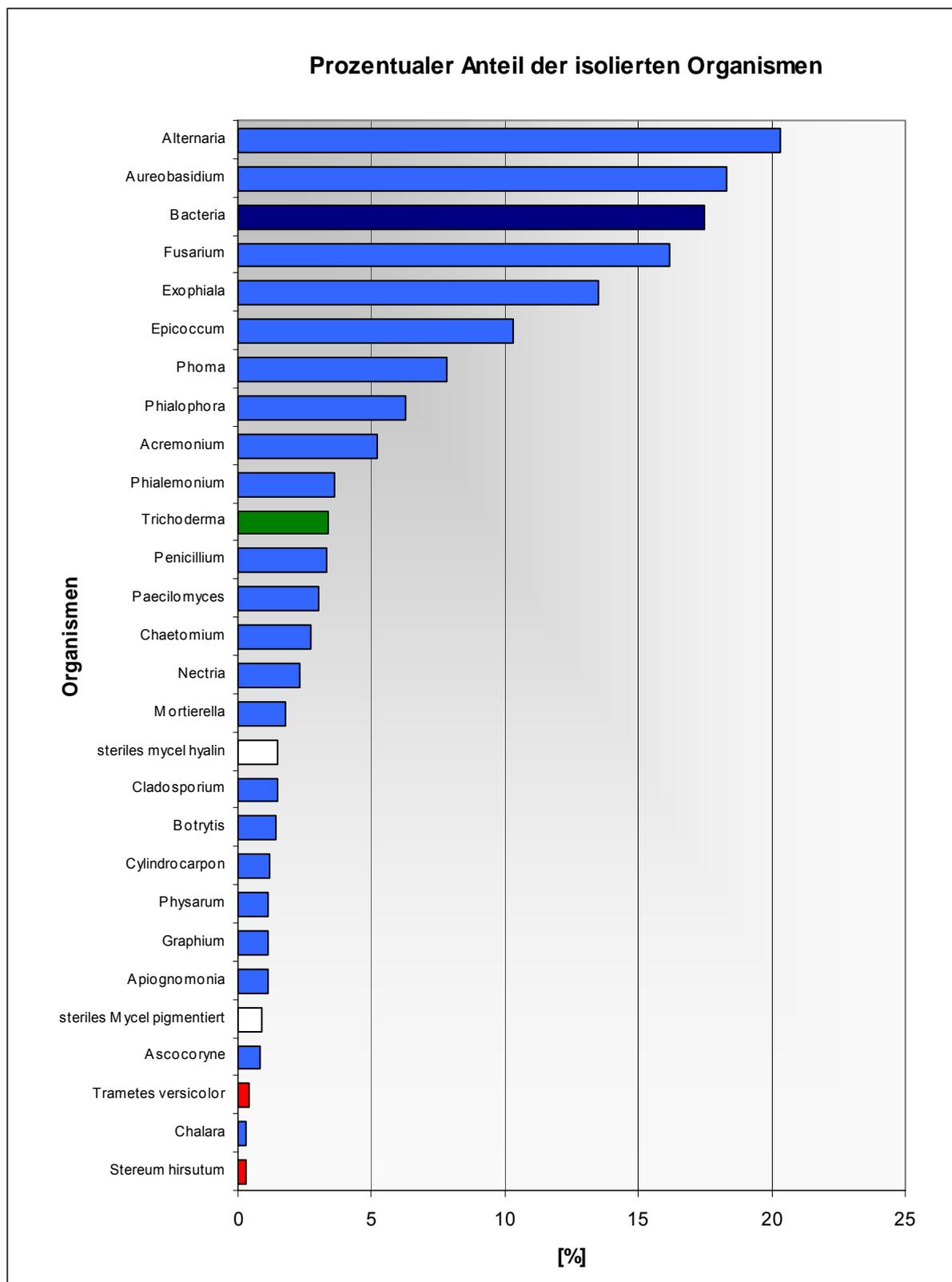
**Tabelle 30:** Re-Isolationsergebnisse von *T. atroviride* in % des Standortes Lehen, Freiburg

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	Ø
<b>1 cm</b>	30 a	36 a	71,4 b	<b>46,1</b>
<b>3 cm</b>	3,5 a	2,3 a	7 b	<b>13,5</b>
<b>5 cm</b>	0 a	0 a	0 a	<b>0</b>

Werte in einer Zeile mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial- Weltsch-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2.2.2 Pilzanalyse

In Abbildung 50 ist die Gesamtauswertung der isolierten Organismen des Standortes Lehen, Freiburg dargestellt. Insgesamt wurden aus den behandelten und unbehandelten Schnittflächen in 1, 3 und 5cm Tiefe 28 verschiedene Organismen isoliert. Den prozentual größten Anteil besaßen die Pilzgattungen *Alternaria* spp. mit 20,3% und *Aureobasidium* spp. mit 18,3%. Die Bakterien und die Pilzgattung *Fusarium* spp. wurden mit einer Häufigkeit von 17,5 bzw. 16,2% isoliert. Das sterile Mycel hyalin sowie das sterile Mycel pigmentiert nahm einen prozentualen Anteil von 1,5 bzw. 0,9% ein. Für die Bestimmung des prozentualen Anteils der Gattung *Trichoderma* (3,4%) dienten nur die Isolate, die aus den Schnittflächen der Kontrollwunden (keine vorherige *Trichoderma*-Behandlung) isoliert wurden.



**Abb. 50:** Gesamtauswertung der isolierten Organismen am Standort Lehen, Freiburg. Die Pilzgattungen *Alternaria* spp. und *Aureobasidium* spp. bildeten den größten Anteil. Die Bakterien waren mit 17,5% am dritthäufigsten vertreten. Für die Auswertung von *Trichoderma* spp. dienten nur die Isolate, die aus den unbehandelten Wunden (Kontrolle) isoliert wurden. Aus den Schnittflächen der Kontrollwunden wurden zudem die Holz abbauenden Pilze *Trametes versicolor* und *Stereum hirsutum* isoliert.

Ebenfalls konnten aus den unbehandelten Schnittflächen (Kontrolle) 2 Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten isoliert werden (Abbildung 52I). Die Holz zersetzenden Pilze *Trametes versicolor* und *Stereum hirsutum* hatten einen Anteil von 0,3 bzw. 0,4%. Die Gattung *Physarum* spp. (Myxomycota) war mit einer Häufigkeit von 1,1% vertreten. Die 25 isolierten Pilzgattungen (ohne Bakterien & Mycelia sterilia) verteilten sich auf folgende taxonomische Klassen: Deuteromycetes (11), Ascomycetes (10), Zygomycetes (1), Basidiomycetes (2) und Myxomycetes (1).

Die Analyse der Pilzpopulationen mit Hilfe der Diversitätsindices ergab, dass insgesamt ein Gattungsreichtum (ohne Bakterien & Mycelia sterilia) auf den Schnittflächen (1cm Tiefe) von  $R1=7,9$  vorlag. Der Shannon-Weaver-Index ergab einen  $H'$ -Wert von 1,057 und für die Verteilung (Evenness) E konnte der Wert 0,747 berechnet werden. An dieser Stelle wird, aus bereits genannten Gründen, auf eine Analyse der Diversitätsindices für die Wundgröße, Baumarten und damit verbunden Kern- Splintholz verzichtet. Inwieweit sich die *Trichoderma*-Applikation auf die Diversität der Schnittoberflächen (1cm Tiefe) ausgewirkt hat, wird in der Tabelle 31 dargestellt. Hier zeigt sich, dass die Schnittflächen, aus denen durch die Behandlung vermehrt *T. atroviride* isoliert werden konnte, eine geringere Diversität als die unbehandelten Wunden (Kontrolle) aufwiesen. Insbesondere die Schnittflächen, die mit dem Verfahren C behandelt wurden ( $R1=5,4$ ,  $H'=0,465$ ,  $E=0,278$ ), ließen im Gegensatz zur Kontrolle ( $R1=8,1$ ,  $H'=1,196$ ,  $E=0,864$ ) die geringste Diversität erkennen. Aber auch die restlichen Verfahren (A & B) wiesen geringere Diversitätszahlen auf. In diesem Zusammenhang sind die sehr niedrigen Verteilungswerte, insbesondere der E-Wert des Verfahrens C ( $E=0,278$ ) auffällig. Diese Werte lassen, wie im Feldversuch A bereits konstatiert, zum einen darauf schließen, dass der Grossteil der isolierten Individuenzahl auf wenige dominante Gattungen (bspw. *Trichoderma*) verteilt war und zum anderen dass *Trichoderma* sp. in der Lage war, andere Pilzarten zu substituieren.

**Tabelle 31:** Einfluss der *Trichoderma*-Beimpfung auf die Diversität in 1 cm Tiefe

Diversitätsindices	A	B	C	K
S	17	21	11	24
R1	6,8	7,5	5,4	8,1
H'	0,889	0,986	0,465	1,196
E	0,434	0,582	0,278	0,864

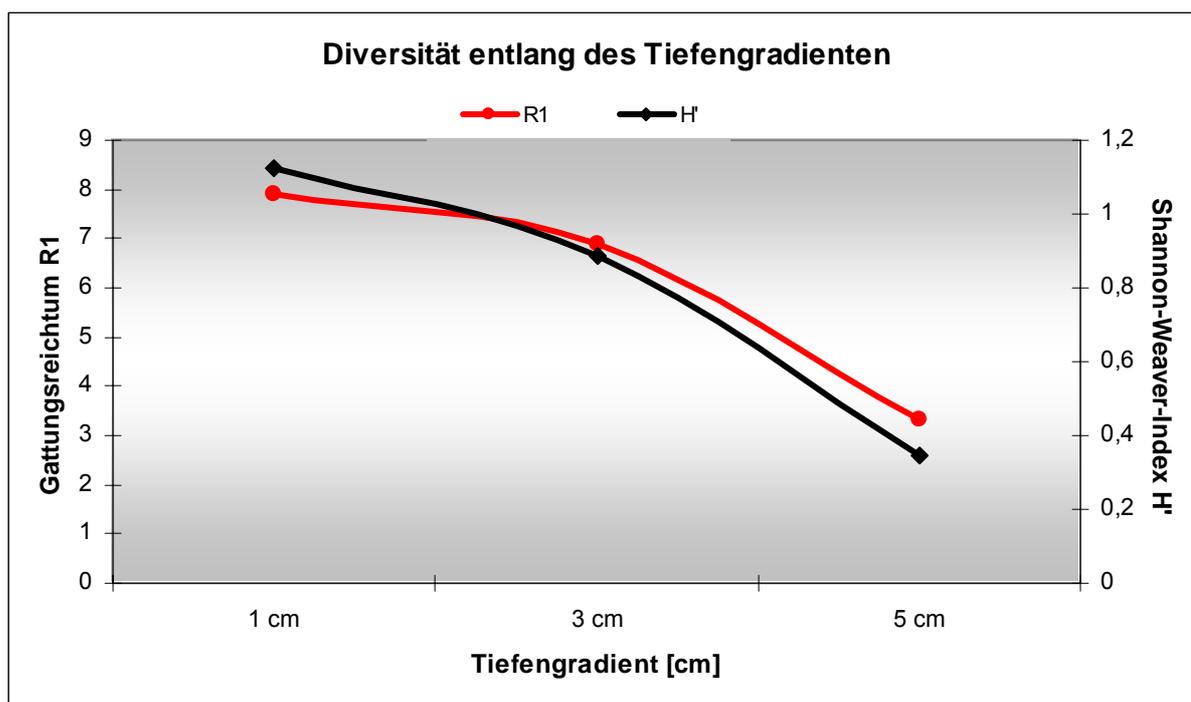
Inwieweit sich die Diversität an Pilzgattungen und ihre Zusammensetzung von der Schnittflächenoberfläche (1cm Tiefe) über 3cm bis zu 5cm Tiefe verändert (Tiefengradient), wird aus Tabelle 32 und 33 sowie aus Abbildung 51 deutlich. So lässt sich aus Tabelle 32 entnehmen, dass die Zusammensetzung der isolierten Pilzklassen entlang des Tiefengradienten stark variierte. Bereits in 3 cm Tiefe konnten keine Pilzgattungen aus der Klasse der Zygomyceten mehr isoliert werden, während in 1cm Tiefe der Anteil noch bei 4% lag. Ebenso nahm der Anteil der Deuteromyceten mit 11 Gattungen in 1cm Tiefe (45,8%) auf 5 Gattungen in 3cm (29,4%) und eine Gattung in 5cm Tiefe (16,7%) ab. Dagegen stieg der prozentuale Anteil der Gattungen der Basidiomyceten entlang des Gradienten. So lag der Anteil der Pilzgattungen aus der Klasse der Basidiomyceten in 1cm Tiefe bei 4%, in 3cm bei 12,5% und in 5cm Tiefe bei 33,3%. Diese Veränderung der Pilzklassen und ihrer Anteile entlang des Tiefengradienten wird auch durch die Diversitätsindices deutlich (Tabelle 33). In Oberflächennähe (1cm) wurde eine eindeutig höhere Diversität an Pilzgattungen angetroffen als dies in 3cm Tiefe der Fall war. So waren die Diversitätsindices und ihre Werte in Oberflächennähe ( $R1=8,2$ ,  $H'=1,126$ ,  $E=0,897$ ) deutlich höher als bereits in 3cm Tiefe ( $R1=6,9$ ,  $H'=0,885$ ,  $E=0,502$ ). In 5cm Tiefe wurden die geringsten Diversitätsindices mit einem  $R1$ -Wert von 3,32, einem  $H'$ -Wert von 0,347 und einem  $E$ -Wert von 0,469 ermittelt. Die niedrigen  $E$ -Werte in 3 und 5cm Tiefe lassen zudem darauf schließen, dass, im Gegensatz zur Oberfläche, in diesen Bereichen wenige Pilzgattungen dominieren.

**Tabelle 32:** Zusammensetzung der Pilzklassen entlang des Tiefengradienten

	1cm	3cm	5cm
<b>Deuteromyceten</b>	11 [45,8%]	5 [29,4%]	1 [16,7%]
<b>Zygomyceten</b>	1 [4%]	0 [0%]	0 [0%]
<b>Asomyceten</b>	10 [40%]	9 (56,3%)	3 [50%]
<b>Basidiomyceten</b>	1 [4%]	2 [12,5%]	2 [33,3%]
<b>Myxomyceten</b>	1 [4%]	1 [6,25%]	0 [0%]

**Tabelle 33:** Diversität entlang des Tiefengradienten der Schnittflächen

Diversitätsindices	1cm	3cm	5cm
<b>S</b>	24	17	6
<b>R1</b>	8,2	6,9	3,32
<b>H'</b>	1,126	0,885	0,347
<b>E</b>	0,897	0,502	0,469



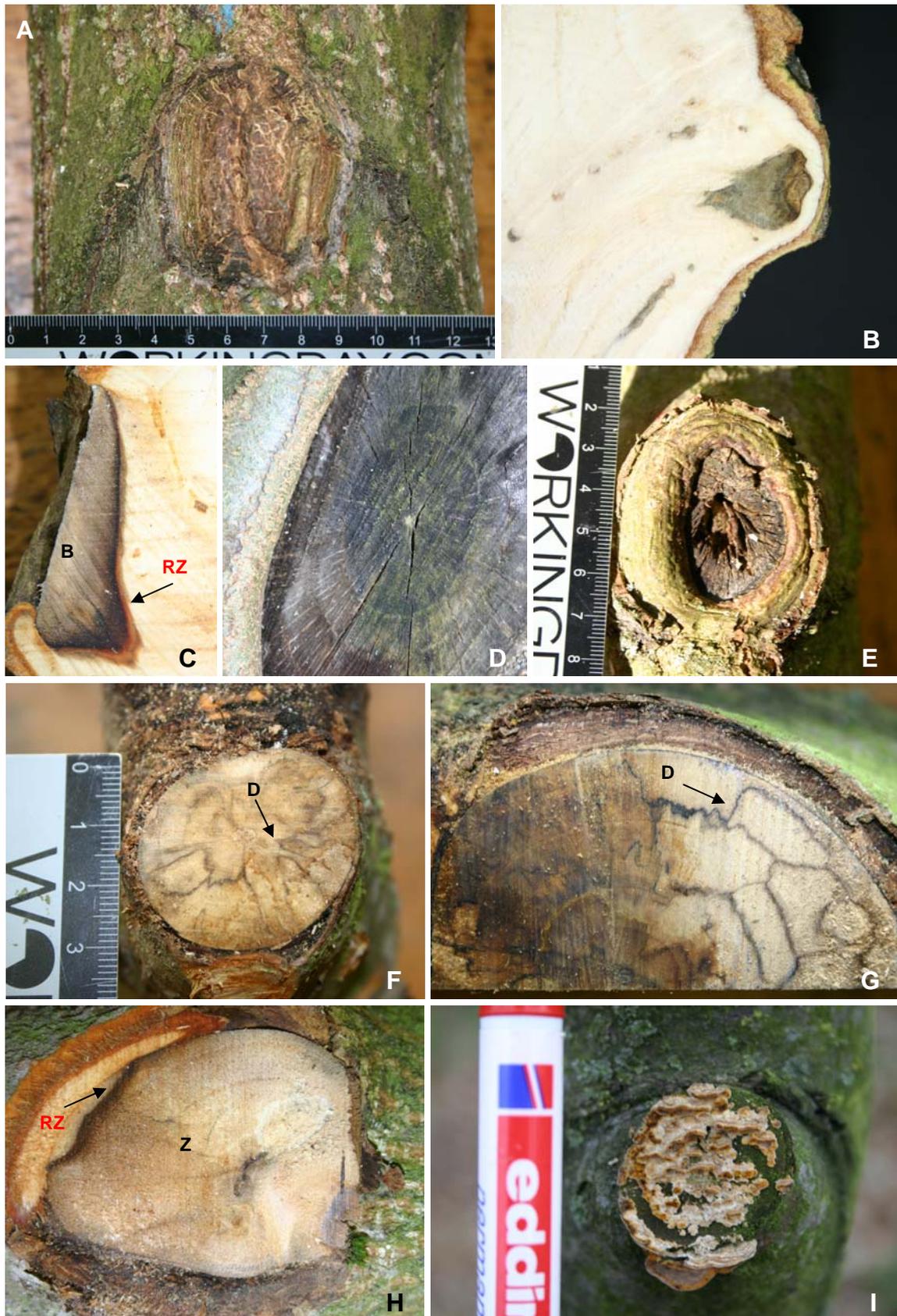
**Abb. 51:** Die Diversitätsindices Gattungsreichtum R1 und Shannon-Weaver-H' zeigen, dass die Diversität an Pilzgattungen entlang des Schnittflächen-Tiefengradienten abnahm. Die niedrigsten Werte wurden in 5cm Tiefe verzeichnet. Zudem lassen die geringen Verteilungs-Werte (E) in 3 und 5cm Tiefe auf wenige dominante Gattungen in diesen Bereichen schließen.

### 3.2.2.3 Auswertung der Wundparameter

Bei der Auswertung wurden zum einen Besonderheiten, wie Fruchtkörper oder erkennbare Zersetzung der Schnittflächen, dokumentiert (Abbildung 52), und zum anderen wurde die Holzverfärbung in axialer, radialer und tangentialer Richtung sowie die Wundüberwallung (Kalluskoeffizient) als Wundparameter herangezogen. In Tabelle 34 sind die durchschnittlichen Ausmaße der Holzverfärbung für die Baumarten aufgeführt. Hier wird deutlich, dass *Populus nigra* in allen 3 Richtungen die größten Holzverfärbungen aufwies. Bei *Quercus rubra* hingegen wurde die geringste Fläche an Verfärbungen festgestellt. Eine Zwischenstellung nahmen die Arten *Acer pseudoplatanus* und *Tilia platyphyllos* ein, wobei die Ø Verfärbungen (Ausnahme Radial) von *Acer* sp. etwas unter denen von *Tilia* sp. lagen.

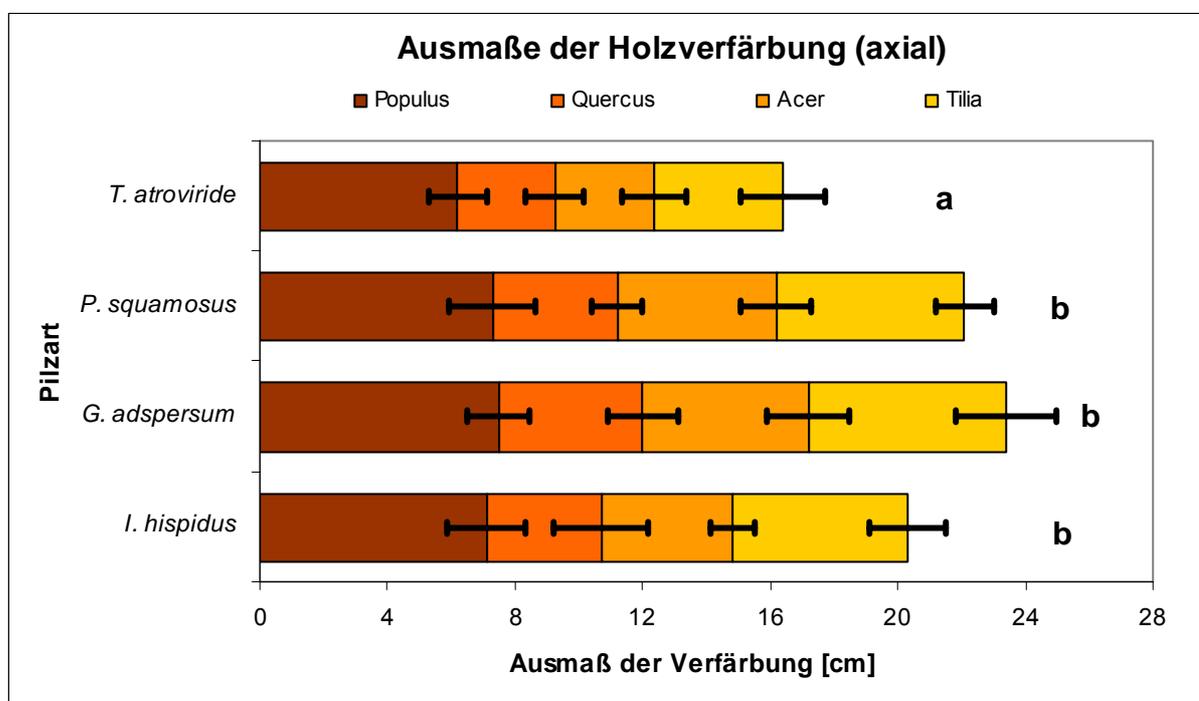
**Tabelle 34:** Holzverfärbung in axialer, radialer und tangentialer Richtung [cm]

	axial	radial	tangential
<i>Populus</i>	6,90 [±1,02]	2,95 [±1,08]	2,36 [±0,88]
<i>Quercus</i>	3,37 [±1,13]	2,83 [±1,07]	1,88 [±1,01]
<i>Acer</i>	4,05 [±0,96]	2,91 [±0,68]	2,08 [±1,18]
<i>Tilia</i>	5,83 [±1,17]	2,87 [±1,23]	2,23 [±1,15]

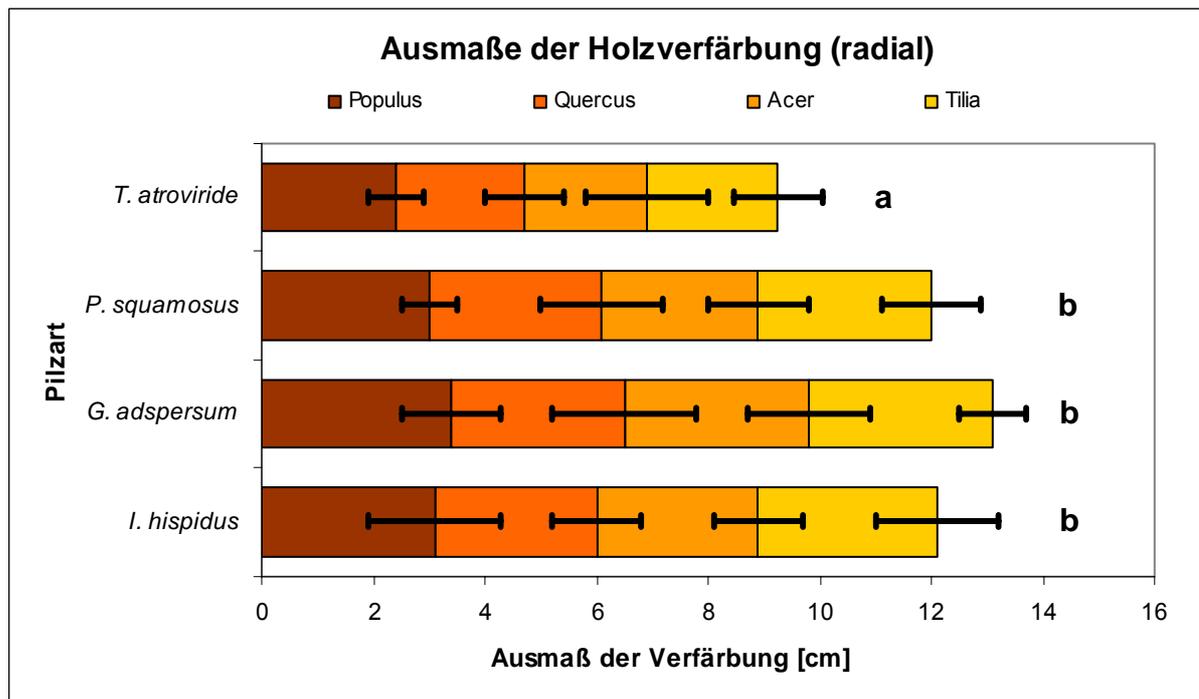


**Abb. 52:** **A:** Vollständig überwachte Wunde von *Populus* sp. **B:** Mit *Trichoderma* sp. beimpfte und überwachte Wunde von Pappel im Längsschnitt. **C:** Astwunde von *Tilia* sp. im Längsschnitt. Die Verfärbung wies einen gebleichten Bereich auf [B]. RZ=Reaktionszone. **D:** Intakte, beimpfte Schnittfläche von *Quercus* sp. **E:** Erkennbare Fäule an mit *G. adspersum* inokulierte Wunde von Linde. **F + G:** Durch die Demarkationslinien erkennbare Infektion der Schnittflächen mit *P. squamosus*. **H:** Die mit *I. hispidus* inokulierte Astwunde von Linde ließ nach 3 Jahren deutliche zersetzte Bereiche [Z] erkennen. RZ=Reaktionszone. **I:** Unbehandelte Wunde (Kontrolle) mit Fruchtkörper von *Stereum hirsutum*.

Interessant war die Tatsache, dass die mit den Holz zersetzenden Pilzen inokulierten Wunden deutlich größere Ausmaße an Holzverfärbung aufwiesen als die mit *T. atroviride* beimpften Schnittflächen. In Abbildung 53 erkennt man, dass die Summe der Verfärbungen (axial) bei *T. atroviride* mit 20,4cm das signifikant geringste Ausmaß aufwies ( $p \leq 0,05$ ). Signifikant höhere Holzverfärbungen als die mit *Trichoderma* sp. behandelten Wunden zeigten die Holz abbauenden Pilze *G. adspersum* mit 29,3cm (größte Ausdehnung), *P. squamosus* mit 27,6cm und *I. hispidus* mit 25,4cm. Hierbei konnte allerdings auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  keine Unterschiede zwischen den Holz zersetzenden Pilzen festgestellt werden. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Betrachtung der radialen Ausdehnung der Verfärbung (Abbildung 54). Auch hier lag die Summe der radialen Ausdehnung bei *T. atroviride* mit 11,6cm signifikant unter den Ausmaßen der mit den Holzersetzer inokulierten Wunden ( $p \leq 0,05$ ). Die größte Ausdehnung wiesen die mit *G. adspersum* inokulierten Schnittflächen auf (16,4cm), gefolgt von *I. hispidus* mit 15,1cm. Das geringste Ausmaß in der radialen Holzverfärbung konnte bei *P. squamosus* mit 15cm festgestellt werden. Wie bereits bei der axialen Ausdehnung ermittelt, konnte auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  keine Unterschiede zwischen den Holzersetzer verzeichnet werden.



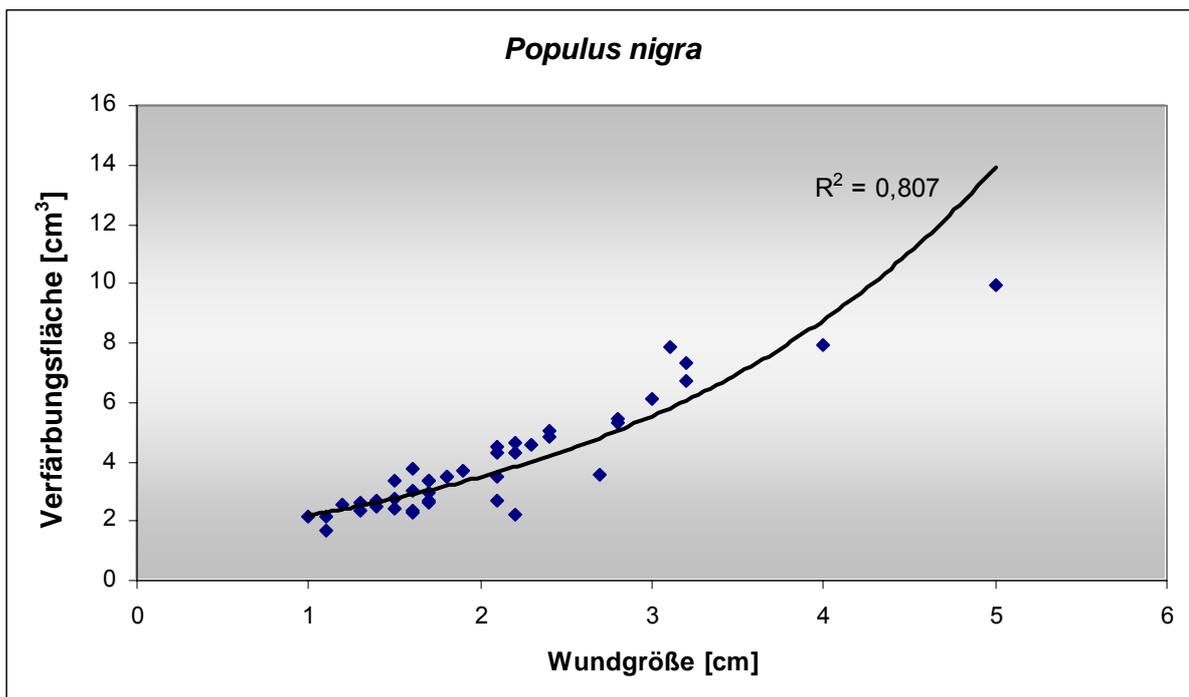
**Abb. 53:** Die mit unterschiedlichen Pilzarten inokulierten und behandelten Schnittflächen wiesen unterschiedliche Ausmaße an Holzverfärbung in axialer Richtung auf. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial- Weltsch-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,05$ ).



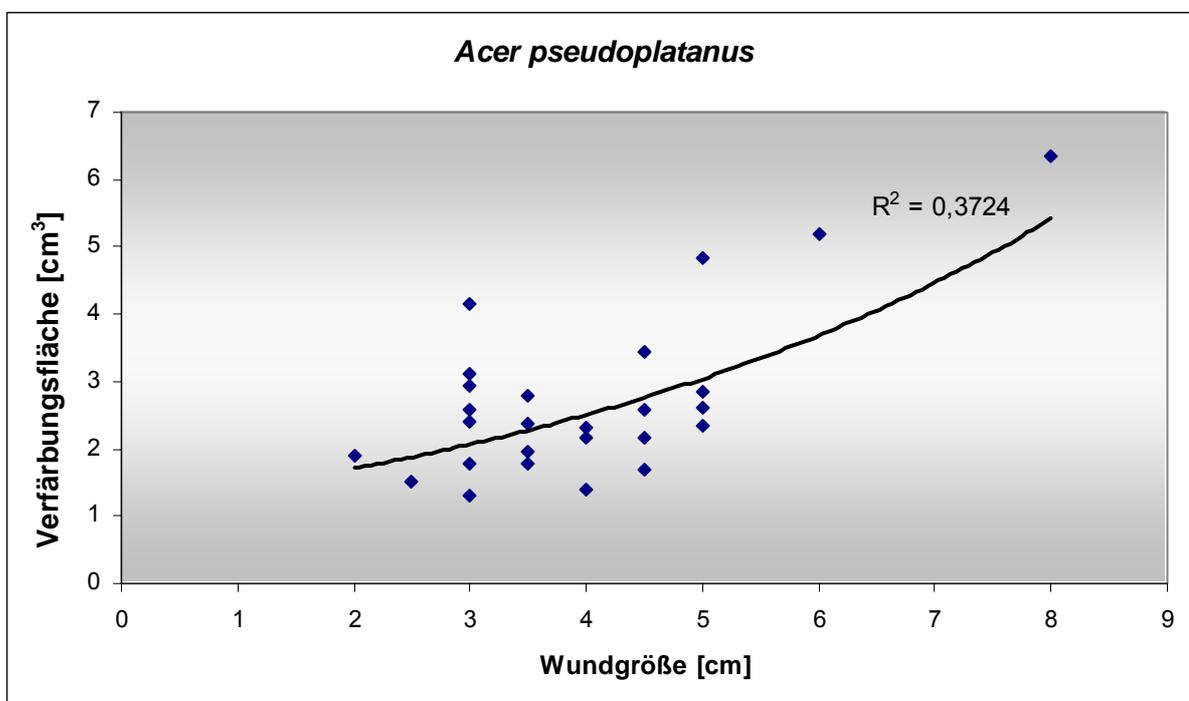
**Abb. 54:** Die mit unterschiedlichen Pilzarten inokulierten und behandelten Schnittflächen wiesen unterschiedliche Ausmaße an Holzverfärbung in radialer Richtung auf. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial- Weltsch-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,05$ ).

Neben der Pilzart, mit der die Schnittflächen inokuliert wurden, war die Wundgröße für die Ausdehnung der Holzverfärbung entscheidend. Die statistische Analyse nach Bravais-Pearson ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,356$  auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  eine positive Beziehung zwischen Wundgröße und Ausmaß der Verfärbung. Für die verwendeten Baumarten konnten nach der Korrelationsanalyse folgende  $r$ -Werte berechnet werden: Für die Baumarten *Populus nigra* und *Tilia platyphyllos* konnte ein Koeffizient von  $r=0,937$  bzw.  $r=0,708$  festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ). Etwas geringere Korrelationskoeffizienten wurden für die Baumarten *Acer pseudoplatanus* und *Quercus rubra* verzeichnet. Sie besaßen einen errechneten Wert von  $r=0,679$  und  $r=0,673$  ( $p \leq 0,05$ ). Für alle Baumarten ergaben sich somit eine positive Beziehungen zwischen Schnittflächengröße und Ausdehnung der Holzverfärbung. Stellt man diese positive Korrelation (Abhängigkeit) zwischen Wundgröße und durchschnittlicher Ausdehnung (axial, radial & tangential) grafisch dar, so lassen sich für alle Baumarten exponentielle Kurvenverläufe beobachten. Der Kurvenverlauf war insbesondere bei *Populus nigra* stark ausgeprägt. Hingegen wies *Quercus rubra* eine etwas geringere Steigung der Kurve auf. Dies lässt den Schluss zu, dass bei steigender Wundgröße insbesondere die

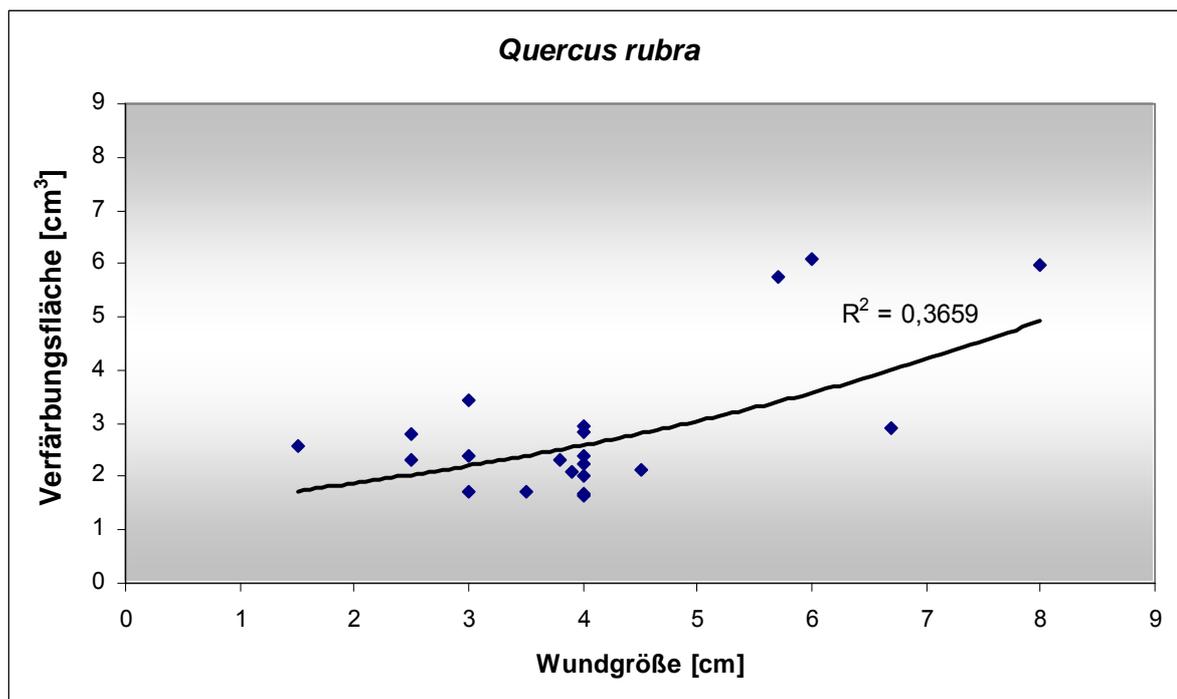
Verfärbung bei der Baumart Pappel stark zunehmen wird, hingegen bei der Eiche etwas verminderte Ausmaße zu erwarten sind (Abbildung 55-58).



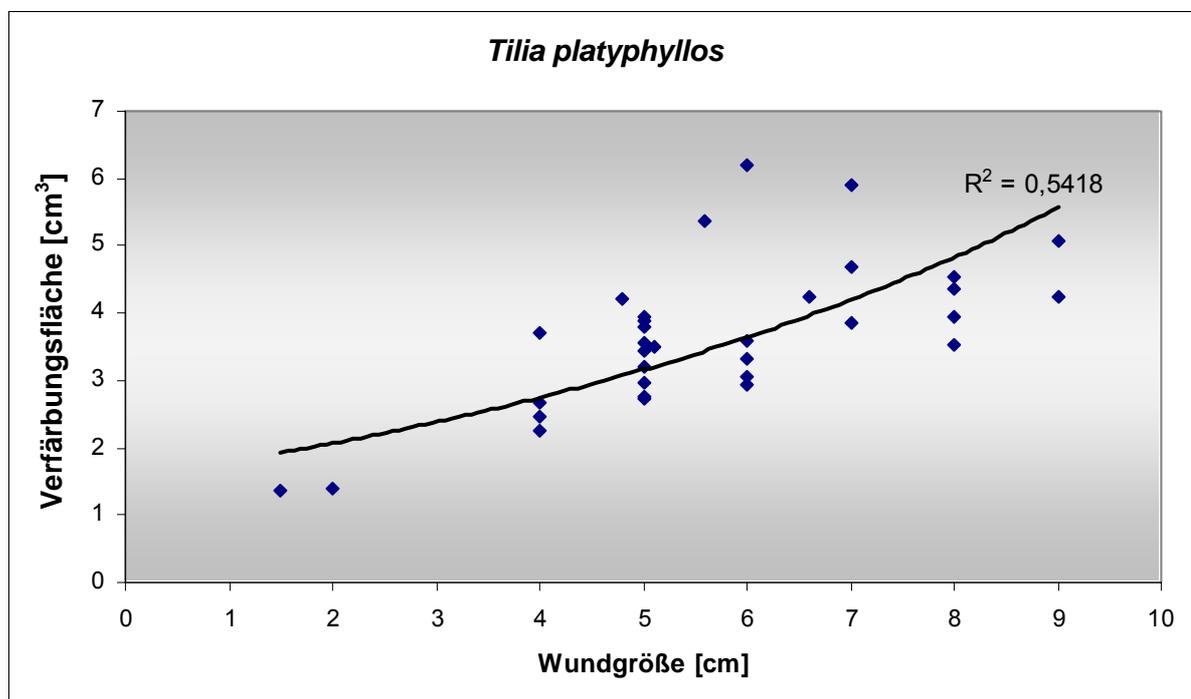
**Abb. 55:** Die Korrelationsanalyse auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  nach Bravais-Pearson ergab bei der Baumart Pappel eine positive Beziehung zwischen Wundgröße und Verfärbungsfläche (axial, radial & tangential). Bei einer grafischen Darstellung der Korrelation ergibt sich ein exponentieller Kurvenverlauf.



**Abb. 56:** Die Korrelationsanalyse auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  nach Bravais-Pearson ergab bei der Baumart Ahorn eine positive Beziehung zwischen Wundgröße und Verfärbungsfläche (axial, radial & tangential). Bei einer grafischen Darstellung der Korrelation wies die Kurve einen exponentiellen Verlauf auf.

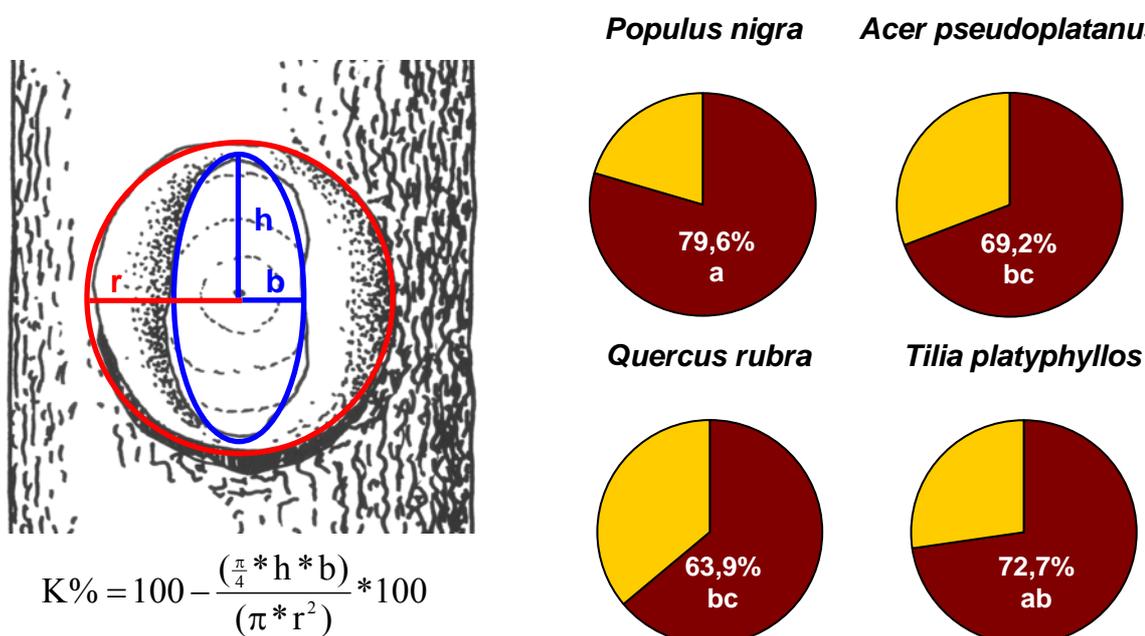


**Abb. 57:** Die Korrelationsanalyse auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  nach Bravais-Pearson ergab bei der Baumart Eiche eine positive Beziehung zwischen Wundgröße und Verfärbungsfläche (axial, radial & tangential). Bei einer grafischen Darstellung der Korrelation wies die Kurve einen exponentiellen Verlauf auf.



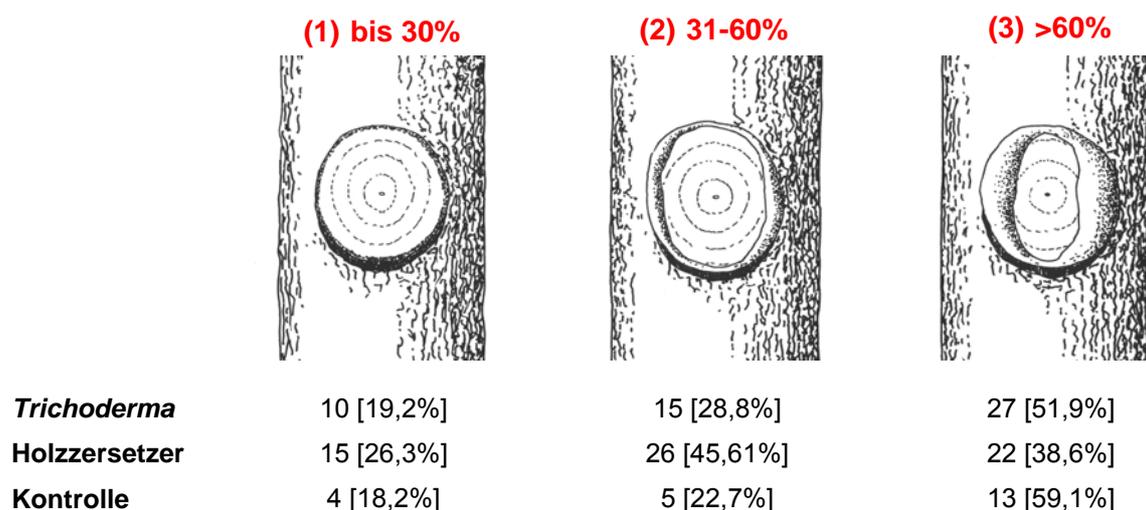
**Abb. 58:** Die Korrelationsanalyse auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  nach Bravais-Pearson ergab bei der Baumart Linde eine positive Beziehung zwischen Wundgröße und Verfärbungsfläche (axial, radial & tangential). Bei einer grafischen Darstellung der Korrelation wies die Kurve einen exponentiellen Verlauf auf.

Um eine Aussage bezüglich der Wundüberwallung treffen zu können, wurde der Kalluskoeffizient in Prozent berechnet (Abbildung 59). Hierbei wurde die Wundfläche (Kreis) in Beziehung zur überwallten Fläche (Ellipse) gesetzt. Nach der Inkubationszeit von 32 Monaten wiesen die Schnittflächen einen durchschnittlichen Kalluskoeffizienten (K) von 71,3% auf, d.h. 71,3% der Wundfläche war zu diesem Zeitpunkt bereits überwallt. In Abbildung 59 ist der Kalluskoeffizient für die verwendeten Baumarten dargestellt. Die höchste überwallte Fläche mit 79,6% konnte bei *Populus nigra* festgestellt werden. Etwas geringere Kalluskoeffizienten wiesen die Baumarten *Tilia platyphyllos* und *Acer pseudoplatanus* mit 72,7 bzw. 69,2% auf. Der geringste Überwallungsprozentsatz wurde bei *Quercus rubra* berechnet. Hier lag die überwallte Wundfläche bei 63,9%. Die statistische Analyse (ANOVA Varianzanalyse mit Post-Hoc-Tests) verzeichnete auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  Unterschiede zwischen den Baumarten bezüglich des Kalluskoeffizienten. Während zwischen den Gattungen *Acer* sp., *Tilia* sp. und *Quercus* sp. keine Divergenzen festgestellt wurden, so waren die Koeffizienten von *Acer* sp. und *Quercus* sp. im Vergleich zu *Populus* sp. signifikant unterschiedlich ( $p \leq 0,05$ ).

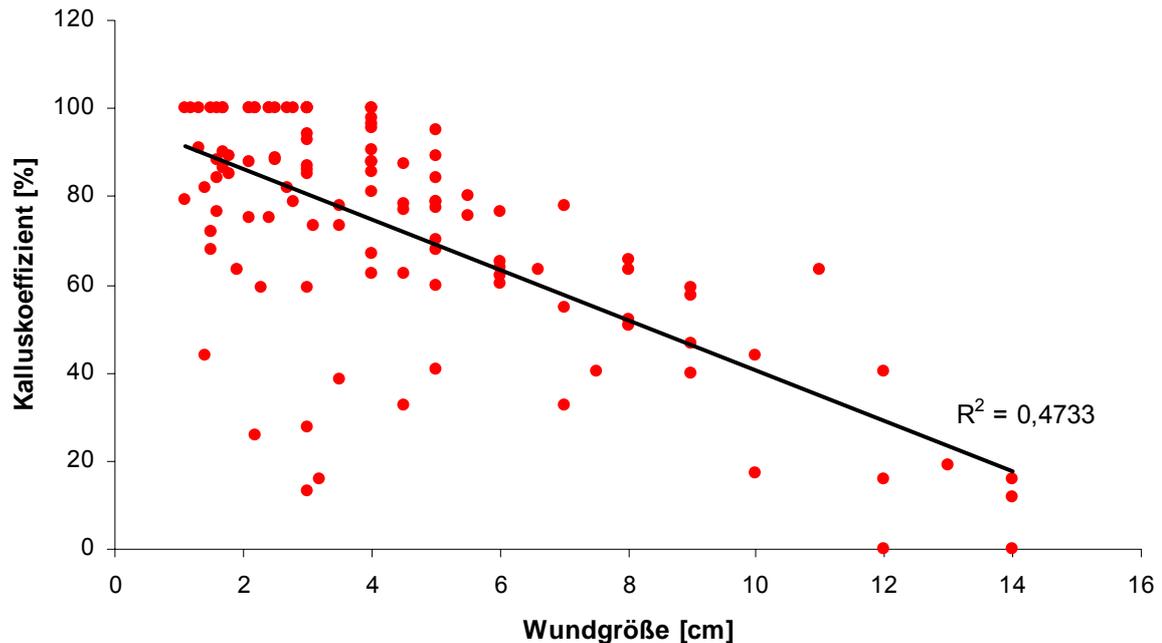


**Abb. 59:** Berechnung der überwallten Schnittfläche mit Hilfe des Kalluskoeffizienten. Nach der Inkubationszeit von 32 Monaten waren im Durchschnitt 71,3% der Wundfläche bereits überwallt. Zwischen den Baumarten konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Überwallungsprozentes errechnet werden. So wies *Populus nigra* mit 79,6% den höchsten Koeffizienten auf, während *Quercus rubra* mit 63,9% den niedrigsten Wert erkennen ließ. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Ryan-Einot-Gabrial- Weltsch-Test (REGWQ) ( $p \leq 0,05$ ).

Inwieweit die Beimpfung mit *T. atroviride* und die künstliche Inokulation der Schnittflächen mit Holz zersetzenden Pilze das Kalluswachstum und damit den Kalluskoeffizienten beeinflusst hat, wird aus Abbildung 60 ersichtlich. Während in der Kategorie 3 (über 60% überwallte Wundfläche) die mit *Trichoderma* sp. beimpften und unbehandelten Schnittflächen (Kontrolle) ihren höchsten Anteil mit 51,9 bzw. 59,1% besaßen, lag der größte Anteil der Holzzersetzer mit 45,6% in der Kategorie 2 (zwischen 31-60% überwallte Fläche). Ihren kleinsten Anteil hatten die Holzzersetzer mit 26,3%, wie *Trichoderma* sp. (19,2%) und die Kontrolle (18,2%) in der Kategorie 1 (bis 30% überwallte Fläche). Aus diesen Zahlen geht hervor, dass tendenziell die mit Holz abbauenden Pilzen inokulierten Schnittflächen ein etwas verzögertes Kalluswachstum aufwiesen. Dagegen konnte im Vergleich zu den unbehandelten Astwunden (Kontrolle) weder ein positiver (Wachstumsförderung) noch ein negativer (Wachstumshemmung) Einfluss von *T. atroviride* auf das Kalluswachstum und somit auf den Kalluskoeffizienten festgestellt werden. Einen wesentlich größeren Einfluss auf die Wundüberwallung konnte für die Schnittflächengröße nachgewiesen werden. So lag nach der Korrelationsanalyse (Bravais-Pearson) der errechnete Koeffizient  $r$  bei 0,688. Damit konnte auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  eine negative Beziehung zwischen zunehmender Wundgröße und abnehmender Wundüberwallung statistisch belegt werden. Diese negative Beziehung wird in Abbildung 61 mit Hilfe der Regressionsgeraden grafisch dargestellt.



**Abb. 60:** Einfluss der Schnittflächenbehandlung auf die Wundüberwallung. Während in der Kategorie 3 die mit *Trichoderma* sp. beimpften und die unbehandelten Flächen (Kontrolle) ihren größten Anteil besaßen, hatten die Holzzersetzer den größten Prozentsatz in der Kategorie 2. Somit konnte bei den Wunden, die mit den Holz abbauenden Pilzen inokuliert waren, ein verzögertes Kalluswachstum festgestellt werden. Hingegen bestand kein Einfluss von *T. atroviride* auf die Wundüberwallung.



**Abb. 61:** Die Korrelationsanalyse nach Bravais-Pearson ergab einen Koeffizienten  $r = 0,688$  und damit eine negative Beziehung zwischen Wundgröße und Kalluswachstum ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2.2.4 Wirkungsgrad [%]

Ein elementares Ziel der künstlichen Inokulationsversuche war es, die protektive Wirkung von *T. atroviride* gegen die 3 eingesetzten Holz zersetzenden Pilze (*Inonotus hispidus*, *Ganoderma adspersum* & *Polyporus squamosus*) an Bäumen (Schnittflächen) zu untersuchen und zu quantifizieren. Inwieweit eine Wundflächen-Beimpfung mit *Trichoderma* sp. die Infektionsraten minimieren konnte und welche Wirkungsgrade [%] dabei erzielt wurden, ist aus der Tabelle 35 sowie aus der Abbildung 62 zu entnehmen. So wiesen die Wunden, die mit den Holzzersetzern inokuliert wurden, nach der Inkubationszeit eine durchschnittliche Infektionsrate (die Holzzersetzer konnten aus den Wunden re-isoliert werden) von 78,7% auf. Die höchste Infektionsrate mit 81% erzielte *G. adspersum*, gefolgt von *P. squamosus* mit 79% und *I. hispidus* mit 76%. Auffällig ist die Tatsache, dass die mittlere Infektionsrate durch die Schnittflächenbeimpfung mit *T. atroviride* deutlich von 78,7% auf 13,9% reduziert werden konnte, was einem Wirkungsgrad von 82,3% entsprach. Den höchsten Wirkungsgrad erzielte *T. atroviride* mit 93,7% bei *I. hispidus*. Hier lag die Infektionsrate nur noch bei 4,8%. Ein ähnlich hoher Wirkungsgrad (91,1%) konnte bei *G. adspersum* festgestellt werden; hier wurde eine Infektionsrate von 7,2% verzeichnet. Der Wirkungsgrad war bei *P. squamosus* mit 62,4% deutlich

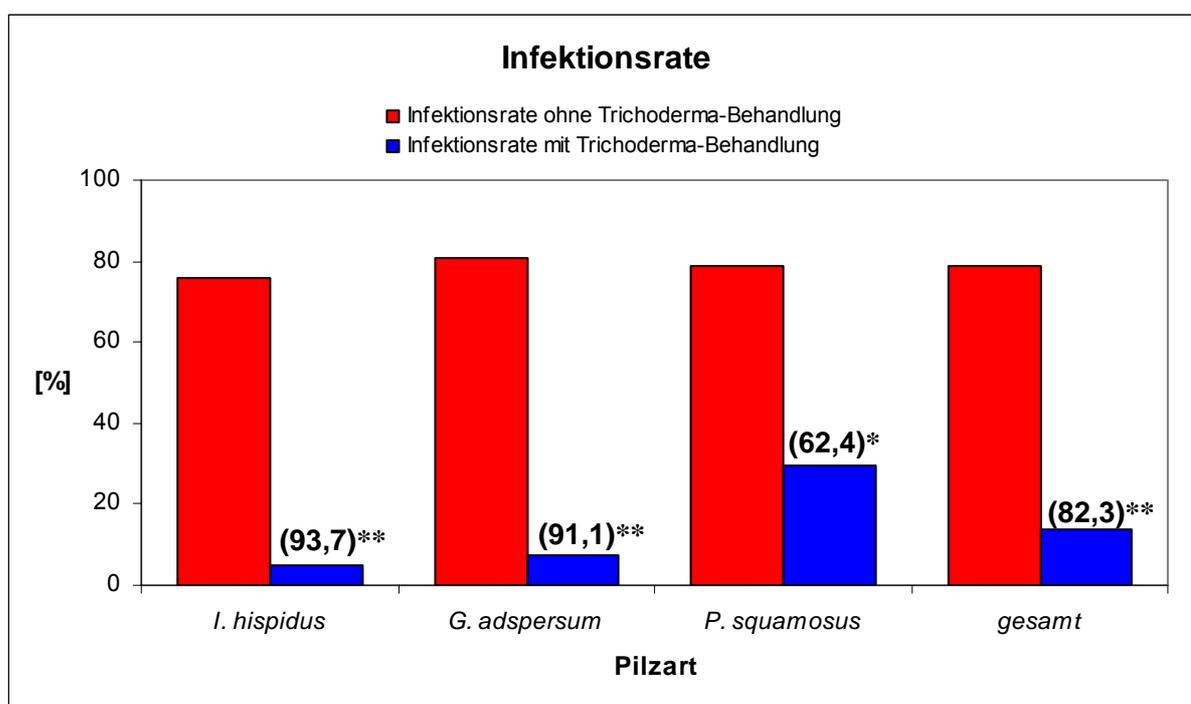
eingeschränkt und dementsprechend lag die Infektionsrate mit 29,7% höher als bei den anderen Holz zerstörenden Pilzen.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass, um die Verbindung zwischen fehlendem Holzersetzer auf den Schnittflächen und *Trichoderma* sp. herzustellen, nur die Wunden ausgewertet wurden, aus denen erfolgreich *T. atroviride* re-isoliert werden konnte.

**Tabelle 35:** Infektionsrate und Wirkungsgrad in [%]

	Infektionsrate ohne <i>Trichoderma</i> -Behandlung	Infektionsrate mit <i>Trichoderma</i> -Behandlung	Wirkungsgrad [%]
<i>I. hispidus</i>	76	4,8	93,7
<i>G. adspersum</i>	81	7,2	91,1
<i>P. squamosus</i>	79	29,7	62,4
<b>Gesamt</b>	<b>78,7</b>	<b>13,9</b>	<b>82,3</b>

Die statistische Varianzanalyse (ANOVA mit Post-Hoc-Tests) ergab, dass die Infektionsraten der Holz zersetzenden Pilze durch die *Trichoderma*-Applikation in allen Fällen signifikant reduziert wurden ( $p \leq 0,05$ ). Die Reduktion der Infektionsraten durch den Antagonisten konnte sogar auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001$  nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme stellt hier *P. squamosus* dar, der auf diesem Niveau keine Signifikanzen aufwies (Abbildung 62).



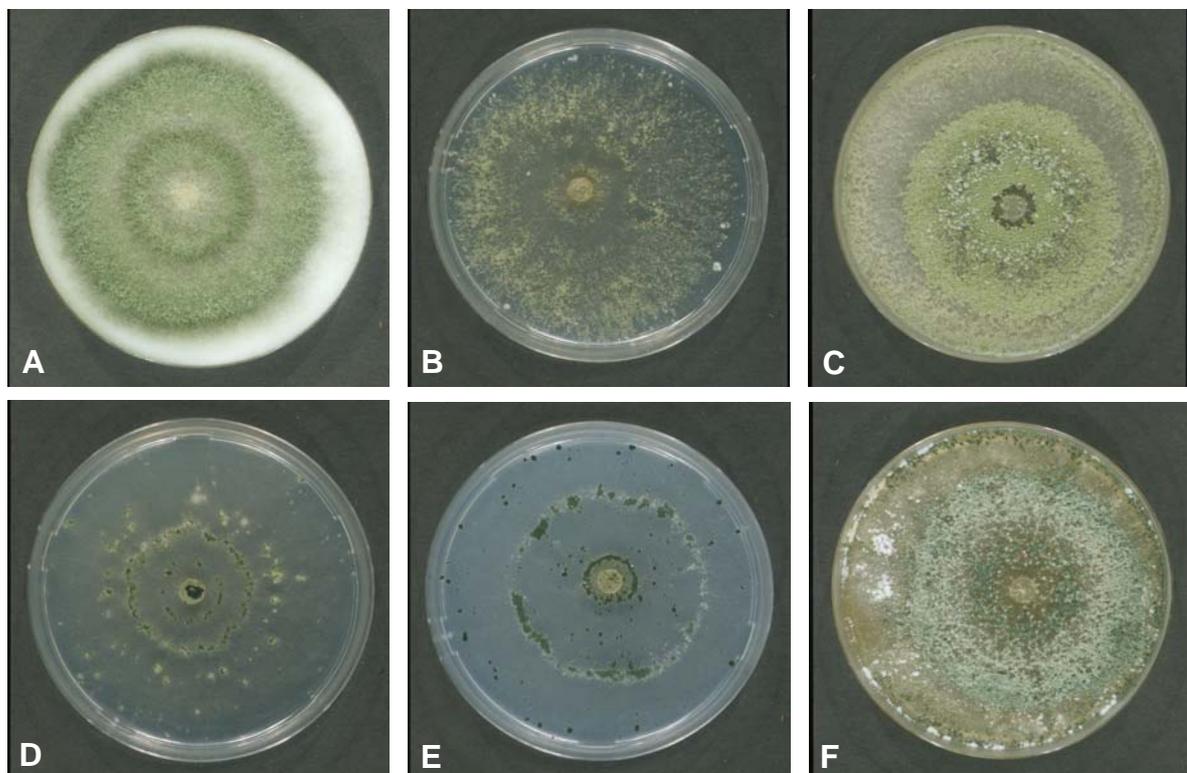
**Abb. 62:** (Zahl) = Wirkungsgrad [%]. Signifikante Reduzierung der Infektionsrate durch die Beimpfung ist mit \* gekennzeichnet. \*=signifikant ( $p \leq 0,05$ ); \*\*=hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ).

### 3.2.3 Pilzidentifikation

Die Pilzidentifikationen hatten zum Ziel, die Gattungsvielfalt auf den Schnittflächen zu bestimmen und zum anderen ein Monitoring des applizierten Antagonisten sowie der inokulierten Holz abbauenden Pilze im Feld zu ermöglichen. Insbesondere musste *T. atroviride* für eine Aussage bezüglich der Persistenz und der protektiven Wirkung exakt auf Artebene (Stammebene) bestimmt und identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde neben der konventionellen, auf makro- und mikromorphologischen Merkmalen basierenden, Methode eine molekularbiologische Pilzidentifikation durchgeführt.

#### 3.2.3.1 Morphologische Charakteristika von *Trichoderma* spp.

Für die Identifikation der *Trichoderma*-Arten dienten die makromorphologischen Merkmale Myzeldichte, Sporulation und Sporenlagerfärbung (Abbildung 63). In Tabelle 36 sind für die eingesetzten *Trichoderma*-Arten diese Merkmale auf verschiedenen Nährmedien (LNA, MEA pH-Wert 5 & 7) bei 25°C aufgeführt. Auffällig ist hierbei die große Variabilität der Ausprägungen und die Abhängigkeit vom jeweiligen Substrat.



**Abb. 63:** *Trichoderma*-Arten in Reinkultur auf verschiedenen Medien. **A:** *T. virens* auf MEA. **B:** *T. fasciculatum* (*strictipile*) auf LNA. **C:** *T. fasciculatum* (*strictipile*) auf MEA. **D:** *T. atroviride* 351.93 auf LNA. **E:** *T. atroviride* 15603.1 auf LNA. **F:** *T. atroviride* 396.92 auf MEA.

**Tabelle 36:** Myzeldichte, Sporulation und Sporenlagerfärbung von *Trichoderma*-Arten auf verschiedenen Nährmedien bei 25 °C

	MEA						LNA					
	pH-Wert 5			pH-Wert 7			pH-Wert 5			pH-Wert 7		
	Farbe	Sporulation	Myzeldichte	Farbe	Sporulation	Myzeldichte	Farbe	Sporulation	Myzeldichte	Farbe	Sporulation	Myzeldichte
<b>T-15603.1</b>	grün weiß	++++ [geklumpt]	++ [locker]	(gelblich) grün weiß	++++ [geklumpt]	++ [locker]	dunkelgrün	+ [ringförmig]	+ [flach]	(dunkel) grün	++ [verteilt- kreisförmig]	+ [flach]
<b>T-351.93</b>	gelblich weiß	+++ [verteilt]	+++ [dicht]	gelblich weiß	++ [verteilt]	+++ [dicht]	dunkelgrün	+ [ringförmig]	+ [flach]	(dunkel) grün	++ [verteilt- kreisförmig]	+ [flach]
<b>T-396.92</b>	grün weiß	++++ [verteilt]	+++ [dicht]	grün weiß	++++ [verteilt]	+++ [dicht]	grün	++ [peripher]	+ [flach]	hellgrün	++ [verteilt]	+ [flach]
<b>T-206040</b>	bläulich grün	+++ [ringförmig]	++ [locker]	grün	+++ [ringförmig]	++ [locker]	grün	++ [verteilt]	+ [flach]	Grün (weißlich)	++ [verteilt]	+ [flach]
<b>T-126.65</b>	grün weiß zoniert	+++ [verteilt]	++++ [kompakt]	grün weiß zoniert	+++ [verteilt]	++++ [kompakt]	grün	+ [verteilt]	+ [flach]	grün	+ [verteilt]	+ [flach]
<b>T-338.93</b>	hellgrün	++++ [verteilt]	++(+) [locker-dicht]	hellgrün (weißlich)	++++ [verteilt]	+++ [dicht]	hellgrün	+ [peripher]	+ [flach]	weißlich	—	+ [flach]

- ++++ Sehr starke Sporulation
- +++ Starke Sporulation
- ++ Schwache Sporulation
- + Sehr schwache Sporulation
- Keine Sporulation
- [ ] Verteilung der Sporenlager auf dem Nährmedium

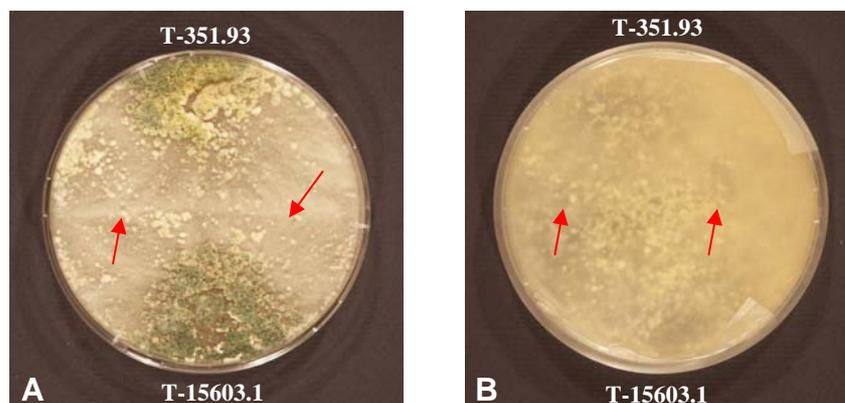
- T-15603.1 *Trichoderma atroviride* Karsten
- T-351.93 *Trichoderma atroviride* Karsten
- T-396.92 *Trichoderma atroviride* Karsten
- T-206040 *Trichoderma harzianum/polysporum* Bissett
- T-126.65 *Trichoderma virens* Miller, Giddens & Foster
- T-338.93 *Trichoderma fasciculatum (strictipile)* Bissett

Neben den makromorphologischen Merkmalen wurden zur näheren Bestimmung von *Trichoderma* spp. auch mikromorphologische Charakteristika herangezogen. Insbesondere waren die Form und Größe der Konidien, Chlamyosporen, Phialiden und Konidiophoren für die Identifikation entscheidend (Abbildung 65). In Tabelle 37 sind beispielhaft einige beobachtete Merkmale der *Trichoderma*-Arten (eigene Studie) im Vergleich mit den Werten aus der Literatur aufgeführt. Wie bereits bei den makroskopischen Merkmalen zu konstatieren, variierten zum Teil die Ausprägungen der mikroskopischen Eigenschaften im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen. Des Weiteren erschwerte die Tatsache, dass die Form und Größe der Bestimmungsmerkmale unter den *Trichoderma*-Arten zum Teil sehr ähnlich waren, eine Identifizierung.

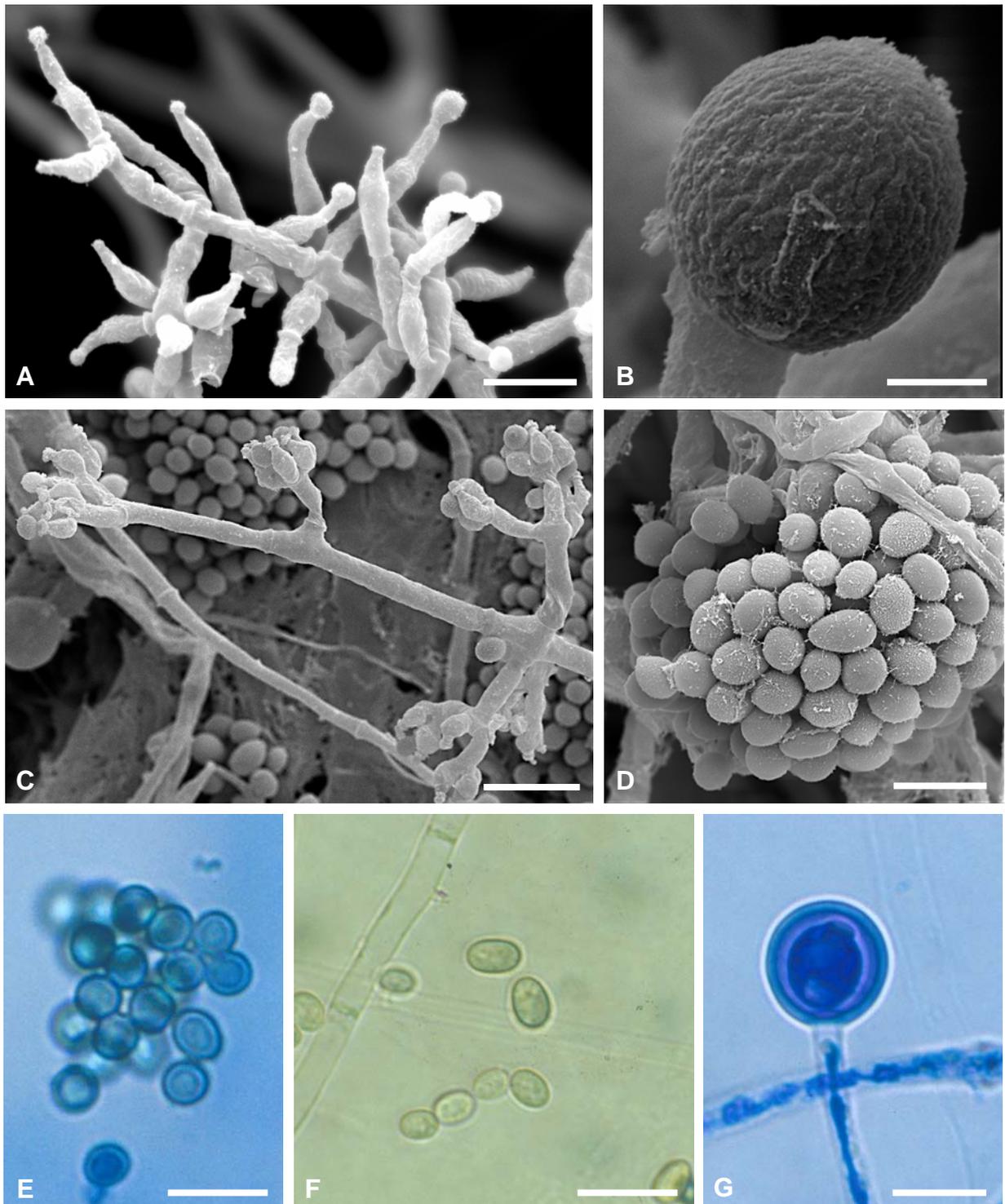
**Tabelle 37:** Vergleich der beobachteten Bestimmungsmerkmale mit denen aus der Literatur

	Konidie		Chlamyospore		Phialide		Konidiophore	
	Studie	Literatur	Studie	Literatur	Studie	Literatur	Studie	Literatur
<i>T. atroviride</i>	rundlich [2,9-2,8]	rundlich [3,2-2,9]	rundlich [5-11]	rundlich [4-12]	einzel [4-10*2,2-3]	einzel [6-12*2,4-3]	kurz [20-55]	kurz [12-60]
<i>T. virens</i>	elongiert [4,8*3,5]	elongiert [4,4*3,5]	elongiert [6-13*6-10]	elongiert [6-12*5-9]	gestaucht [3,7-11*3,1-6,1]	gestaucht [4,5-10*2,8-5,5]	lang [50-260]	lang [30-300]
<i>T. fasciculatum</i> ( <i>strictipile</i> )	oval [3-4*2-3]	oval 2,9-4*2-2,9]	elongiert [8,4*6,7]	elongiert [9*7]	viele [4,1-7*2,4-3,9]	viele [4,2-7,8*2,2-3,5]	[40-170]	[>150]

Zudem kam erschwerend hinzu, dass auf Grund der fehlenden Eignung keine Myzel-Inkompatibilitätstests zur Abgrenzung unterschiedlicher *Trichoderma*-Stämme ein und derselben Art durchgeführt werden konnten (Abbildung 64). Nach der konventionellen Methode der Pilzbestimmung konnten 98,7% der *Trichoderma*-Isolate, die aus den mit *T. atroviride* beimpften Schnittflächen isoliert wurden, als die Art *T. atroviride* identifiziert werden. Bei den restlichen Isolat, welche nicht als die Art *T. atroviride* bestimmt wurden, unterblieb eine genauere Identifikation.



**Abb. 64:** Bei den Inkompatibilitätstests mit unterschiedlichen *Trichoderma*-Stämmen wurden keine Abgrenzungslinien beobachtet. **A:** Vorderseite. **B:** Rückseite

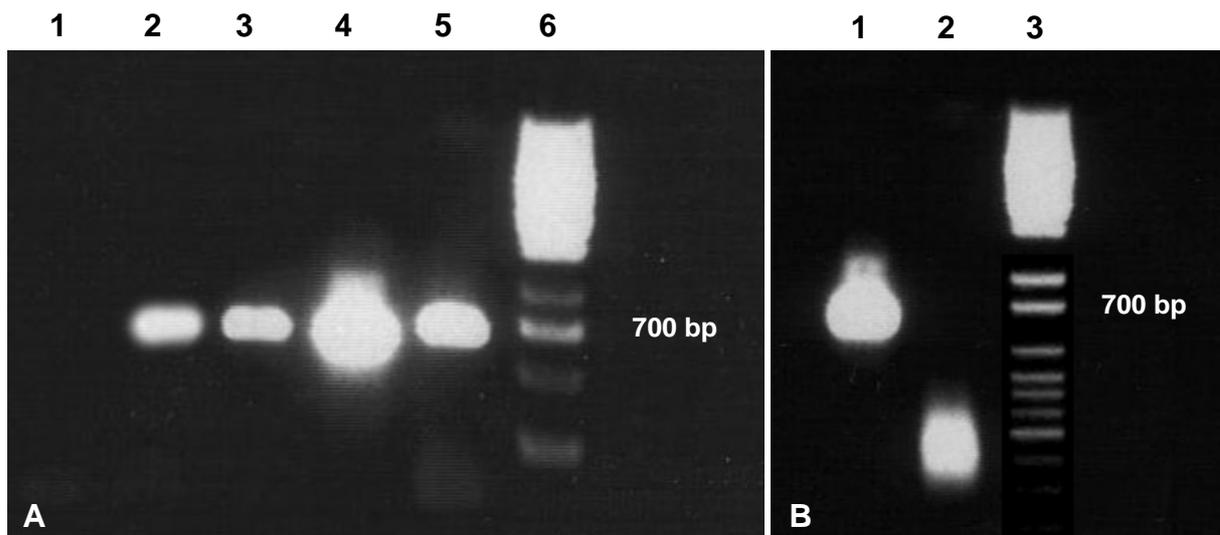


**Abb. 65:** **A:** Stark verzweigte Konidiophore von *T. atroviride* 15603.1 mit wenigen schlanken Phialiden an den Enden (MS = 10µm). **B:** Am Luftmyzel gebildete dickwandige Chlamyospore von *T. atroviride* 15603.1 dient zur Überdauerung bei ungünstigen Umweltbedingungen (MS = 2µm). **C:** Wenig verzweigte Konidiophore von *T. virens* mit am Ende mehreren und gestauchten flaschenförmigen Phialiden (MS = 10µm). **D:** Die Konidien von *T. virens* sind elongiert (MS = 5µm). **E:** Die dünnwandigen Konidien von *T. atroviride* stellen sich, im Gegensatz zu den elongierten Konidien von *T. virens*, rundlich dar (MS = 5µm). **F:** Die Konidien von *T. fasciculatum* (*strictipile*) sind ebenfalls oval (elongiert) (MS = 5µm). **G:** Chlamyospore von *T. atroviride* 352.93 (MS = 5µm).

### 3.2.3.2 Molekularbiologische Charakterisierung

Auf Grund der eingeschränkten Möglichkeiten, anhand von Bestimmungsschlüsseln die Gattung *Trichoderma* spp. auf Artebene zu identifizieren, erfolgte stichprobenartig an den positiven *T. atroviride*-Isolaten zur Verifizierung der Art (Stamm) eine molekulargenetische Identifikation. Zudem wurden die in den Studien eingesetzten und in den künstlichen Inokulationsversuchen applizierten und re-isolierten Holz zersetzenden Pilze ebenfalls einer molekulargenetischen Identifikation unterzogen. Die Charakterisierung der Pilze erfolgte mit unterschiedlichen Methoden (DNS-Sequenzierung, RAPD, Mikrosatelliten). Nachfolgend werden die hierbei erzielten Ergebnisse dargestellt.

Für die DNS-Sequenzierung wurden aus den zu bestimmenden Pilzarten die ITS 1 und 2 Region mittels der PCR vervielfältigt und anschließend vollständig sequenziert (Kapitel 2.5.2.1). In Abbildung 66 sind die erfolgreich erhaltenen PCR-Produkte dieser Region für einige Pilzarten dargestellt. Durch die generierte Sequenz der ITS 1 und 2 Region konnte dann im Zuge einer BLAST-Suche in Gendatenbanken unbekannte *Trichoderma*-Isolate als die applizierte Art *T. atroviride* bestimmt werden. Zudem erfolgte durch diese Methode eine Verifizierung der Arten der in dieser Arbeit eingesetzten Holz abbauenden Pilze. In Abbildung 67 sind die erhaltenen Sequenzen dargestellt.



**Abb. 66:** Ergebnis der Amplifizierung der ITS 1 und 2 Region. **A:** Bei der Kultur von *I. hispidus* wurde kein PCR-Produkt erzeugt (1). *G. adpersum* (2). *G. lipsiense* (3). *P. squamosus* (4). *K. deusta* (5). Gene ruler 50-2100bp (6). **B:** *Trichoderma*-Isolat (1). vollständiges Genom (2). Gene ruler 50-2100bp (3).



TGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTATAAAAAATAGGGGGGTGTTTTA  
CGGCAGGGGACCGGCTCATCTCTACAGGCAGAAATAAAATCTTTACTACGCCTAGAGTGTGAACCGACTCCG  
CCACTAACTTTAAGGAGCTACAGCAAAGAATGCGGTAGGCTCCCAACACTAAGCAACAGAGGCTTAAGGGTT  
GAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCACTAGAACTAATGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATT  
CACTAAATCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCG  
TTGTTGAAAGTTTTAACTTAATTTCCATATAATGATTCAGAATACCATTACTAAACAGAATTTGTTTTTCAGTCC  
ACCGGCAGGTGGCACCCGATCTCTACCGGGTAGGTCTCTCCGGTAGTACCTTCCCCTGATAGGGTACTAT  
AGGATAGGGTCTACAGGGTAGCAAGATGCGACCTGCCTGCCGAGGCAACAGAAGGTAAGTTCACATGGT  
TTAGGAGTTGTAACAACTCTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACGACTT



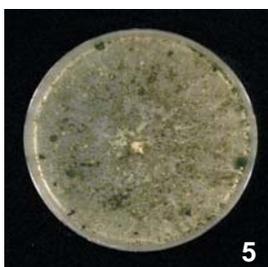
AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGG  
CCTTACGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCGCTCCTACACCTGTGCACCTACTGTGGGTTTACGAGTCCG  
GAAACAGGCCCGTTTATTCCGGCTTGTGGAGCGCACTTGTTCCTGCGTTTATCACAACTCTATAAAGTATT  
AGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTAGCAACGGATCCTTTGGCTCTCGCATCGATGA  
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTT  
GCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAATAAATCTTCAACTTACGAGCTTCTTGGCAG  
GTTTGTAGGGTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGCTTTAAAGGTCGGCTCCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCC  
TTGCGGATCGGGTTGTCGGTGTGATAATGTCTACGCCGTGACCGTGAAGCGTTTGGCAAGCTTCTGACCGTC  
TCGGTATAGAGACAAGTTTTATGACCTCTGACCTCA



AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATGAATAAACCTGGCTTGGTTGATGCT  
GGTCTTTTCGGAGACATGTGCACACCTTGTATCTTTATATCTCCACCTGTGCACCTTTTGTAGACCTGGATT  
AACTTTCCGAGGAACTTGGTTGTGAGGAATTGCTTAATAGGCTTTTCTTGTAGTTCCAGGGCTATGTTTT  
ATATACACCTTAAAGATGTAACAGAATGTCATTATTAGGCTTAATGCCTTATAAATAATATAAATTTTCAGCA  
ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGCATTA  
AATTCTCAACCTTTTAACTTTTTGGTTAGTAAGTGGATTGGAAGTGGGGGCATGTTGGTTTCTTATTGAAA  
TAACTCCCCTGAAATGCATTAGCTGGTTGCCTTGTGCGAACATGTCTATTGGTGTGATAAATATCTAGCCCGT  
GGGCTATTTGCCGTTTATAGCACTGCTTATAATCGTCTGTTTATTAGACAATATATGACAATTTGACCTCAA  
TCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCA



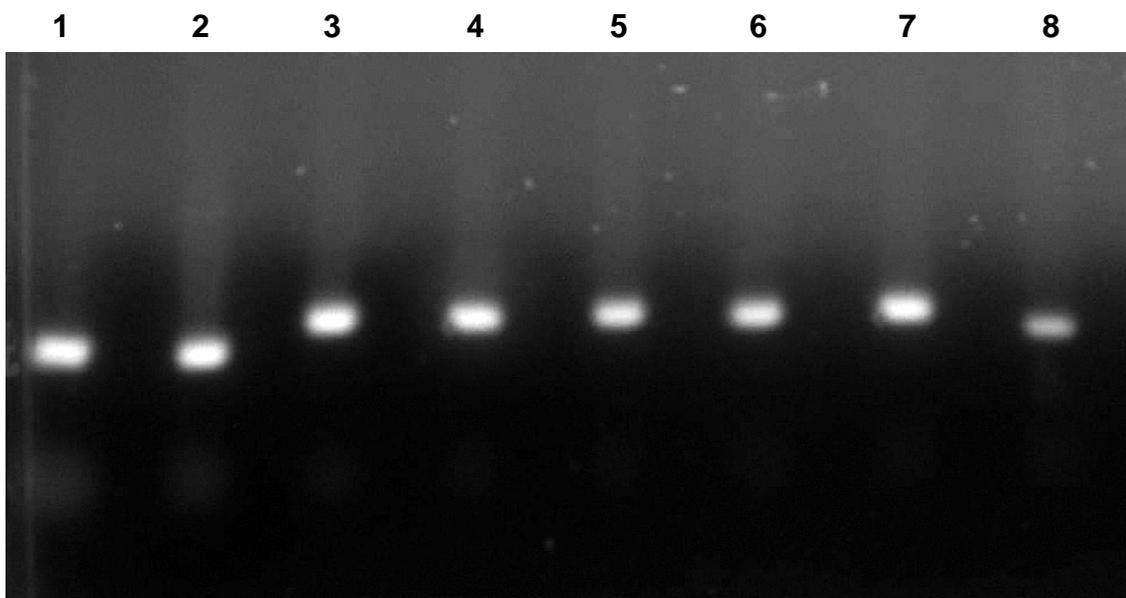
AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGTTTTGACTGGGTTGTAGCTGG  
CCTTACGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCGCTCCTACACCTGTGCACCTACTGTGGGTTTACGAGTCCG  
GAAACAGGCCCGTTTATTCCGGCTTGTGGAGCGCACTTGTTCCTGCGTTTATCACAACTCTATAAAGTATT  
AGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTAGCAACGGATCCTTTGGCTCTCGCATCGATGA  
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTT  
GCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTCAATAAATCTTCAACTTACGAGCTTCTTGGCAG  
GTTTGTAGGGTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGCTTTAAAGGTCGGCTCCTTAAATGCATTAGCTTGGTTCC  
TTGCGGATCGGGTTGTCGGTGTGATAATGTCTACGCCGTGACCGTGAAGCGTTTGGCAAGCTTCTAACCCTG  
TCGGTATAGAGACAAGTTTTATGACCTCTGACCTCA



TAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACAGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAAT  
GTGAACCATACCAAATGTTGCCTCGGGGGGTGCGCCCGGGTGCCTGCGACGCCCGGAACAGGGCGC  
CCGCCGAGGGACCAACCAAATCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTTCTTACAGCTCTGAGCAAAA  
ATTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  
ATAAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG  
GCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTGGCGGTTGGGGACCTCGG  
GAGCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCTGCGCAGTAGT  
TTGCACAACTCGCACCGGGAGCGGGCGGTCCAGTCCGTAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCG  
GATCAGGTAGGAATACCGCTGAACCTAAGCATATCAAAGCCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAG  
TGGATCCGAGCTCGGTACCGCTTGGCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCGTGTGAAATGTTATCCGCTC  
ACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAGTGAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAAGTAACTCA

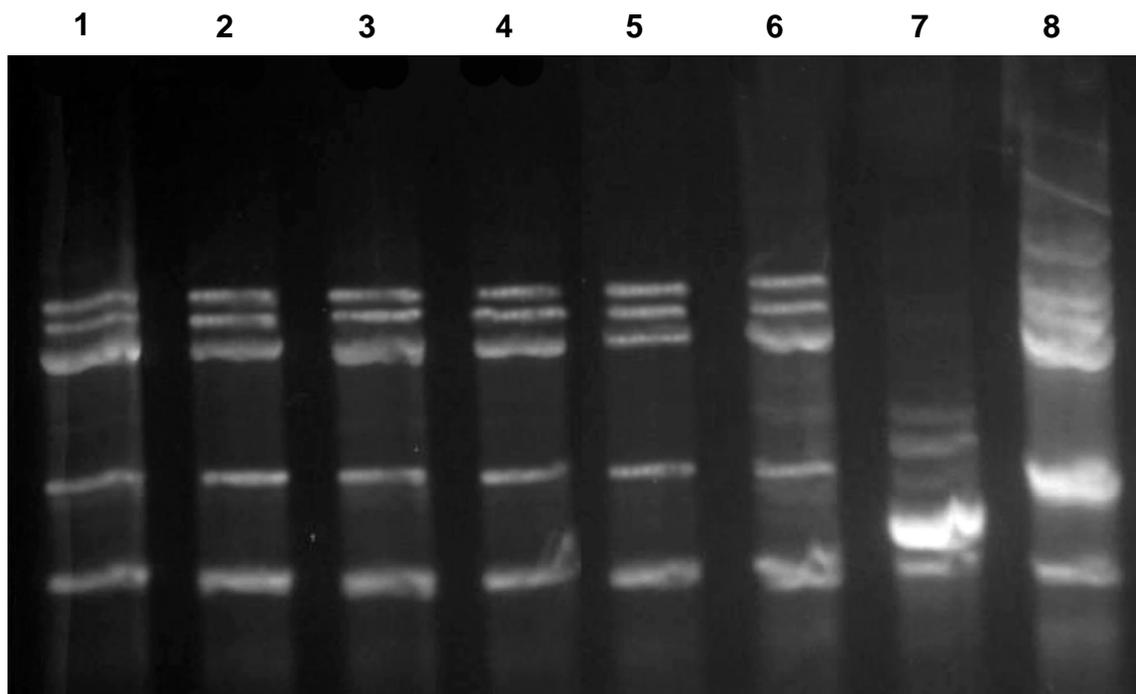
Abb. 67: Sequenz der ITS 1 und 2 Region der Pilzarten: 1 = *Kretzschmaria deusta*. 2 = *Ganoderma adpersum*. 3 = *Polyporus squamosus*. 4 = *Ganoderma lipsiense*. 5 = *Trichoderma atroviride* 15603.1.

Für eine Unterscheidung auf Stammebene wurde eine Mikrosatelliten-PCR (MP-PCR) durchgeführt (Kapitel 2.5.2.3). In Abbildung 68 ist die Gelelektrophorese der MP-PCR abgebildet. Man erkennt hier, dass wegen fehlender charakteristischer Banden eine Aussage bezüglich der Stammunterscheidung von *T. atroviride* nur bedingt möglich war. Tendenziell wies einer der 3 *T. atroviride*-Stämme (3) eine andere Bande auf, als die restlichen zwei Stämme (1 & 2). Zudem ließen die nach 30 Monaten isolierten *Trichoderma*-Isolate (4, 5, 6, & 7) die gleiche Bande wie die applizierte *Trichoderma*-Art (3) erkennen. Insgesamt wurde aber auf Grund der stark eingeschränkten Implementierbarkeit diese Methode nicht weiter verfolgt.

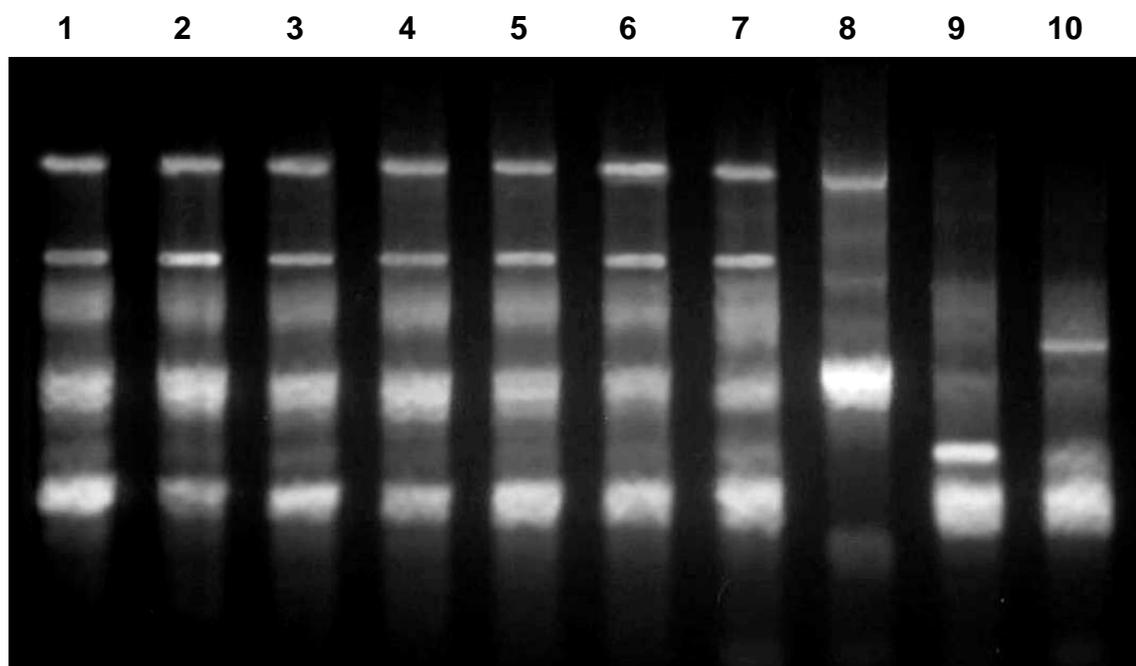


**Abb. 68:** MP-PCR. 1 = *T. atroviride* 352.93. 2 = *T. atroviride* 396.92. 3 = *T. atroviride* 15603.1. 4-7 = Aus behandelten Schnittflächen isolierte *Trichoderma*-Isolate. 8 = *T. virens*.

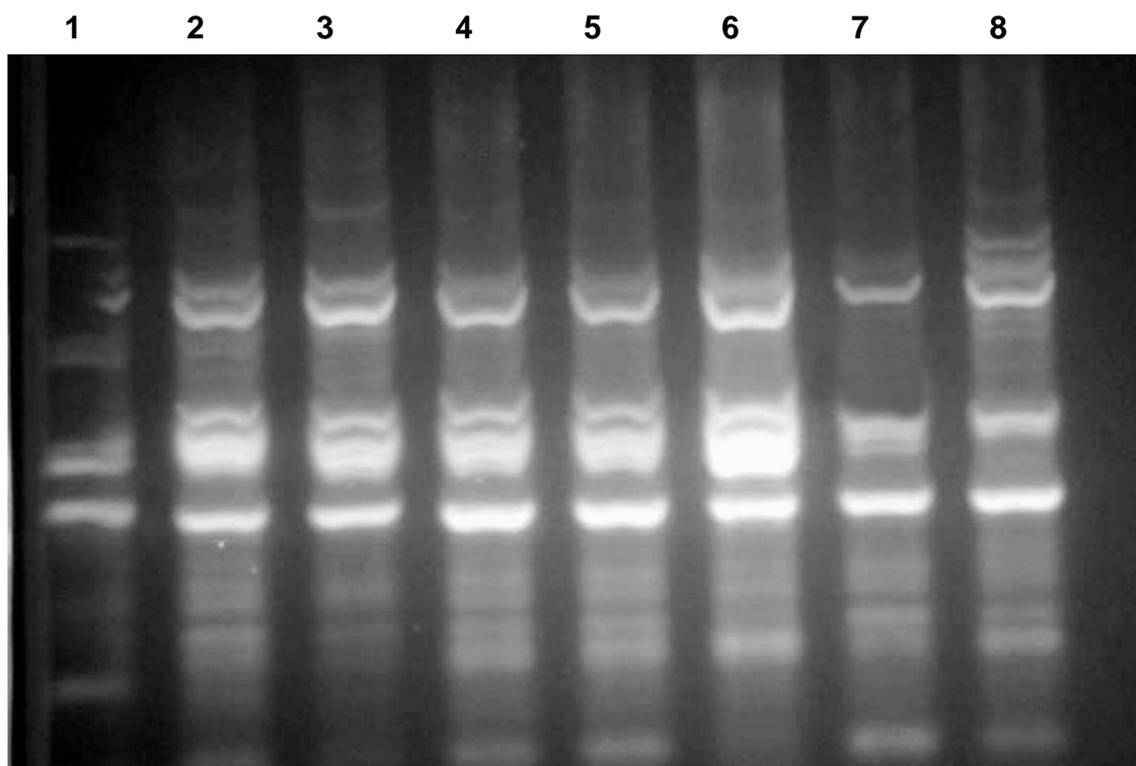
Die Methode RAPD-PCR (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) lieferte sehr gute Ergebnisse bei der Verifizierung der isolierten *Trichoderma*-Isolate (Kapitel 2.5.2.2). Durch die generierten charakteristischen Bandenmuster war es möglich, in kurzer Zeit eine Aussage darüber zu geben, ob es sich bei den aus den beimpften Wunden isolierten *Trichoderma*-Isolaten um die applizierte Art *T. atroviride* handelte. In Abbildungen 69-72 sind die Ergebnisse der RAPD-PCR für die Isolate der Standorte Ludwigshafen und Straßburg nach den Inkubationszeiten 18, 24 und 30 Monaten dargestellt. In allen Fällen erwiesen sich, auch noch nach 30 Monaten Inkubationszeit, die aus den beimpften Schnittflächen isolierten *Trichoderma*-Isolate als die applizierte Art *T. atroviride* (gleiches Bandenmuster). Hingegen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Isolaten aus den Kontrollwunden (unbehandelte Fläche) um andere Arten handelte (Bandenmuster differiert). Eine Unterscheidung von *T. atroviride* auf Stammebene war nur bedingt möglich.



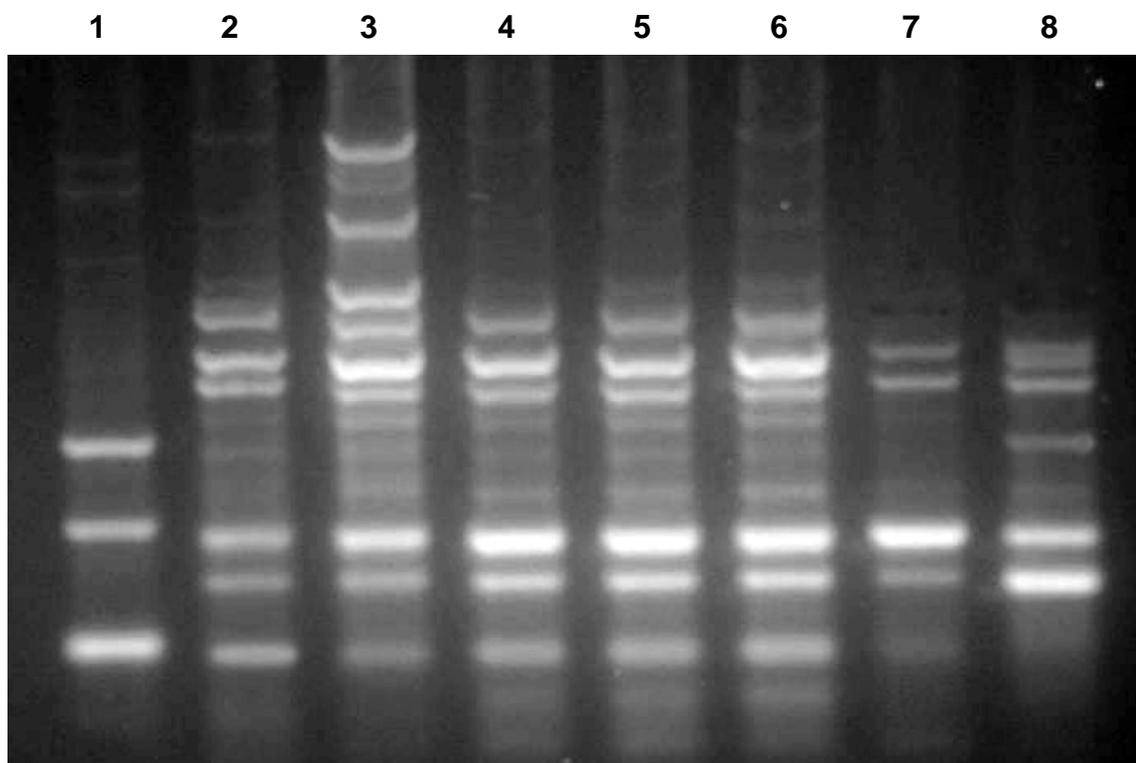
**Abb. 69:** Nach 18 Monaten Inkubationszeit: 1 = Die applizierte Art *T. atroviride* 15603.1. 2-6 = *Trichoderma*-Isolate aus den beimpften Schnittflächen am Standort Ludwigshafen und Straßburg. 7 = *T. virens*. 8 = *T. fasciculatum* (*strictipile*).



**Abb. 70:** Nach 24 Monaten Inkubationszeit: 1 = Die applizierte Art *T. atroviride* 15603.1. 2-7 = *Trichoderma*-Isolate aus den beimpften Schnittflächen am Standort Ludwigshafen und Straßburg. 8-10 = *Trichoderma*-Isolate aus unbehandelten Schnittflächen (Kontrolle). Die Bandenmuster von 2-7 sind deckungsgleich mit dem Muster von 1. Die Isolate aus den Kontrollwunden ließen hingegen ein anderes Muster erkennen.



**Abb. 71:** Nach 30 Monaten Inkubationszeit: 1 = *T. fasciculatum (strictipile)*. 2 = Die applizierte Art *T. atroviride* 15603.1. 3 = *T. atroviride* 396.92 4-6 = *Trichoderma*-Isolate aus den beimpften Schnittflächen am Standort Ludwigshafen und Straßburg. 7+8 = *Trichoderma*-Isolate aus unbehandelten Schnittflächen (Kontrolle). Primer 238



**Abb. 72:** Nach 30 Monaten Inkubationszeit: 1 = *T. fasciculatum (strictipile)*. 2 = Die applizierte Art *T. atroviride* 15603.1. 3 = *T. atroviride* 396.92 4-6 = *Trichoderma*-Isolate aus den beimpften Schnittflächen am Standort Ludwigshafen und Straßburg. 7+8 = *Trichoderma*-Isolate aus unbehandelten Schnittflächen (Kontrolle). Primer 203

## 4. DISKUSSION

### 4.1 *IN VITRO* SCREENING ZUM ANTAGONISTISCHEN POTENZIAL VON *TRICHODERMA* SPP.

Für die Selektion eines potenten Antagonisten werden sehr häufig *in vitro*-Screeningmethoden angewendet. Mit Hilfe dieser Testverfahren ist es mit vertretbarem Aufwand möglich, eine systematische Untersuchung mehrerer Arten gleichzeitig zu bewältigen. Allerdings gibt es zahlreiche Autoren, die diese Vorgehensweise kritisieren, da nach ihren Studien keine generelle Beziehung zwischen der Fähigkeit eines Stammes, ein Pathogen *in vitro* zu hemmen, und der Krankheitsunterdrückung *ad planta* besteht (MERCER & KIRK, 1984a,b; KLOEPPER, 1991; CAMPBELL, 1994; ELSHERIF & GROSSMANN, 1994). Demgegenüber ermittelten u.a. KEMPF (1988) SCHOEMANN et al. (1994), WODZINSKI et al. (1994), BROWN & BRUCE (1999) und BROWN et al. (1999), dass ein enger Zusammenhang zwischen *in vitro*-Hemmwirkung und der *ad planta*-Wirksamkeit der untersuchten Antagonisten existiert, bei KEMPF (1988) war der Zusammenhang sogar hochsignifikant. Derartige divergierende Beurteilungen sind sicherlich auf die Verschiedenartigkeit der untersuchten Systeme und Wirkmechanismen zurückzuführen. Da keine endgültigen Aussagen bezüglich der Aussagekraft der *in vitro* Screeningmethoden existieren wurde auf Grund der oben genannten Vorteile in der vorliegenden Arbeit mittels dieser *in vitro* Tests ein potenter (virulenter) *Trichoderma*-Stamm mit einem hohen antagonistischen Potenzial gegen Holz abbauende Pilze selektiert. Ein weiterer Vorteil der *in vitro*-Tests lag in der Determinierung und Abschätzung der Faktoren, die das antagonistische Potenzial beeinflussen. Dies führte zudem zu einem besseren ökologischen Verständnis. Als Ergänzung wurden zusätzlich mit dem vorselektierten *Trichoderma*-Stamm *ad planta* Studien durchgeführt.

#### 4.1.1 Dualkultur-Tests

Der Mycoparasitismus ist, neben Antibiosis und Konkurrenz um Nahrung und Raum, einer der wichtigsten Mechanismen im Antagonismuskomplex der Gattung *Trichoderma* (PAPAVIZAS, 1985; CHET, 1987; MONTE, 2001; HOWELL, 2003). Das

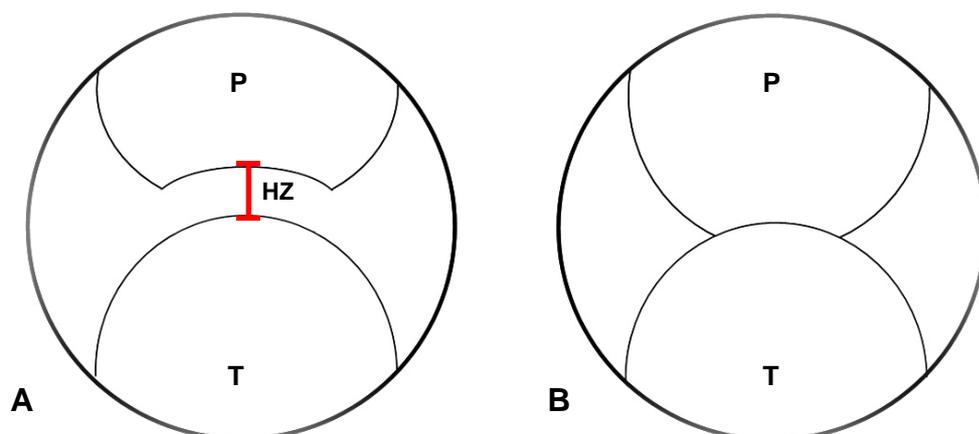
Potenzial von *Trichoderma* spp., die in dieser Arbeit eingesetzten Holz abbauenden Pilze zu parasitieren und abzutöten, wurde in den Dualkultur-Tests unter dem Einfluss unterschiedlicher Substrate (Nährmedien) und der damit verbundenen unterschiedlicher Nährstoffversorgung sowie pH-Werte überprüft. Für eine bessere Aussagekraft und zur Optimierung der Selektion eines potenten (virulenten) *Trichoderma*-Stammes, ist nach SRINIVASAN et al. (1992) bei der Durchführung der Dualkultur-Tests mit Holz zersetzenden Pilzen zu berücksichtigen, dass das verwendete Medium dem späteren Zielsubstrat Holz in der Zusammensetzung ähnelt. Aus diesem Grund wurde neben einem nährstoffreichen Nährmedium (MEA) ein nährstoffarmes Medium (LNA) verwendet, welches mit einem Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis von ca. 410:1 annähernd dem Nährstoffgehalt von Holz (C:N 350:1 bis 1250:1) entspricht (MERRILL & COWLING, 1966; SRINIVASAN et al. 1992). Zusätzlich wurde bei der Planung des Versuchsaufbaus der Dualkultur-Tests, zur Verbesserung der Endauswertung, die Methoden von HIGHLEY & RICARD (1988) und NAÁR & KECSKÉS (1998) in modifizierter Form berücksichtigt. Dadurch war es zum einen möglich, eine konkrete Aussage bezüglich der letalen Wirkung von *Trichoderma* spp. zu treffen, und zum anderen das Vorhandensein des Antagonisten, auch bei einem Fehlen der typischen Sporenlager auf den Kulturen der Holz abbauenden Pilze, zu überprüfen.

Die Ergebnisse und die statistische Auswertungen der Dualkultur-Tests ließen im Schnitt ein antagonistisches Potenzial der eingesetzten *Trichoderma*-Arten (Stämmen) erkennen (MERCER & KIRK, 1984a; HIGHLEY & RICARD, 1988; BRUCE & HIGHLEY, 1991; SRINIVASAN et al. 1992; HIGHLEY, 1997). Allerdings wurden hierbei signifikante Unterschiede zwischen den *Trichoderma*-Arten ermittelt. So erzielte *T. virens* das beste Ergebnis, gefolgt von *T. atroviride* 15603.1 und *T. atroviride* 351.93. Das signifikant schlechteste Ergebnis wurde bei *T. fasciculatum* verzeichnet. Ebenfalls konnte ein entscheidender (signifikanter) Einfluss der Nährmedien auf das antagonistische Potenzial ermittelt werden. Im Durchschnitt war die Parasitierungsrate auf dem nährstoffreichen Medium höher als auf dem Medium LNA. Eine signifikante Wirkung der unterschiedlichen pH-Werte konnte nur auf dem nährstoffarmen Medium (LNA) festgestellt werden. Hier wurde das antagonistische Potenzial der *Trichoderma*-Arten durch eine Einstellung des pH-Wertes im neutralen Bereich signifikant erhöht. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit den Beobachtungen von EJECHI & OBUEKWE (1996), BANDYOPADHYAY & DUTTA (2000) und

EJECHI (2003), die in ihren Studien zeigen konnten, dass ein pH-Wert im fast neutralen Bereich (6) die Effektivität von *T. viride* erhöhte, hingegen das Wachstum von Holz zersetzenden Pilzen minderte. Bereits KAARIK (1974) wies darauf hin, dass Holz abbauende Pilze ihr Wachstumsoptimum bei einem pH-Wert 4-5 besitzen, dagegen durch einen pH-Wert im neutralen Bereich gehemmt werden.

Bei einer Analyse der Holz zersetzenden Pilze in Bezug auf die Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber *Trichoderma* spp. ergab sich, dass *Kretzschmaria deusta* die signifikant höchste Sensitivität zeigte, während *Polyporus squamosus* und *Ganoderma lipsiense* sich als äußerst resistent erwiesen. Die beiden *Inonotus hispidus*-Stämme und *Ganoderma adpersum* nahmen hier eine Zwischenstellung ein.

Interessant war die Tatsache, dass es in den durchgeführten Dualkultur-Tests zwischen *Trichoderma* sp. und Holzzer-setzer in keinem Fall zu einer langfristigen Hemmzone kam. Diese wird durch die Produktion nichtvolatiler und volatiler antibiotischer Substanzen hervorgerufen und wurde u. a. bei DENNIS & WEBSTER (1971a,b), HOWELL (1998) und WILKINS et al. (2003) beobachtet. In Abbildung 73 ist die durch Antibiosis verursachte Hemmzone grafisch skizziert. Stattdessen konnte zwar in allen Fällen ein Hyphen-Kontakt zwischen *Trichoderma* sp. und Holz zersetzendem Pilz beobachtet werden, allerdings waren nicht alle *Trichoderma*-Arten in der Lage, die Wirte zu überwachsen und zu parasitieren.



**Abb. 73:** **A:** Durch volatile und nichtvolatile Substanzen hervorgerufene Hemmzone [HZ] zwischen *Trichoderma* sp. [T] und Holz abbauendem Pilz [P] (Antibiosis). **B:** In den durchgeführten Dualkultur-Tests wurde in allen Fällen ein physischer Kontakt zwischen *Trichoderma* sp. [P] und Holzzer-setzer [H] beobachtet.

So deutet vieles darauf hin, dass der Erstkontakt entscheidet, ob es zu einer Parasitierung des Wirtsmyzels durch *Trichoderma* sp. kommt. Neuere Studien konnten belegen, dass, noch bevor die Myzelien der Pilze interagieren, kleinere Mengen an extrazellulären Exochitinasen von *Trichoderma* spp. ausgeschieden werden (KULLNIG et al. 2000; BRUNNER et al. 2003; HARMAN, 2006). Die Diffusion dieser Enzyme bewirkt eine Lösung von Zellfragmenten aus dem Wirt. Diese Zellfragmente wiederum induzieren die Produktion weiterer Enzyme und lösen eine Kaskade von physiologischen Veränderungen bei *Trichoderma* spp. aus, eingeschlossen eine Steigerung des Wachstums (MACH et al. 1999; ZEILINGER et al. 1999; VITERBO et al. 2003; WOO et al. 2006).

Bei den Proben, bei denen es zu einer Parasitierungsphase zwischen *Trichoderma* sp. und Holz abbauenden Pilz gekommen ist, gewährten die licht- und rasterelektronenmikroskopischen Studien einen Einblick in die parasitären Mechanismen. Hier konnte ein gezieltes Hyphenwachstum in Richtung des Zielwirts beobachtet werden, was auf eine chemotrophische Aktivität schließen lässt. Der Chemotrophismus von *Trichoderma* spp. wurde bereits von CHET et al. (1981) beschrieben. Die Hyphen von *Trichoderma* spp. wuchsen und verzweigten sich auf eine atypische Weise entlang des Myzels der Wirte, um die Kontaktfläche zu vergrößern (CHET, 1990). Zudem konnten appressorien-ähnliche Strukturen sowie eine Hakenbildung beobachtet werden, die fest an der Zellwand hafteten (ELAD et al. 1983a). Ein Eindringen in das Myzel der Pathogene erfolgte mittels kleiner und dünner Penetrationshyphen. Ein weiterer typischer Mechanismus ist das Umwickeln der Hyphen (Coiling), wie es ELAD et al. (1983b & 1987) bei *Rhizoctonia solani* beobachtete. Dieses Coiling konnte hier nur ansatzweise verzeichnet werden. MURMANIS et al. (1988) konnte ebenfalls zwischen *T. harzianum*, *T. polysporum* und Holz zerstörenden Pilzen nur vereinzelt und in schwacher Form ein Coiling der Hyphen beobachten. Bei der Parasitierungsphase ist die Produktion und Aktivität verschiedener hydrolytischer Enzyme, wie  $\beta$ -1,3-Glucanasen, Endo- und Exochitinasen, Cellulasen, Proteasen und Lipasen zum Abbau der Zellwände von großer Bedeutung (HÜTTERMANN & CWIELONG, 1982; SAHAI & MANOCHA, 1993; LORITO et al. 1993; HARAM et al. 1996; BENÍTEZ et al. 1998; CHET et al. 1998, ELAD & KAPAT, 1999; EL-KATATNY et al. 2000; ROCO & PÉREZ, 2001; DE MARCO et al. 2003; LIMÓN et al. 2004). Der Mycoparasitismus war mit dem kompletten Zellwandabbau und Efflux des Cytoplasmas beendet.

#### 4.1.1.1 Diskussion zur Probenvorbereitung für REM

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie war es möglich, Bilder von großer Tiefenschärfe und hohem Auflösungsvermögen zu generieren und somit während der Parasitierungsphase die entscheidenden Mechanismen zu beobachten (SCHMIDT, 1994). Eine zentrale Rolle hierbei nahm die Probenaufbereitung ein, da sie einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Präparate hatte. So wurden für eine Betrachtung der Objekte im Hochvakuum die Proben auf 4 unterschiedliche Arten aufbereitet (Kapitel 2.4). Zudem blieben für das Niedervakuum einige Präparate gänzlich unbehandelt (SCHMIDT, 1994; BILLY, 2000). Aus Tabelle 38 ist ersichtlich, dass sich die Methoden unterschiedlich zur Pilzmyzelaufbereitung eigneten.

**Tabelle 38:** Vergleich der Methoden zur Präparataufbereitung für die REM

	<b>Beobachtung</b>	<b>Eignung</b>
<b>Luftrocknung</b>	Myzel kollabiert	ungeeignet
<b>Hexamethyldisilazane</b>	fragile Strukturen beobachtbar	geeignet
<b>Kritisch-Punkt-Trocknung</b>	Intakte Formen	sehr geeignet
<b>Gefriertrocknung</b>	Myzel-Deformationen	(un-)geeignet
<b>Niedervakuum</b>	Keine Tiefenschärfe möglich	eingeschränkt geeignet

Eine detaillierte Betrachtung auch von fragilen Strukturen erlaubte die vorherige Behandlung der Präparate mit Hexamethyldisilazane (HMDS) und die Kritisch-Punkt-Trocknung (KING & BROWN, 1983; HONEGGER, 1985; TIEDT et al. 1987; MEYER & PLASKOWITZ, 1989; CHISSOE et al. 1994; MOUSSA, 2002). Dagegen waren die Methoden der Luftrocknung und Gefriertrocknung weitestgehend ungeeignet. In Zukunft sollte bei der Gefriertrocknung eine vorherige Fixierung der Proben erfolgen, damit ließen sich ggf. die Artefaktbildungen und Kollabierungen reduzieren. Grundsätzlich ist die Betrachtung von biologischen Präparaten im Niedervakuum eine gute Alternative, da eine langwierige Aufbereitung der Proben entfällt (BILLY, 2000). Einzige Einschränkung hierbei ist, dass nur größere Objekte (>50µm) mit ausreichender Tiefenschärfe beobachtet werden können. Um die mycoparasitischen Aktivitäten (<10µm) zu beobachten, war eine größere Tiefenschärfe von Nöten. Um aber ein schärferes Bild und eine bessere Auflösung zu erhalten, musste das Vakuum im Probenraum erhöht werden, was wiederum zur Folge hatte, dass das Myzel und andere fragile Strukturen kollabierten.

#### 4.1.2 Antibiotische Substanzen

Antibiosis umfasst die Bildung antifungisch wirksamer Antibiotika, die schon in geringen Konzentrationen das Wachstum oder den Metabolismus von Organismen hemmen (HOWELL, 1998). Die Produktion solcher Stoffwechselprodukte mit einer antibiotischen Wirkung wurde erstmals durch WEINDLING (1934) festgestellt und beschrieben. Die Wirksamkeit von *Trichoderma* spp. auf das Myzelwachstum zahlreicher Pilze durch das Ausscheiden von fungiziden Substanzen wurde durch DENNIS & WEBSTER (1971a,b) im großen Umfang untersucht. In den letzten Jahren stieg das Interesse, die volatilen (flüchtigen) Stoffwechselprodukte (volatile organic compounds VOC) zu isolieren und zu bestimmen sowie die Wirksamkeit gegen Holz zersetzende Basidiomyceten zu testen (MORRELL, 1990; SCHOEMAN et al. 1996; BRUCE et al. 2000; HUMPHRIS et al. 2001). Neben zahlreichen Stoffen und Stoffgruppen (wie Peptiden), wird insbesondere das 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6-PP), welches durch ein Kokosnuss-ähnliches Aroma charakterisiert ist, für die Hemmwirkung verantwortlich gemacht (CUTTLE et al. 1986; SCARSELLETTI & FAULL, 1994; COONEY et al. 1997a,b; COONEY & LAUREN, 1998; PEZET et al. 1999; ANDRIAMIALISOA et al. 2004; GALINDO et al. 2004; SEUNG-UK et al. 2005). Da die Antibiosis im Antagonismuskomplex von *Trichoderma* spp. eine zentrale Rolle einnimmt und auf Grund der Tatsache, dass in den Dualkultur-Tests keine Antibiosis zwischen *Trichoderma* spp. und den Holz zersetzenden Pilze beobachtet werden konnte, wurden in einem eigens angelegten *in vitro* Versuch die Ausscheidung und Wirksamkeit flüchtiger Verbindungen getestet. Bei der Auswertung konnte im Durchschnitt ein Ausscheiden von antibiotischen flüchtigen Verbindungen in Form einer signifikanten Wachstumshemmung der Holzzersetzer detektiert werden. Allerdings differiert die Zusammensetzung und Wirkung der VOCs zwischen den *Trichoderma*-Arten und –Stämmen erheblich. Es konnten auch nur bei 3 der 6 eingesetzten Arten eine signifikante Hemmung verzeichnet werden. Interessant hierbei war, dass bei diesen Kulturen ein Kokosnuss-ähnliches Aroma festgestellt werden konnte.

Im Gegensatz zu WHEATLEY et al. (1997) und MCAFFEE & TAYLOR (1999) wurde bei dieser Versuchsanordnung kein signifikanter Einfluss des Substrats (MEA & LNA) auf die Produktion und Effektivität der von *Trichoderma* spp. emittierten VOCs festgestellt. Nach BRUCE et al. (1996) ist zudem das Alter der *Trichoderma*-Kulturen entscheidend, ob es zu einer Hemmung kommt und wie stark diese ausfällt. Er

verzeichnete die größte Wirkung bei 1-2 Wochen alten Kulturen. SCHOEMAN et al. (1996) ermittelte zudem eine differierende Wirkung der VOCs von *T. harzianum* bei 2 unterschiedlichen Temperaturen. Neben dem Alter der Kultur, der *Trichoderma*-Art (Stamm), Temperatur und ggf. dem Substrat ist auch der Zielorganismus für die Wirkung der VOCs entscheidend. So konnte eine ausgeprägte Sensitivität der flüchtigen Verbindungen bei beiden *I. hispidus*-Stämmen, *G. adspersum* und mit Einschränkungen auch bei *P. squamosus* festgestellt werden, hingegen erwiesen sich *K. deusta* und *G. lipsiense* als äußerst resistent.

#### 4.1.3 Interaktionsstudien an Platanenholz

Um die *in vitro*-Tests zum antagonistischen Potenzial von *Trichoderma* spp. gegen Holz abbauende Pilze zu intensivieren, wurden Interaktionsstudien an Platanenholz (*Platanus x hispanica*) nach dem EUROPEAN STANDARD EN 113 (1996) durchgeführt. Die Auswahl der Art Platane erfolgte zum einen wegen bereits zahlreicher durchgeführter Studien an anderen Baumarten (HOLDENRIEDER, 1984; MERCER & KIRK, 1984a; HIGHLEY & RICARD, 1988; HIGHLEY 1997; CANESSA & MORRELL, 1997; BROWN & BRUCE, 1999; FOX, 2003) und auf Grund der großen Bedeutung der Platane (Stresstoleranz) für urbane Bereiche (MALEK et al. 1999). Im Focus der Auswertung stand die Besiedlung des Substrates Holz durch eine applizierte Sporenlösung von *Trichoderma* spp., die protektive Schutzwirkung gegen einen Holzabbau und die Beeinflussung der Entwicklung auf dem Substrat Holz bzw. der Schutzwirkung durch eine Zugabe von Glucose und Harnstoff.

Die gewonnenen Ergebnisse der Darr-Gewichtsverlustmessungen standen weitgehend im Einklang mit den makroskopischen Beobachtungen und konnten zudem durch die histologischen Studien verifiziert werden.

Nach der 18-wöchigen Inkubationszeit ließen die Resultate erkennen, dass mit der *Trichoderma*-Behandlung der Gewichtsverlust (Holzabbau), verursacht durch die Holz zersetzenden Pilze, nicht gänzlich gestoppt werden konnte. Dies ist einerseits durch den durch *Trichoderma* spp. selbst hervorgerufenen Gewichtsverlust, verursacht durch den Abbau leicht verfügbarer Nährstoffe (bspw. Cytoplasma) und Hoftüpfel (Kapitel 4.1.3.1) zu erklären (KUBICEK-PRANZ, 1998), und andererseits durch das Versuchsdesign. So wurde das Holz mit der Sporenlösung behandelt und auf bereits mit den Holz zersetzenden Pilzen vorinokulierte Petrischalen gelegt. Dies

hatte zur Folge, dass die Holzzersetzer einen zeitlichen Vorsprung für die Entwicklung hatten und über ein äußerst hohes Inokulumpotenzial verfügten, welches wiederum entscheidend für die Aggressivität der Pilze war (REDFERN & FILIP, 1991; SCHLÖSSER, 1993). Im Schnitt wurde aber eine hochsignifikante Reduzierung des Gewichtsverlustes (Holzabbau) durch eine Vorbehandlung des Holzes mit einer Sporenlösung von *Trichoderma* spp. erzielt (BRUCE et al. 1991). Zudem konnte die Effektivität der protektiven Wirkung von *Trichoderma* spp. durch die Zugabe der Zusatzstoffe signifikant erhöht werden. Diese Steigerung beruht auf einer direkten und indirekten Wirkungsweise der Substanzen. Die indirekte Schutzwirkung der Glucose fand durch eine gesteigerte Sporenkeimungsrate, damit verbunden einer schnelleren Besiedlung und vermehrten Sporenlagerbildung auf dem Substrat Ausdruck. Die Beobachtungen der erhöhten Konkurrenzkraft von *Trichoderma* spp. um die Ressource Raum bestätigten zudem die Ergebnisse von HJELJORD et al. (2001) und HJELJORD & TRONSMO (2003), die durch eine Nährstoff-Applikation ein schnelleres Keimen der Sporen ermittelten. Allerdings muss eine direkte Schutzwirkung der Glucose abgesprochen werden, da HIGHLEY & RICARD (1988) und CANESSA & MORRELL (1997) keinen Effekt festgestellt haben. Zudem ist Glucose auch für die Holz abbauenden Pilze als schnell verfügbare Kohlenstoffquelle nutzbar (RAYNER & BODDY, 1988) und somit hatte die Zugabe auch für diese Pilzgruppe einen positiven Effekt. Harnstoff besitzt dagegen, neben einer indirekten Schutzwirkung in Form einer verbesserten Besiedlung des Substrats und Etablierung durch *Trichoderma* spp., auch eine direkte Schutzwirkung. So konnten EJECHI (1998 & 2003) und KHATTABI (2004) einen schützenden Effekt durch die Behandlung von Holz mit Harnstoff gegen einen Abbau ermitteln.

Wie in den vorherigen *in vitro*-Tests, wurden auch in diesem Fall signifikante Unterschiede zwischen den *Trichoderma*-Arten und -Stämmen ermittelt. Während *T. atroviride* 15603.1 die signifikant höchste protektive Wirkung gegen einen Holzabbau erkennen ließ, gefolgt von *T. atroviride* 351.93 und *T. virens*, besaß *T. fasciculatum* die geringste Schutzwirkung.

Die Holz zerstörenden Pilze ließen neben signifikanten Unterschieden im Holzabbauvermögen ebenfalls signifikante Differenzen in Bezug auf die Sensitivität gegenüber *Trichoderma* spp. erkennen. Während *K. deusta* und die beiden *Ganoderma*-Arten die größten Abbauraten aufwiesen, wurden bei *I. hispidus* und *P. squamosus* die geringsten Gewichtsverluste verzeichnet. Dies ist sicherlich zum

einen mit den unterschiedlichen Lebensweisen (KREISEL, 1961; JAHN, 1990; BUTIN, 1996; SCHWARZE, 1995; SCHWARZE et al. 1999) zu erklären und zum anderen mit der differierenden Enzymausstattung der Pilze (RAYNER & BODDY, 1988; ADASKAVEG et al. 1990; BLANCHETTE, 1991 & 1996; HIGHLEY et al. 1994; SCHWARZE, 2001). Sowohl die Gewichtsverlustmessungen als auch die makroskopischen Beobachtungen und die histologischen Studien ließen bei *P. squamosus* die geringste Anfälligkeit bzw. die höchste Resistenz gegenüber einer *Trichoderma*-Behandlung erkennen. Dagegen wiesen die *Ganoderma*-Arten, insbesondere *G. adspersum*, eine hohe Sensitivität auf.

#### **4.1.3.1 Holzabbaumuster**

Die histologische Analyse der mit den Holz abbauenden Pilzen inokulierten Proben (ohne *Trichoderma*-Beimpfung) ergab in Bezug auf die Holzabbaustrategien der Pilze keine Besonderheiten. So bauten die beiden *Ganoderma*-Arten und *P. squamosus* das Holz mittels einer Weißfäule (simultane Fäule & selektive Delignifizierung) ab (SEEHAHN, 1979; BLANCHETTE, 1991 & 1996; ADASKAVEG et al. 1990; SCHWARZE, 1995; SCHWARZE et al. 1999; SCHWARZE, 2001; SCHWARZE & FERNER, 2003). *Inonotus hispidus* ließ neben einer simultanen Fäule vereinzelt auch eine Moderfäule des Typ I erkennen (Duale Holzersetzungstrategie), während *K. deusta* das Holz ausschließlich mittels einer Moderfäule (Typ I & II) abbaute (BODDY & RAYNER, 1983; SCHWARZE & FINK, 1994; SCHWARZE 1995; SCHWARZE & FINK, 1997; SCHWARZE & BAUM, 2000 SCHWARZE et al. 2000b; SCHWARZE, 2002).

Eine andere Situation ergab sich bei der Betrachtung der mit *Trichoderma* spp. beimpften und mit den Holzsetzern inokulierten Proben. Hier konnten durch die lichtmikroskopischen Untersuchungen der histologischen Präparate bei einigen Pilzarten (*I. hispidus*, *P. squamosus*) Abweichungen im Abbaumuster festgestellt werden. Interessant war die Tatsache, dass *I. hispidus* das Holz nicht wie bei den Kontrollproben vorwiegend mit einer simultanen Fäule abbaute, sondern fast ausschließlich mittels einer Moderfäule. So befanden sich die Hyphen nicht im Lumen der Zelle, sondern wuchsen vorwiegend in der S<sub>2</sub>-Schicht. Dieses Umschalten des Abbauusters wurde bereits bei künstlichen Inokulationsversuchen an Platanenholz mit vorhandener Reaktionszone beobachtet (SCHWARZE & FINK, 1997). Die duale Holzersetzungstrategie verhalf *I. hispidus*, widrigen Bedingungen innerhalb der Reaktionszone (bspw. phenolische Substanzen) auszuweichen und die

RZ somit zu überwinden. So deuten die Beobachtungen darauf hin, dass *I. hispidus* mittels Umschalten von simultaner Fäule (Weißfäule) auf eine Moderfäule den Angriffen von *Trichoderma* spp. zu entgehen versuchte. Allerdings mit mäßigem Erfolg, denn die Gewichtsverlustmessungen ließen eine signifikante Reduktion des Holzabbaus durch eine *Trichoderma*-Behandlung erkennen. Ein alternatives Abbaumuster wurde ebenfalls bei den Proben, welche mit *Trichoderma* spp. behandelt und mit *P. squamosus* künstlich inokuliert waren, beobachtet. Im Normalfall wuchsen die Hyphen von *P. squamosus* im Lumen und bauten die Zellwandbestandteile neben einer simultanen Fäule insbesondere mit einer selektiven Delignifizierung ab (SEEHAHN, 1979; RAYNER & BODDY, 1988; BLANCHETTE, 1991 & 1996; SCHWARZE et al. 1999). Im Gegensatz dazu konnten vereinzelt Hyphen von *P. squamosus* bei den mit *Trichoderma* spp. vorbehandelten Proben in den Interzellularen und auf der Mittellamelle (Mittelschicht) beobachtet werden. Zudem wurde ein leichter Abbau der Mittelschicht in unmittelbarer Umgebung der Hyphen verzeichnet. Dieses Vorgehen kann interessanter Weise als Versuch gewertet werden, den durch *Trichoderma* spp. hervorgerufenen widrigen Umständen zu entgehen und wäre zugleich eine Erklärung dafür, warum *P. squamosus* sich in diesen Tests als äußerst resistent erwies und eine *Trichoderma*-Beimpfung nur eingeschränkten Erfolg hatte.

Dass es sich bei den genannten Beobachtungen nicht um die Hyphen der Holzersetzer, sondern um Hyphen von *Trichoderma* spp. handelte, kann aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden: So konnten an den Kontrollholzproben, die einzig mit den *Trichoderma*-Arten beimpft wurden und bei denen eine Inokulation mit den Holz abbauenden Pilzen unterblieb, in keinem Fall ein Hyphenwachstum innerhalb der S<sub>2</sub>-Schicht der Sekundärwand oder auf der Mittellamelle beobachtet werden. Einzig im Lumen der Zellen, insbesondere in den Parenchymzellen, wurden Hyphen von *Trichoderma* spp. verzeichnet. Zudem konnten keine Anzeichen eines gezielten Abbaus der verholzten Zellwand festgestellt werden, was auf ein eingeschränktes enzymatisches Holzabbau-Potenzial der *Trichoderma*-Arten hindeutet. In der Vergangenheit wurde *Trichoderma* spp. fälschlicherweise oftmals als Moderfäuleerreger eingestuft (KUBICEK-PRANZ, 1998). Zahlreiche Studien an Buchen-, Kiefer- und Birkenholz belegten aber, dass *Trichoderma* spp. auf Grund der fehlenden Enzymausstattung nicht in der Lage ist, sich die verholzten Zellwandbestandteile zu Nutze zu machen (BUTCHER, 1968; HULME & STRANKS,

1970; BERGMAN & NILSSON, 1971; DANIELSON & DAVEY, 1973c). Es konnte zwar ein durchschnittlicher Gewichtsverlust an den Holzproben durch *Trichoderma* spp. festgestellt werden, dieser fiel aber mit 1,65% sehr gering aus und ist auf die ausschließliche Nutzung leicht verfügbarer Kohlenhydrate und den Abbau der Hoftüpfel zurückzuführen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von HULME & STRANKS (1970), die an Kiefer ebenfalls einen Abbau der Hoftüpfel durch *Trichoderma* spp. sowie ein vermehrtes Hyphenwachstum im Lumen der Holzstrahlen verzeichneten. Auf Grund der Tatsache, dass *T. reesei* in der Lage ist, Cellulasen zu bilden (KOIVULA et al. 1998; TAKASHIMA et al. 1999), kann eine eingeschränkte Nutzung der in den Zellwänden vorhandenen Hemicellulosen nicht gänzlich ausgeschlossen werden, wurde aber in diesen Studien nicht beobachtet.

#### 4.1.4 Wachstums- und Sporenkeimungsraten

Ein weiterer wichtiger Mechanismus im Antagonismuskomplex von *Trichoderma* spp. ist die Konkurrenz um Nahrung und Raum, die maßgeblich vom Sporenkeimungs- und Wachstumsverhalten beeinflusst wird (COOK, 1979; CHET, 1990; CHET et al. 1998; HJELJORD & TRONSMO, 1998; HOWELL, 2003). Die Keimung und das Wachstum der Organismen werden wiederum stark durch physikalische und chemische Umweltfaktoren bestimmt und dadurch sind Kenntnisse über Keimungs- und Wachstumsoptima und über den Einfluss suboptimaler Bedingungen auf das antagonistische Potenzial für den späteren Einsatz des Antagonisten elementar (PAPAVIZAS, 1985; HJELJORD & TRONSMO, 1998; KREDICS et al. 2003a; HARMAN, 2006). Aus diesen genannten Gründen wurden unter kontrollierten Laborbedingungen und unter dem Einfluss der wichtigsten Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Wasserverfügbarkeit und Nahrungsangebot das Keimungs- und Wachstumsverhalten untersucht.

Sowohl die Qualität als auch die Quantität der Nahrungsquelle begünstigen das Vorkommen und Überdauern sowie die Dichte der Populationen (WEBSTER, 1983; NULTSCH, 2001). So zeigten die Holzabbauenden Pilze ihr Wachstumsoptimum auf einem nährstoffreichen Medium (MEA) und bei einem pH-Wert von 5. Auf dem nährstoffarmen Medium LNA war das Wachstumsverhalten deutlich (signifikant) eingeschränkt, insbesondere bei einem pH-Wert von 7 (KAARIK, 1974; RAYNER & BODDY, 1988). Zudem besaßen die Holzzersetzer signifikant unterschiedliche

Wachstumsraten. Während die *Ganoderma*-Arten die höchsten Wachstumsraten aufwiesen, ließ *K. deusta* das geringste Wachstum erkennen. Dies ist mit der unterschiedlichen Lebensweise der Pilzarten und den damit verbundenen unterschiedlichen Ansprüchen an das Substrat und anderen Faktoren zu erklären (KAARIK, 1974; WEBSTER, 1983; RAYNER & BODDY, 1988, JAHN, 1990; BUTIN, 1996).

Die Wachstumsraten von *Trichoderma* spp. waren sowohl auf dem nährstoffreichen als auch auf dem nährstoffarmen Medium bei beiden pH-Werten hochsignifikant größer als die Raten der Holz zersetzenden Pilze. Aber auch hier hatten das Nahrungsangebot (Substrat) und der pH-Wert einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum. So wurden die höchsten Raten auf dem Medium MEA und bei einem pH-Wert von 5 verzeichnet. Für das antagonistische Potenzial bedeutet das, dass die *Trichoderma*-Arten mit ihrem deutlich höheren Wachstum in der Lage sind, den zu Verfügung stehenden Raum schneller zu besiedeln als die Holz zersetzenden Pilze und somit über eine sehr große Konkurrenzskraft um die Ressource Raum verfügen (PAPAVIZAS, 1985; CHET, 1990; HARMAN & BJÖRKMAN, 1998; HARMAN, 2000).

Das Myzelwachstum der *Trichoderma*-Arten hängt neben dem Nährstoffangebot und pH-Wert sehr stark (signifikant) von der Temperatur und Wasseraktivität ( $a_w$ ) ab. So wurden bei allen *Trichoderma*-Arten im Schnitt das Wachstumsoptimum bei 25°C und bei der höchsten Wasseraktivität ( $a_w$  0,998) festgestellt und entspricht somit den Beobachtungen von KREDICS et al. (2000). Zudem schwankten die Wachstumsraten zwischen den Arten und Stämmen signifikant (GOLDFARB et al. 1989, SAMUELS, 1996). Im Mittel wurde bei *T. virens* die höchste Wachstumsrate ermittelt (CROSS & KENERLEY, 2004) wohingegen *T. fasciculatum* ein deutlich langsames Wachstum aufwies.

Die Sporenkeimung ist definiert als die Transformation von einer relativ inaktiven Spore zu einer aktiven vegetativen Pilzhyphe (MARTÍN & NICOLÁS, 1970). Für ein erfolgreiches und schnelles Keimen werden neben den Nährstoffen (DANIELSON & DAVEY, 1973a,b) die Temperatur (MAGAN, 1988) und insbesondere die Feuchtigkeit verantwortlich gemacht (MARTÍN & NICOLÁS, 1970; SCHLÖSSER, 1993; ALDRED et al. 1999; KÖHL & MOLHOEK, 2001). Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass der Einfluss der Temperatur und der Wasseraktivität auf die Sporenkeimung von *Trichoderma* spp. hochsignifikant war. Die schnellste Keimung (bereits nach 6h) und die höchste durchschnittliche Keimungsrate wurden bei einer Temperatur von 25°C und der höchsten Wasseraktivität ( $a_w$  0,998) verzeichnet.

#### 4.1.4.1 Diskussion zu den Einflussfaktoren

Wie bereits erwähnt, ergaben die statistischen Korrelationsanalysen signifikante Einflüsse des Substrats (Nährstoffe), des pH-Werts, der Temperatur und der Wasseraktivität auf die Keimungs- und Wachstumsrate von *Trichoderma* spp. Während ein suboptimaler pH-Wert und ein geringes Nährstoffangebot das Wachstum im Allgemeinen nur verlangsamen, wiesen hingegen die Temperatur und insbesondere die Wasserverfügbarkeit zudem einen stark limitierenden Charakter auf. JACKSON et al. (1991) und KREDICS et al. (2004) konnten eine große Toleranz von *Trichoderma* spp. gegenüber unterschiedlichen pH-Werten ermitteln. So zeigten *Trichoderma*-Arten sowohl bei sehr geringen (2) als auch bei hohen pH-Werten im neutralen Bereich (6,8) noch ein ausgeprägtes Wachstum, wobei das pH-Optimum bei einem Wert von 4 verzeichnet wurde. Der pH-Wert spielt als Wachstumsregulator somit eine eher untergeordnete Rolle, allerdings weisen Studien darauf hin, dass ein suboptimaler pH-Wert die Enzymproduktion von *Trichoderma* spp. beeinflussen kann (DELGADO-JARANA et al. 2000; KREDICS et al. 2003a & 2004).

In dieser Arbeit wurde bei einer Temperatur von 5°C bei allen *Trichoderma*-Arten auch nach einer Woche Inkubationszeit weder eine Sporenkeimung noch ein Hyphenwachstum verzeichnet. Ferner besaßen alle Arten ihr Optimum bei 25°C. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse von KREDICS et al. (2003a), die nach zahlreichen Tests *Trichoderma* spp. als vorwiegend mesophile Organismen einstufen, welche zudem über eine geringe Kälte-Toleranz verfügen. Nach der Literatur differiert das Temperaturoptimum zwischen den Arten (Stämmen), aber im Allgemeinen wird das Optimum ebenfalls mit 20-25°C angegeben (BADHAM, 1991; SAMUELS, 1996; KLEIN & EVERLEIGH, 1998). Nicht alle *Trichoderma*-Stämme erwiesen sich allerdings als kälteempfindlich. So zeigten Studien von JOHNSON et al. (1987) und TURNER et al. (1997), dass sich manche Arten an kältere Klimazonen angepasst haben. DANIELSON & DAVEY (1973d) berichteten bereits, dass *T. hamatum* und *T. minutisporum* eher in warmen Gebieten vorkommen, während *T. viride* und *T. polysporum* vorwiegend aus kalten Zonen isoliert wurden. TRONSMO & DENNIS (1978) beobachteten gar ein Wachstum von *T. viride* und *T. polysporum* bei einer Temperatur von 2°C. Ferner kann die Temperatur das antagonistische Potenzial von nicht kälte-toleranten *Trichoderma*-Arten beeinflussen. So ermittelten TRONSMO & DENNIS (1978), BADHAM (1991), EASTBURN & BUTLER (1991) und NAÁR & KECSKÉS

(1998) bei kälteren Temperaturen neben einer eingeschränkten mycoparasitischen Aktivität zudem eine deutlich reduzierte Produktion flüchtiger und nicht-flüchtiger antibiotischer Substanzen.

Die Wasseraktivität war in diesen Studien ebenfalls stark limitierend. Bereits bei einer Wasseraktivität von 0,995 waren sowohl die Sporenkeimung als auch das Wachstum signifikant eingeschränkt und bei einer weiteren Reduzierung der Wasseraktivität auf 0,892 konnte bereits keine Keimung und kein Wachstum mehr ermittelt werden. Diese geringe Xero-Toleranz der *Trichoderma*-Arten wird durch die Beobachtungen von LUARD & GRIFFIN (1981), MAGAN (1988) und LUPO et al. (2002) bestätigt. Zusätzlich wird durch die Wasserverfügbarkeit die Interaktion mit anderen Pilzen (Mycoparasitismus) sowie die Enzymproduktion beeinträchtigt (MAGAN & LACEY, 1984; MAGAN et al. 1984; WHIPPS & MAGAN, 1987; BADHAM, 1991; EASTBURN & BUTLER, 1991; KREDICS et al. 2000 & 2003a; CLARKSON et al. 2004).

Eine abschließende Einschätzung der Umweltfaktoren und ihren Einflüssen auf das Wachstum von *Trichoderma* spp. wird durch die Tatsache erschwert, dass sich die verschiedenen Faktoren gegenseitig in der Wirkung verstärken oder abschwächen können (HARMAN, 2006; HOWELL, 2006). So wurde in dieser Arbeit ein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Nährmedien (Nährstoffangebot, pH-Wert) bei einer Temperatur von 25°C verzeichnet, hingegen konnten weder bei niedrigeren (<15°C) noch bei höheren (>30°C) Temperaturen Signifikanzen ermittelt werden. Dies lässt auf reduzierte Stoffwechselforgänge und veränderte physiologische Abläufe bei *Trichoderma* spp. unter suboptimalen Temperaturen schließen. Zudem wurden bei einer reduzierten Wasserverfügbarkeit ( $a_w$  0,995) höhere durchschnittliche Wachstumsraten auf dem nährstoffarmen Medium (LNA) ermittelt. Auf dem nährstoffreichen Medium (MEA) waren die Raten dagegen leicht reduziert. Dies deutet auf eine durch Nährstoffe induzierte Aktivierung (Steigerung) des Stoffwechsels und damit einhergehend einem Anstieg des Wasserbedarfs hin, was bei geringer Wasserverfügbarkeit zu einem eingeschränkten Wachstum führt (VINDELØV & ARNEBORG, 2002). Die genannten Punkte verdeutlichen die Komplexität der Wirkungsmechanismen unterschiedlicher Umweltfaktoren.

#### 4.1.5 Index of Dominance ( $I_D$ )

Ungeachtet der zu Beginn erwähnten Diskussionen zu der Aussagekraft der *in vitro* Versuche bleibt eines unbestreitbar: Eine Betrachtung nur eines *in vitro* Versuches, der ein Mechanismus aus dem Antagonistenkomplex testet, ist definitiv nicht geeignet, einen *Trichoderma*-Stamm für den Einsatz zur biologischen Kontrolle zu selektieren. Nur eine Berücksichtigung aller wichtigen Mechanismen im Antagonismuskomplex (Mycoparasitismus, Konkurrenz um Nahrung und Raum, Antibiosis) garantiert zumindest eine Vorselektion eines potenten (virulenten) Stammes, der in *ad planta* Versuchen weiter getestet werden kann (VIZCAÍNO et al. 2005). Aus diesem Grund war es sinnvoll, den Index of Dominance ( $I_D$ ), der von MAGAN & Lacey (1984) einzig für die Dualkultur-Tests entwickelt wurde und von RAMAKRISHNA et al. (1993) und MARÍN et al. (1998) modifiziert wurde, auf alle *in vitro* Versuche zu erweitern. Dieses Vorgehen erlaubte eine Darstellung der Konkurrenzkraft unter Einbeziehung aller Versuche und damit aller Mechanismen und zudem erleichterte es einen quantitativen Vergleich der eingesetzten *Trichoderma*-Arten und Stämme in Bezug auf ihr antagonistisches Potenzial.

Die statistische Analyse der erzielten  $I_D$ -Werte ließ neben signifikanten Unterschieden zwischen den eingesetzten *Trichoderma*-Arten auch signifikante Differenzen zwischen den *T. atroviride*-Stämmen erkennen. So wurde bei den beiden *T. atroviride*-Stämmen 15603.1 & 351.93 sowie bei *T. virens* jeweils ein  $I_D$ -Wert von 3,6 ermittelt. Dieser Wert bedeutet, dass die Pilze über alle *in vitro*-Versuche hinweg über ein hohes antagonistisches Potenzial verfügten. Hingegen ließen *T. atroviride* 396.92 mit einem  $I_D$ -Index von 3 und *T. fasciculatum (strictipile)* mit einem Wert 2,2 nur ein eingeschränktes antagonistisches Potenzial erkennen. Diese Ergebnisse spiegeln die Studien von HARMAN & BJÖRKMANN (1998), HOWELL et al. (1997 & 2000), KUBICEK et al (2001), HANSON & HOWELL (2004), LI et al. (2005) und HOWELL (2006) wider, die ebenfalls bei den Arten *T. virens* und *T. atroviride* ein hohes antagonistisches Potenzial ermittelten und zudem deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen feststellten.

Des Weiteren bekam man durch die  $I_D$ -Indices einen Überblick über die Relevanz der einzelnen Mechanismen von *Trichoderma* spp. So konnte man feststellen, dass die Produktion flüchtiger antibiotischer Verbindungen im Antagonismuskomplex von

*Trichoderma* spp. gegen Holz abbauende Pilze auf Grund des sehr niedrigen durchschnittlichen  $I_D$ -Werts von 1,5 eine eher untergeordnete spielt.

Neben den unterschiedlichen Eigenschaften und Fähigkeiten der einzelnen *Trichoderma*-Arten und den festgelegten Testbedingungen (C- & N-Quelle, Fe-Angebot, P-Verfügbarkeit, pH-Wert, Temperatur, Wasserregime) waren die Zielorganismen eine entscheidende Größe in den künstlichen Laborstudien. In dieser Arbeit war evident, dass sich in den durchgeführten *in vitro*-Tests *Polyporus squamosus* als äußerst resistent gegen *Trichoderma* spp. erwies. Die restlichen Holz zersetzenden Pilze ließen mit kleineren Einschränkungen bei allen Tests eine hohe Anfälligkeit (Sensitivität) erkennen. Bereits SHIELDS & ATWELL (1963) berichteten, dass *Polyporus adustus* sich *in vitro* als sehr widerstandsfähig gegenüber *T. viride* erwies. HIGHLEY et al. (1994 & 1997) ermittelten in verschiedenen Labortests eine geringe Wirkung von *Trichoderma* spp. gegen den Pilz *Gleophyllum trabeum*.

Über die möglichen Gründe der erhöhten Resistenz von *P. squamosus* kann nur spekuliert werden. Eine evolutive Anpassung auf Grund gleicher Lebensweisen kann hier ausgeschlossen werden. Während *P. squamosus* in der Literatur häufig als Wundparasit eingestuft wird, der über Wunden ins Holz eindringt (SEEHAHN, 1979; JAHN, 1990; BUTIN, 1996; SCHWARZE et al. 1999), ist die Gattung *Trichoderma* zwar an allen Teilen der Pflanze (Phyllospähre, Rinde, usw.) anzutreffen, besitzt aber den Verbreitungsschwerpunkt im Boden und dort vorwiegend in der Rhizosphäre (ROIGER et al. 1991; SAMUELS, 1996; KLEIN & EVERLEIGH, 1998; SAMUELS, 2006; HOWELL, 2003 & 2006). Zudem kann eine Anpassung ausgeschlossen werden, da *I. hispidus* ebenfalls als Wundparasit über eine ähnliche Lebensweise wie *P. squamosus* verfügt, aber in den Tests äußerst sensitiv auf die *Trichoderma*-Applikation reagierte. Des Weiteren kommen externe Faktoren (Temperatur, Wasserverfügbarkeit, usw.), die das antagonistische Potenzial von *Trichoderma* ssp. herabgesetzt haben könnten, nicht in Betracht. Alle Tests wurden unter kontrollierten und gleichen Bedingungen durchgeführt und waren somit für alle Pathogen/*Trichoderma*-Kombinationen gleich. *P. squamosus* muss demnach in der Lage sein, einzelne Mechanismen des Antagonismuskomplexes von *Trichoderma* spp. auszuweichen bzw. ganz auszuschalten (Doppelstrategie).

Die Tendenz, dem Befall durch *Trichoderma* spp. zu entgehen, wurde in dieser Arbeit erstmals in den Dualkultur-Tests sichtbar. Hier wuchsen nach erstem Kontakt mit den *Trichoderma*-Arten die Hyphen von *P. squamosus* in veränderter Form weiter (BARTNICKI-GARCIA et al. 2000). Die einzelnen Hyphen vereinigten sich und bildeten ganze Myzelstränge aus. Durch diese Vereinigung der einzelnen Hyphen zu einem kompakten Gebilde wird zum einen die Oberflächengröße und damit einhergehend die Angriffsfläche verringert. Zum anderen werden die Hyphen, welche im Inneren des Myzelstranges liegen, durch die physikalische Trennung von den Hyphen von *Trichoderma* spp., geschützt. Ebenfalls denkbar wäre in diesem Zusammenhang, dass durch *Trichoderma* spp. induziert, physiologische Vorgänge ablaufen, die die chemische Zusammensetzung der Hyphen von *P. squamosus* modifizieren und resistenter gegenüber *Trichoderma* spp. und deren enzymatischen Aktivitäten machen (O'BRIEN & RALPH, 1966; WALLANDER & PALLON, 2005). In den Interaktionsstudien wurde ebenfalls ein gezieltes Ausweichen durch ein verändertes Holzabbaumuster (Duale Holzersetzungstrategie) beobachtet (Kapitel 4.1.3.1). Durch das Wachsen auf der Mittellamelle und durch einen Abbau der Mittelschicht in unmittelbarer Nähe der Hyphe war es *P. squamosus* möglich, sich dem Aktionsradius von *Trichoderma* spp. zu entziehen.

Die hohe Resistenzkraft von *P. squamosus* könnte neben dem gezielten Ausweichen der widrigen Bedingungen auch durch Manipulation von *Trichoderma* spp. selbst begründet sein. Denkbar wäre hier eine Produktion und Emittierung von Substanzen, die in der Lage sind, einzelne Mechanismen im Antagonismuskomplex von *Trichoderma* spp. außer Kraft zu setzen. So berichtete LUTZ et al. (2003), dass das von *Fusarium culmorum* und *F. graminearum* ausgeschiedene Mycotoxin Trichothecene Deoxynivalenol (DON) bei *Trichoderma* spp. die Genexpression von *ech42* unterdrückte und damit die Bildung des Enzyms Chitinase. Ähnliches konnte ZEILINGER (2004) beobachten. Hier verhinderte das Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* die Enzymproduktion. Weitere Selbstverteidigungsmechanismen von *P. squamosus* könnten der aktive Efflux von antibiotischen Metaboliten sowie die Möglichkeit der Entgiftung fungizider Substanzen sein (DUFFY et al. 2003).

## 4.2 AD PLANTA STUDIEN MIT *TRICHODERMA ATROVIRIDE* KARSTEN

Ungeachtet der positiven Resultate in den aufgeführten *in vitro*-Versuchen besitzen diese auf Grund der nicht möglichen Berücksichtigung aller unter Praxisbedingungen herrschenden ökologischen und endemischen Faktoren ihre Grenzen. Aus diesem Grund wurde mit einem selektierten *Trichoderma*-Stamm *ad planta* Studien durchgeführt, deren Ergebnisse und Beobachtungen nachfolgend diskutiert werden.

### 4.2.1 Diskussion zu Versuch A und B

Für den erfolgreichen Einsatz eines *Trichoderma*-Stammes zur biologischen Kontrolle von phytopathogenen Pilzen ist neben dem antagonistischen Potenzial die Fähigkeit des Antagonisten, sich auf dem Zielsubstrat zu etablieren und dort zu persistieren, entscheidend (COOK, 1979; SAMUELS, 1996; HARMAN & BJÖRKMAN, 1998; HJELJORD & TRONSMO, 1998, MONTE, 2001; HOWELL, 2003, HARMAN, 2006).

Der *ad planta* Versuch A hatte einerseits zum Ziel, ein Verfahren zu formulieren, welches den Antagonisten optimal auf den Schnittflächen etabliert, und andererseits die Persistenz von *Trichoderma* sp. auf dem Substrat über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Auf Grund der Tatsache, dass die Beobachtungen und die Ergebnisse des Versuchs A nur eine Aussage bezüglich der Persistenz des Antagonisten auf den Schnittflächen erlaubten und keine über die Schutzwirkung (Wirkungsgrad), wurden zusätzlich künstliche Inokulationsversuche an Bäumen durchgeführt (Versuch B). Dieses Vorgehen ermöglichte eine statistische Analyse und zudem konnte eine signifikante Beziehung zwischen *Trichoderma*-Beimpfung und Reduzierung der Infektionsrate hergestellt werden.

Die *ad planta* Studien wurden mit dem Stamm *Trichoderma atroviride* 15603.1 durchgeführt, der in den *in vitro*-Versuchen ein hohes antagonistisches Potenzial erkennen ließ und der aus einer im Labor des Instituts für Forstbotanik und Baumphysiologie, Professur für Forstbotanik, vorhandenen und kontaminierten *Armillaria*-Kultur stammt.

Zwar empfehlen in diesem Zusammenhang einige Autoren, dass, um eine maximale Persistenz zu erzielen (Verringerung des Anpassungsproblems), die Herkunft des Antagonisten dem späteren Einsatzhabitat entsprechen sollte (COOK & BAKER, 1983; ANDREWS, 1992). BLAKEMAN & FOKKEMA (1982) und ANDREWS (1992) berichteten, dass Mikroorganismen der Phylloplane optimal an starke klimatische Schwankungen

(Temperatur, Feuchte, UV-Strahlung) und an das Nährstoffangebot angepasst sind, hingegen bodenbewohnende Organismen dort zwar kurzzeitig überleben, sich aber nicht langfristig etablieren können. So wurden zur Bekämpfung vasculärer Krankheiten vorzugsweise endophytische Isolate eingesetzt (BROOKS et al. 1994), Isolate aus Böden gegen bodenbürtige Pathogene (COOK, 1979; CHET et al. 1979) und *Trichoderma*-Isolate aus Fichtenholz gegen Holz zerstörende Pilze (NICOLOTTI & VARESE, 1996).

Jedoch existieren im Gegensatz dazu zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass Bodenbakterien und -pilze erfolgreich gegen phytopathogene Erreger eingesetzt wurden, obwohl ihre Herkunft nicht dem späteren Zielort entsprach. So wurden unter anderem Pseudomonaden und Actinomyceten gegen Blattpathogene und anderen oberirdisch vorkommende Erreger mit Erfolg eingesetzt (ELAD ET AL. 1979; LEVY et al. 1989; ANDREWS, 1992; ELAD & KIRSHNER, 1993; KOVACH et al. 2000; MOUSSA, 2002). TRONSMO & RAA (1977) berichteten über ein *Trichoderma*-Isolat aus dem Boden, das mehr als ein Jahr auf der Phylloplane überlebte. Inwieweit durch die Herkunft des *Trichoderma*-Stammes Anpassungsprobleme existierten und die Persistenz auf dem Substrat Holz beeinflusst wurde, wird in den folgenden Kapiteln besprochen und diskutiert.

#### **4.2.1.1 Re-Isolation**

Das Isolieren und Bestimmen von Pilzen birgt eine Reihe von Schwierigkeiten, insbesondere da das Arbeiten an großen und verholzten Pflanzenteilen einen methodischen Sonderfall darstellt (YANG, 2005). Es ist beim Analysieren der Pilzflora in einem definierten Raum (Schnittfläche) notwendig sicherzustellen, dass die isolierten Organismen tatsächlich auf dem Substrat vorhanden waren und nicht zu einem späteren Zeitpunkt sich angesiedelt haben. Nach CHAPELA (1989) ist das Isolieren von Pilzen aus großen, schwer zu zerlegenden Gewebeteilen wie dem Xylem der Bäume durch das nahezu unmögliche aseptische Arbeiten erschwert und eine nachträgliche Kontamination nicht völlig auszuschließen. Da beim Versuch A die Re-Isolationen aus den Schnittflächen nicht im Labor, sondern vor Ort durchgeführt wurden und das sterile Arbeiten somit zusätzlich erschwert war, erhöhte sich dementsprechend der Kontaminationsdruck. Um unter diesen erschwerten Bedingungen dennoch Verunreinigungen so weit als möglich zu unterbinden bzw. rechtzeitig zu erkennen und somit ein repräsentatives Ergebnis zu gewährleisten,

wurde besonderer Wert auf gründliche Sterilisation der Werkzeuge, ein zügiges Arbeiten sowie eine regelmäßige Beobachtung der inkubierten Holzproben und Petrischalen gelegt.

Die Re-Isolationen und das Analysieren der Pilze beim Versuch B erfolgten nicht wie bereits beschrieben vor Ort, sondern nach einem standardisierten Verfahren im Labor unter der Sterilbank (Kapitel 2.7.2.2). Dieses Vorgehen garantierte ein deutlich sterileres Arbeiten, obwohl auch hier durch die verschiedenen Arbeitsschritte das Risiko einer nachträglichen Kontamination existierte. Zu einer Verunreinigung konnte es (1) bei der Fällung der Bäume, (2) beim Zerlegen der Segmente in die einzelnen Einheiten, (3) beim Entnehmen der Holzstücke und deren Platzierung auf die Nährmedien kommen. Somit war das Fällen der Bäume zu sinnvollen Terminen, das sorgfältige Sterilisieren der Werkzeuge und ein schnelles Weiterverarbeiten elementar (BAUM, 2000). Zwar wurde die Gefahr einer Verunreinigung auch durch dieses Vorgehen nicht gänzlich abgewendet, im Gegensatz zu einer vor Ort Isolierung konnte der Kontaminationsdruck aber deutlich reduziert werden.

Um die Etablierung und Persistenz des applizierten Antagonisten auf den Schnittflächen so exakt als möglich zu determinieren, wurden neben dem Medium MEA zwei für *Trichoderma* selektiv wirkende Medien TSM (1) und (2) zur quantitativen Re-Isolation verwendet (ELAD et al. 1981; ASKEW & LAING, 1993). Es zeigte sich hierbei, dass durch diese selektiven Medien das Wachstum unerwünschter Organismen deutlich unterbunden werden konnte. Aber insgesamt wurden keine signifikant höheren Anteile an der Gesamtisolation im Vergleich mit dem unselektiv wirkenden Medium MEA ermittelt. Dies ist sicherlich damit zu erklären, dass *Trichoderma* spp. durch sein sehr schnelles Wachstum sowie durch die hohe Produktion an Sporen über eine hohe Konkurrenzkraft verfügt und damit relativ leicht zu isolieren ist (PAPAVIZAS & LUMSDEN, 1982; KLEIN & EVELEIGH, 1998, WILLIAMS et al. 2003b).

Die Re-Isolationsergebnisse von *T. atroviride* der Standorte Ludwigshafen, Straßburg und Lehen (Freiburg) ließen zum einen hochsignifikante Unterschiede zwischen den Verfahren erkennen. So wurde die höchste Re-Isolationsrate aus den Wunden erzielt, die mit dem Verfahren C, mit einem feuchtigkeitsspeichernden Gel als Trägersubstanz behandelt wurden. Eine ausführliche Besprechung der angewendeten Verfahren erfolgt in Kapitel 4.2.4. Zum anderen wurde durch die

statistische Analyse deutlich, dass die Isolationsrate von *Trichoderma* sp. aus den beimpften Schnittflächen hochsignifikant höher lag als aus den unbehandelten Kontrollwunden. Allerdings muss in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass durch das durchgeführte Monitoring des Antagonisten im Versuch A deutlich wurde, dass die Persistenz von *T. atroviride* in einem Zeitraum von 30 Monaten an den Standorten bereits stark eingeschränkt war. So lag bspw. die Isolationsrate des Antagonisten am Standort Ludwigshafen nach 2 Monaten im Schnitt deutlich höher als nach 30 Monaten. Zudem konnte bei einer Betrachtung der Isolationsraten als logarithmische Funktionen (KÖHLER et al. 2002), eine langfristige Prognose für die Standorte Ludwigshafen und Straßburg erstellt werden. Dadurch wurde deutlich, dass die Raten aus den behandelten Wunden sich langfristig an die Isolationsraten der Kontrollwunden annähern. Eine abnehmende Re-Isolationsrate von *T. harzianum* und einzelnen Stämmen von *T. viride* auf Holz wurde ebenfalls von POTTLE et al. (1977) und MERCER & KIRK (1984b) ermittelt. Inwieweit abiotische und biotische Faktoren das Verbleiben von *T. atroviride* auf den Schnittflächen beeinflusst haben, wird im Kapitel 4.2.2 auf Grund der Komplexität ausführlich diskutiert.

Die Re-Isolationsergebnisse entlang des Tiefengradienten (Versuchs B) ergaben, dass *T. atroviride* sich vorwiegend in Oberflächennähe der Schnittwunde aufhält und nur bedingt in der Lage war, ins Stamminnere vorzudringen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen aus dem *in-vitro* Versuch Interaktionsstudien an Holz. Auf Grund des eingeschränkten enzymatischen Holzabbau-Potenzials war *T. atroviride* auch hier nicht in der Lage, das Innere der Holzproben zu besiedeln. Zudem erfolgte die Expansion ausschließlich über Tüpfelverbindungen und vorwiegend in den Parenchymzellen, während andere Zellelemente nicht besiedelt wurden. Diese Beobachtungen sowie die Re-Isolationsraten entlang des Tiefengradienten untermauern die These, dass *T. atroviride* das Substrat Holz nicht weit reichend erschließen kann und somit nicht in der Lage ist, auf Dauer im Holz zu verweilen.

Diese Aussage darf allerdings nicht verallgemeinert werden und gleichzeitig sollte der Gattung *Trichoderma* nicht grundsätzlich eine Unfähigkeit, Holzbestandteile zu erschließen und im Holz zu persistieren, unterstellt werden. Zum einen konnte LONSDALE (1992) auch noch nach fünf Jahren aus einer behandelten Wunde den Antagonisten *T. viride* isolieren. MERCER & KIRK (1984b) ermittelten bei einigen *T. viride* Stämmen die Fähigkeit, über einen längeren Zeitraum in Schnittwunden zu

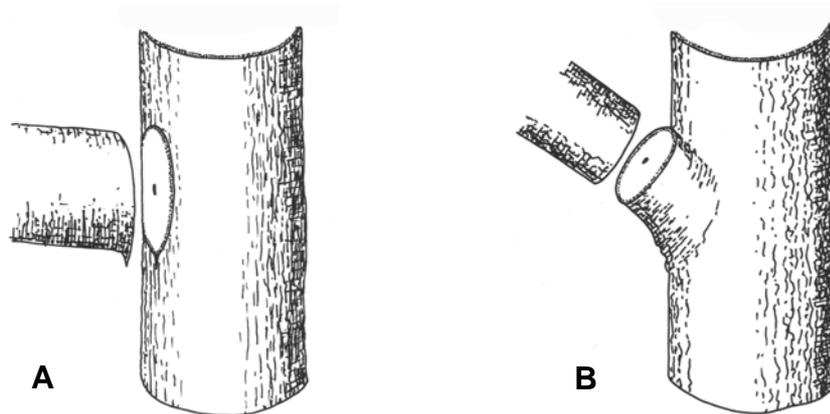
überdauern. Zum anderen existieren zahlreiche Arbeiten, die *Trichoderma* spp. aus unbehandeltem und liegendem Holz (SCHMIDT & MORETH, 2002; YANG, 2005), aber auch aus lebenden Bäumen (Schnittflächen) isoliert haben (GADGIL & BAWDEN, 1982; VEGH et al. 1994; NICOLOTTI & VARESE, 1996). Auch die in dieser Arbeit erzielten Isolationen von *Trichoderma* spp. aus den unbehandelten Wunden lassen auf eine mögliche Anpassung von *Trichoderma*-Arten (-Stämmen) an das Substrat Holz schließen.

Eine weitere Erklärung für die stetigen *Trichoderma*-Isolationen wäre, dass es sich um endophytisch lebende *Trichoderma*-Isolate handelt. So konnten EVANS et al. (2003) aus dem Baum *Theobroma gileri* häufig *Trichoderma* spp. isolieren und als Endophyten klassifizieren. Beruhend auf diesen Ausführungen ist mit statistischer Sicherheit auszuschließen, dass die Re-Isolationsergebnisse durch eine nachträgliche Kontamination mit *Trichoderma* spp. zu Stande kamen. Des Weiteren erhärtet sich der Verdacht, dass einzelne *Trichoderma*-Stämme in der Lage sind, die ökologische Nische Holz zu besetzen und als Lebensraum zu gewinnen. So könnte die mangelnde Persistenz des applizierten Stammes *T. atroviride* 15603.1 durchaus auf seine Herkunft und damit einhergehend mit der fehlenden Anpassung an das Substrat Holz zurückzuführen sein.

#### **4.2.1.2 Wundparameter**

Als Wundparameter wurden neben der Holzverfärbung (axial, radial, tangential) auch die Wundüberwallung (Kalluskoeffizient) herangezogen. Der Schwerpunkt der Auswertungen lag einerseits auf möglichen Unterschieden zwischen den Baumarten bezüglich Verfärbung und Kalluswachstum und andererseits inwieweit die Holz abbauenden Pilze und *T. atroviride* einen Einfluss auf diese Parameter besaßen.

Zahlreiche Autoren berichteten, dass die Ausmaße der Holzverfärbung stark mit der Schnitttechnik korrelierten (SHIGO, 1980 & 1984a,b; LIESE et al. 1988; DUJESIEFKEN et al. 1988 & 1998; DUJESIEFKEN & STOBBE, 2002). Bei einer falschen Schnitfführung (stammparallel) wurde eine deutlich größere Verfärbungsfläche ermittelt als bei einer Schnitfführung am Astring. Aus diesem Grund wurden die Schnittmaßnahmen nach der gültigen Richtlinie der ZTV-Baumpflege (2006) durchgeführt (Abbildung 74). Da die Schnitttechniken bei allen Baumarten angewendet wurden, war eine Vergleichbarkeit der Behandlungen und ihrer Wirkungen somit gewährleistet.



**Abb. 74:** **A:** Die Folge einer stammparallelen Schnitfführung ist zum einen eine größerer Wundfläche und zum anderen werden die Rinde und das Kambium des Stammes in Mitleidenschaft gezogen. **B:** Der Schnitt am Astkragen hinterlässt eine kleinere Schnittfläche und garantiert, dass Rinde und Kambium des Stammes unverletzt bleiben.

Bei allen Baumarten konnte die größte Ausdehnung an verfärbter Fläche in axialer Richtung ermittelt werden, gefolgt von der radialen und tangentialen Ebene (LIESE et al. 1988; BOSTOCK & STERMER, 1989; BLANCHETTE, 1991). Bei der Baumart *Populus nigra* wurde in allen 3 Richtungen die größte verfärbte Fläche verzeichnet, während *Tilia platyphyllos*, *Acer pseudoplatanus* deutlich geringere und *Quercus rubra* die geringste Ausdehnung aufwies. Die ermittelten Werte stehen somit im Einklang mit den Beobachtungen von DUJESIEFKEN (1991), der die Pappel als einen sehr schlechten Kompartimentierer beschrieb, während er Eiche, Ahorn und Linde ein gutes Abschottungsvermögen ausstellte. Zudem wurde durch die statistische Korrelationsanalyse deutlich, dass die Größe der Verfärbung mit der Wundgröße bei allen Baumarten stark korreliert (DUJESIEFKEN & STOBBE, 2002; EISNER et al. 2002). Diese Beziehung wurde insbesondere bei der Baumart *Populus nigra* deutlich, was wiederum mit dem mangelnden Abschottungsvermögen zu erklären ist.

In den meisten Fällen beschränkten sich die Ausmaße der Verfärbung auf den Astholzbereich, der durch einen eigenen Holzaufbau charakterisiert ist (SHIGO, 1980 & 1984b; LIESE et al. 1988; DUJESIEFKEN et al. 1998). Ausnahmen waren einzelne Astflächen, die mit den Holz zersetzenden Pilzen inokuliert waren. Hier erstreckte sich die Verfärbung über den Astbereich bis ins Stamminnere hinein. Insgesamt war die Expansion der Verfärbung bei den mit Holz abbauenden Pilzen inokulierten Wunden signifikant größer als bei den mit *Trichoderma* sp. behandelten Astflächen. Studien von SHIGO (1984a), SCHWARZE (2002), SCHWARZE & BAUM (2000) und SCHWARZE et al. (2002) zeigen, dass durch das invasive Vordringen Holz

zersetzender Pilze und das Überwinden von Abwehrmechanismen (Reaktions-/Barrierezone) des Baumes sich der verfärbte Bereich sukzessive vergrößert. Signifikante Unterschiede zwischen den in den Inokulationsversuchen eingesetzten Holzzersetzern in Bezug auf die Verfärbung konnten nicht verzeichnet werden. Allerdings wurden die größten Ausmaße bei *G. adspersum* ermittelt, was darauf zurückzuführen ist, dass der Pilz auf Grund seiner höheren Holzabbaurate (Kapitel 3.1.3.2) und seiner Fähigkeit, polyphenolische Substanzen abzubauen, in der Lage war, tiefer ins Holz einzudringen (BAUM, 2000; SCHWARZE & FERNER, 2003).

Ein weiterer untersuchter Aspekt war die Wundüberwallung, die mit Hilfe des Kalluskoeffizienten dargestellt wurde. Die Baumarten zeigten hierbei signifikante Unterschiede bezüglich der überwallten Fläche. Diese Unterschiede zwischen den Baumarten sind sicherlich mit ihrer unterschiedlichen genetischen Anlagen zu erklären (SHIGO et al. 1977).

Durch die Kategorisierung der überwallten Fläche (Kapitel 3.2.2.3) wurde deutlich, dass die Wundheilung durch die Inokulation mit den Holz zersetzenden Pilzen, insbesondere durch *G. adspersum*, leicht verzögert wurde.

ASIEGBU et al. (1999); HARMAN & BJÖRKMAN (1998) und BAILEY & LUMSDEN (1998) berichteten zusammenfassend über die Möglichkeit einer Steigerung des Wachstums von Pflanzen durch *Trichoderma* spp. Bereits LINDSEY & BAKER (1967) konnten in ihrer Arbeit eine Förderung des Pflanzenwachstums bei unterschiedlichen Pilzen wie *Chaetomium* sp., *Rhizopus nigricans* und *Trichoderma* spp. durch Stimulierung der Wurzelaktivität feststellen.

In dieser Arbeit wurde weder ein positiver noch ein negativer Einfluss von *T. atroviride* auf das Kalluswachstum ermittelt.

Neben der genetischen Ausstattung der jeweiligen Baumart, der Aggressivität des Pilzes und der Jahreszeit, in der die Verletzung entstand, (ARMSTRONG et al. 1981) ist nach SHORTLE & SMITH (1990) die Wundgröße für die Wundüberwallung entscheidend. So konnte in dieser Arbeit eine signifikante negative Korrelation zwischen der Wundgröße und der Wundüberwallung hergestellt werden. Bei steigender Wundgröße nahmen der Kalluskoeffizient und damit die überwallte Fläche stark ab.

#### 4.2.1.3 Wirkungsgrad

Ein elementarer Aspekt der erfolgreichen biologischen Kontrolle von Schadorganismen ist letztendlich die Wirkung des Antagonisten im Feld (KLOEPPER, 1991; ELSHERIF & GROSSMANN, 1994; WODZINSKI et al. 1994). Aus diesem Grund wurden die künstlichen Inokulationsversuche (Versuch B) durchgeführt und der Wirkungsgrad [%] von *T. atroviride* gegen die eingesetzten Holz abbauenden Pilze (*Inonotus hispidus*, *Ganoderma adspersum* & *Polyporus squamosus*) nach der Formel von ABBOTT (1925) ermittelt.

Für die Festsetzung der Infektionsrate der einzelnen Holzersetzer dienten die Wunden, aus denen der jeweilige Pilz re-isoliert werden konnte (GADGIL & BAWDEN, 1982; GLASS & MCKENZIE, 1989; WARDLAW & NEILSON, 1999), unabhängig davon ob eine weit reichende Zersetzung sichtbar war oder sich diese nur auf den Astbereich beschränkte (SHIGO, 1984b).

Die höchste Infektionsrate bei den unbehandelten Wunden erzielte *G. adspersum*, gefolgt von *P. squamosus* und *I. hispidus*. Die erfolgreiche Infektion der unbeimpften Schnittflächen (Ø 78,7%) mit diesen Pilzen ist damit zu erklären, dass es sich um Pilzarten (*I. hispidus*, *P. squamosus*) handelt, die in der Lage sind, über Wunden (Splintholz) invasiv ins Holz einzudringen (JAHN, 1990; BUTIN, 1996; SCHWARZE et al. 1999) und über das Potenzial verfügen, wie *G. adspersum*, phenolische Substanzen abzubauen (BAUM, 2000; SCHWARZE & FERNER, 2003). Hinzu kommt zum einen, dass mit einem hohen Inokulum gearbeitet wurde, welches entscheidend für die Aggressivität der Pilze ist (REDFERN & FILIP, 1991; SCHLÖSSER, 1993), und zum anderen, dass die Inokulation unter optimalen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen für die Pilze erfolgte (Monatswerte: Ø Temperatur 23°C, Niederschlag 46,3mm).

Durch die vorherige *Trichoderma*-Beimpfung der Schnittflächen konnte die durchschnittliche Infektionsrate hochsignifikant reduziert werden, was einem Wirkungsgrad von 82,3% entsprach. Die stärkste (hochsignifikante) Wirkung wurde mit einem Wirkungsgrad von über 90% bei *I. hispidus* und *G. adspersum* verzeichnet. Dies ist insofern interessant, da diese Pilze sich in den *in vitro*-Tests als weitgehend sensitiv (anfällig) gegenüber *T. atroviride* 15603.1 erwiesen. Einen deutlich geringeren Wirkungsgrad mit 62,4% erzielte *T. atroviride* bei *P. squamosus*, was ebenfalls die Beobachtungen der Resistenz von *P. squamosus* gegenüber *Trichoderma* spp. aus den *in vitro*-Studien bestätigt (DUFFY et al. 2003). Dass *T.*

*atroviride* in der Lage war, die Infektionsrate bei *P. squamosus* zwar nicht hochsignifikant, aber dennoch signifikant und bei *I. hispidus* und *G. adpersum* hochsignifikant zu reduzieren, ist, wie bereits erwähnt, mit den optimalen klimatischen Bedingungen zu erklären. Diese ermöglichten eine optimale Etablierung auf den Schnittflächen. Des Weiteren wurde die Beimpfung mit dem Antagonisten 3 Wochen vor der Inokulation der Holzersetzer durchgeführt, was wiederum zur Folge hatte, dass sich der Antagonist bereits auf dem Substrat etablieren konnte, die Schnittfläche weitgehend mit seinem Myzel besiedelte und in dem frühen Stadium über eine hohe biologische Fitness (hohes antagonistisches Potenzial) verfügte (BRUNNER et al. 2005). Andere Studien zeigten ebenfalls, dass bestimmte *Trichoderma*-Arten (-Stämme) in der Lage sind, die Infektionsrate Holz zersetzender Pilze zu reduzieren. So konnte durch eine *T. viride* Applikation eine Besiedlung der Wunden von *Acer rubrum* für viele Monate durch Holzersetzer weit gehend verhindert werden (POTTLE & SHIGO, 1975). POTTLE et al. (1977) erzielte an derselben Baumart mit *T. harzianum* eine ähnlich hohe Wirkung. MERCER & KIRK (1984b) reduzierten mit *T. viride* erfolgreich eine Besiedlung von Wunden an Buche. Hingegen konnten SPIERS & BREWSTER (1997) keine signifikante Reduzierung der Infektionsrate von *Chondrostereum purpureum* an Weide (*Salix* spp.), Apfel (*Malus domestica*) und Pfirsich (*Prunus persica*) ermitteln.

Die in dieser Arbeit erzielten positiven Ergebnisse sollten allerdings mit Vorsicht betrachtet und nicht verallgemeinert werden. So ist an dieser Stelle zu betonen, dass es sich bei dem erzielten Wirkungsgrad um eine protektive Wirkungsweise handelte und dieses Ergebnis nicht ohne Einschränkung auf eine eradikative oder kurative Anwendung von *Trichoderma* sp. übertragen werden kann (AUST et al. 1999). So wies eine kurative Anwendung von *T. viride* gegenüber *Stereum purpureum*, dem Erreger des Bleiglanzes an *Prunus persica*, eine unzureichende Wirkung auf. (DUBOS & RICARD, 1974). Ferner kann nicht von einer generellen protektiven Wirkung von *T. atroviride* 15603.1 gegen *G. adpersum* und *I. hispidus* ausgegangen werden. So ist zu vermuten, dass durchaus Unterschiede zwischen Stämmen der Art *G. adpersum* und *I. hispidus* bezüglich der Aggressivität und der Resistenz gegenüber *Trichoderma* spp. existieren. Zwar zeigten beide in dieser Arbeit verwendeten *I. hispidus*-Stämme keine Unterschiede bezüglich der Sensitivität. Dagegen ermittelte GIOVANNINI et al. (2004) deutliche Differenzen zwischen *Grifola frondosa*- und *Fomitopsis pinicola*-Stämmen bezüglich der Resistenz gegen *T. viride*.

Ein weiterer Punkt, der berücksichtigt werden muss, ist die mangelnde Persistenz des Antagonisten. Auf Grund seiner Herkunft und durch zahlreiche andere Faktoren (siehe folgendes Kapitel) ist nur eine eingeschränkte Fähigkeit, im Substrat Holz zu verweilen, gegeben. Eine Infektion mit Wundparasiten wird nicht auf einen optimalen Zeitpunkt für den Antagonisten (hohe biologische Fitness), 3 Wochen nach der *Trichoderma*-Applikation beschränkt bleiben, sondern ist auch zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt möglich (RAYNER & BODY, 1988). Gegebenenfalls zu einem Zeitpunkt, da der Antagonist nicht mehr flächendeckend vorhanden und durch widrige Bedingungen seine biologische Fitness und damit einhergehend sein antagonistisches Potenzial eingeschränkt ist (KREDICS et al. 2003a).

#### **4.2.2 Persistenz von *T. atroviride* auf dem Substrat**

Wie bereits erwähnt, war die Persistenz des Antagonisten auf Grund seiner Herkunft und damit seiner fehlenden genetischen Anpassung auf den Schnittflächen stark eingeschränkt. Im Folgenden wird auf der Grundlage eigener Beobachtungen sowie Ergebnisse anderer Studien eine Darstellung der möglichen abiotischen und biotischen Faktoren, die die biologische Fitness und damit das Überdauern von *T. atroviride* beeinflusst haben, erfolgen. In Abbildung 75 sind die verschiedenen Einflussfaktoren zusammenfassend dargestellt.

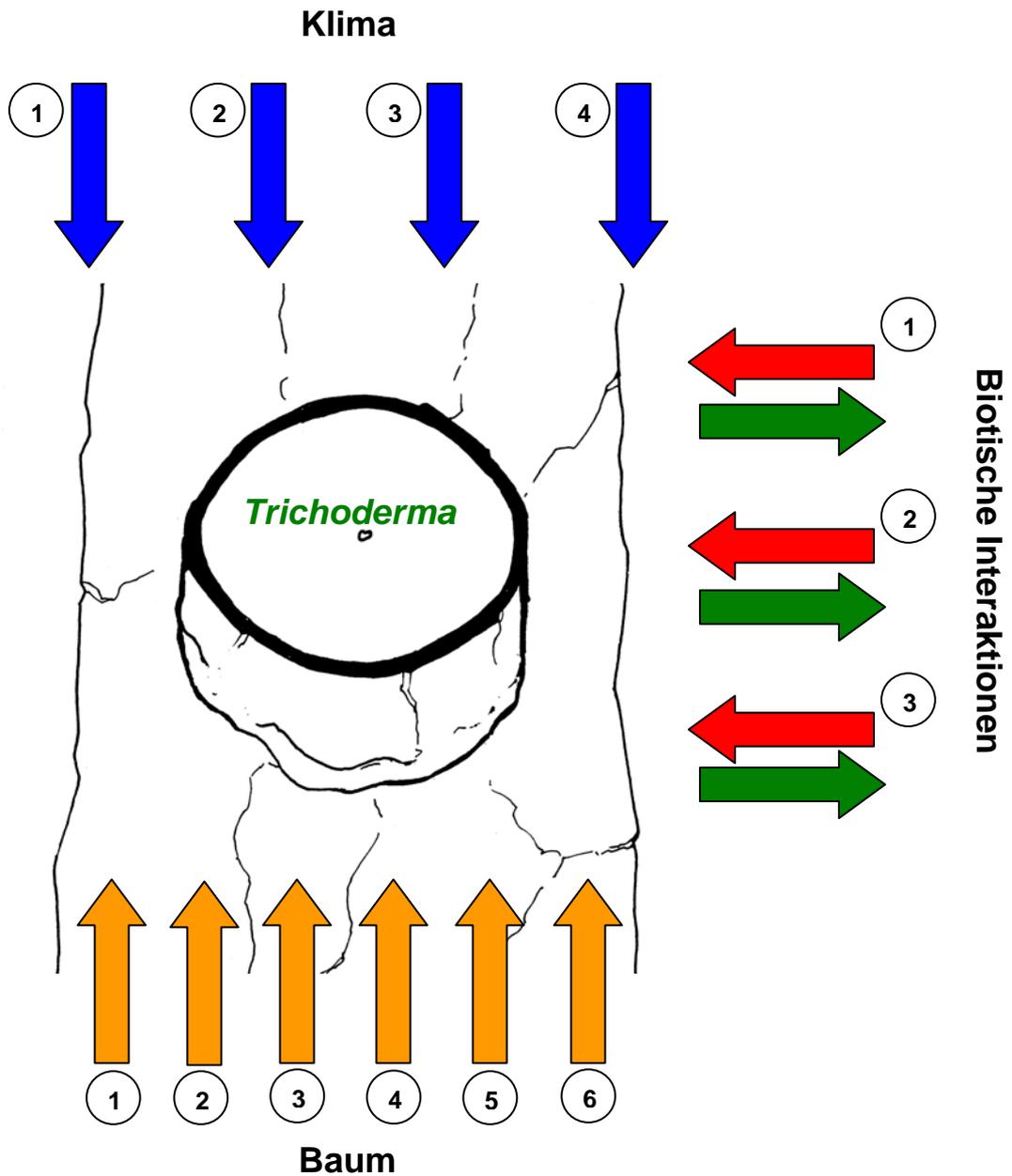
##### **4.2.2.1 Abiotische Einflussfaktoren**

In diesem Kontext werden vor allem die klimabestimmenden Parameter (UV-Strahlung, Niederschlag, Emissionen und Temperatur) als abiotische Faktoren zusammengefasst.

Wie bereits im Kapitel 4.1.4.1 zu den Wachstums- und Sporenkeimungstests ausführlich diskutiert, ist insbesondere die Wasserverfügbarkeit **(1)** ein elementarer Bestandteil für optimale Stoffwechselforgänge (LUARD & GRIFFIN, 1981; MAGAN, 1988; LUPO et al. 2002; KREDICS et al. 2003a). Dies wurde zusätzlich durch einen Vergleich der Re-Isolationsergebnisse von *T. atroviride* mit Klimadaten, die einen signifikanten Einfluss des Niederschlags auf die Isolationsrate ergaben, bestätigt. Durch Verletzungen, bei denen das Xylem der Bäume freigelegt wird, findet durch Luftfeinbruch im Laufe der Zeit eine Austrocknung der Wundfläche statt (MERCER, 1982; BOSTOCK & STERMER, 1989). Dies wird beschleunigt, wenn die Schnittfläche

vermehrt Sonneneinstrahlung **(2)** und Luftzirkulationen ausgesetzt ist (ARMSTRONG et al., 1981; DUJESIEFKEN et al. 1998; EISNER et al. 2002). Beruhend auf diesen Ausführungen wäre zu erwarten, dass insbesondere die Schnittflächen, welche in südlicher (westlicher) Richtung exponiert waren, durch die verstärkte Einstrahlung und damit schnelleren Austrocknung eine signifikant geringere Re-Isolationsrate aufweisen. Allerdings konnte nur eine Tendenz, aber keine statistische Abhängigkeit der Persistenz von der Himmelsrichtung festgestellt werden. Dies ist sicherlich damit zu erklären, dass sich die Wunden vorwiegend in Stammnähe befanden, durch die Krone (Äste & Blätter) weitgehend beschattet waren, wodurch der Effekt der Sonneneinstrahlung vermindert wurde. Die Strahlung besitzt zu den bereits genannten Punkten zusätzliche Auswirkungen auf den Antagonisten. Als einen durchaus positiven Effekt ist die Induzierung der Sporenbildung bei *Trichoderma* spp. durch UV-Strahlung zu erwähnen, die dadurch eine schnelle Ausbreitung auf dem Substrat möglich macht (BETINA & FARKAŠ, 1998). Bei lang anhaltender UV-Strahlung greift diese allerdings nicht nur in physiologische Vorgänge ein, sondern sie kann auch eine Variation im Genom von *Trichoderma* spp. induzieren (MIGHELI et al. 1994; HARMAN et al. 1998). Durch diese hervorgerufene Mutation kann das antagonistische Potenzial eines virulenten *Trichoderma*-Stammes eingeschränkt werden (HARMAN et al. 1998). Des Weiteren findet durch eine Sonneneinstrahlung eine Erwärmung statt. Die Temperatur **(3)** wiederum besitzt, wie bereits in Kapitel 4.1.4.1 besprochen, einen starken Wachstums limitierenden Effekt auf *Trichoderma* spp. (BADHAM, 1991; SAMUELS, 1996; KLEIN & EVERLEIGH, 1998). Allerdings ergab die Korrelationsanalyse mit den gewonnenen Re-Isolationsergebnissen von *T. atroviride* und den Klimadaten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Temperatur und Überdauern des Antagonisten (Re-Isolationsrate). Dies lässt den Schluss zu, dass die Temperatur, insbesondere da der Antagonist auf Grund seiner genetischen Anpassung mesophile Temperaturen bevorzugt (KREDICS et al. 2003a), das Wachstum signifikant beeinflusst, aber nicht unbedingt die Persistenz.

Ein weiterer Punkt der in diesem Zusammenhang erwähnt werden sollte ist die Emission **(4)** von Schadstoffen, die eventuell das Überdauern von *T. atroviride* auf dem Substrat negativ beeinflusst haben könnte. Allerdings zeigen Arbeiten von LYNCH & MOFFAT (2005) und HARMAN et al. (2005), dass *Trichoderma* spp. durchaus in der Lage ist, starke chemische Belastungen zu tolerieren und sogar für die mikrobiologische Sanierung schadstoffbelastender Böden eingesetzt wird.



**Abb. 75:** Skizzierung möglicher Einflussfaktoren auf die Persistenz von *T. atroviride*

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li><span style="color: blue;">▬</span> (1) Niederschlag</li> <li><span style="color: blue;">▬</span> (2) UV-Strahlung</li> <li><span style="color: blue;">▬</span> (3) Temperatur</li> <li><span style="color: blue;">▬</span> (4) Emissionen</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li><span style="color: green;">▬</span> (1) Bakterien</li> <li><span style="color: green;">▬</span> (2) <i>Fusarium</i> spp.</li> <li><span style="color: green;">▬</span> (3) sonstige Organismen / Endophyten</li> </ul>     |
| <ul style="list-style-type: none"> <li><span style="color: orange;">▬</span> (1) Nährstoffe</li> <li><span style="color: orange;">▬</span> (2) Stressmetaboliten</li> <li><span style="color: orange;">▬</span> (3) Reaktions-/Barrierezone</li> </ul>                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li><span style="color: orange;">▬</span> (4) Holzfeuchte</li> <li><span style="color: orange;">▬</span> (5) Organisationsstufe des Hydrosystems</li> <li><span style="color: orange;">▬</span> (6) Splint- Kernholz</li> </ul> |

#### 4.2.2.2 Biotische Wechselwirkungen

Unter den biotischen Interaktionen werden der Einfluss des Substrates (Baum) und die Interaktionen mit anderen Organismen zusammengefasst (Abbildung 75). Insbesondere das Substrat besitzt entscheidenden Einfluss auf die Persistenz des Antagonisten. Die Gründe für die starke Wirkung des Holzes auf die Dichte des Antagonisten werden in folgenden Punkten gesehen.

- (1) Beim Schnitt der Bäume treten die Zellsäfte (Cytoplasma) durch die Verletzung der Zellen und durch das erhöhte osmotische Potenzial vermehrt auf den Schnittflächen aus. Die verschiedenen austretenden Stoffe wie Zucker und Alkohole (ZIMMERMANN & ZIEGLER, 1975) dienen für viele Organismen u. a. auch *T. atroviride* als leicht verfügbare Kohlenstoffquellen und ermöglichen eine schnelle Entwicklung auf den Schnittflächen (REIß, 1986). Bei einem Verbrauch dieser Stoffe kann es bei *T. atroviride*, da er nicht in der Lage ist, Holz als Nährstoffquelle weit reichend zu erschließen, zu einem Versorgungsmangel an elementaren Nährstoffen und dadurch zu einer Minderung der Fitness kommen.
- (2) Im Splintholz werden nach Verletzungen neben diesen für Antagonisten positiven Stoffen auch fungistatisch und sogar fungitoxisch wirkende Stressmetaboliten (Alkaloide, Stilbene, Phenylpropanoide usw.), die eine Entwicklung von Organismen verlangsamen oder ganz unterbinden können, ausgeschieden (KEMP & BURDEN, 1986; VENÄLÄINEN et al. 2003). Beruhend auf den Ausführungen muss eine mögliche Beeinträchtigung der Entwicklung von *T. atroviride* auf dem Substrat durch diese Substanzen (Phytoalexine) in Betracht gezogen werden.
- (3) In diesem Zusammenhang sind die Reaktionszonen und Barrierezonen, die zusätzlich zu diesen Phytoalexinen auch Einlagerungen von polyphenolischen Substanzen beinhalten zu nennen. So findet in den Zelllumina eine Verthyllung und in den Zellwänden eine Inkrustierung mit Lignin sowie Adkrustierung mit Suberin statt (BIGGS, 1987). Die Einlagerungen dienen dazu, invasive Organismen aufzuhalten und zu kompartimentieren (SHIGO, 1984a; PEARCE, 2000; VENÄLÄINEN et al. 2003). Durch diese in Wundnähe pilzwidrigen Umstände war für den Antagonisten ein tieferes Eindringen ins Holz stark erschwert (Kapitel 3.2.2.1)
- (4) Die Holzfeuchte, wie bereits ausführlich in den vorherigen Kapiteln 4.1.4.1 & 4.2.2.1) besprochen, hatte mit Sicherheit einen entscheidenden Einfluss auf die Persistenz.

- (5) Wie die gewonnen Re-Isolationsergebnisse aus Versuch A zeigten, war die Entwicklung und Persistenz des Antagonisten auf dem Kernholz stark eingeschränkt (Kapitel 3.2.1.1). Beruhend auf den vorherigen Ausführungen wird deutlich, dass das Kernholz zum einen durch seine geringe Holzfeuchte und zum anderen durch die Einlagerung an pilzwidrigen Substanzen einen entscheidenden Einfluss auf die räumliche Verteilung des Antagonisten auf den Schnittflächen hatte. Bereits SHIGO & HILLS (1973) beschrieben die spezifischen und für viele Mikroorganismen widrigen Charakteristika des Kernholzes. Im Widerspruch zu diesen Ausführungen steht allerdings, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen Splint- und Kernholzbäumen in Bezug auf die Re-Isolationsrate ermittelt wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die durchschnittliche Wundgröße 8 cm betrug und damit auch viele Schnittflächen beprobt wurden, bei denen der Kernholzanteil sehr gering bzw. noch nicht ausdifferenziert war. Diese Annahme wird zudem bestätigt, dass bei zunehmender Wundgröße die Re-Isolationsrate von *T. atroviride* deutlich abnahm und dies wiederum mit dem steigenden Anteil von Kern- zu Splintholz zu erklären ist.
- (6) Die histologischen Studien ergaben, dass *T. atroviride* vorwiegend in den Parenchymzellen vorkommt und sich über Tüpfelverbindungen ausbreitet (Kapitel 4.1.3.1). Aus diesem Grund ist die Organisationsstufe des Hydrosystems, welche die Zellelemente (Parenchymzellen) und ihre Anordnung im Holz widerspiegelt (BRAUN, 1982), für die räumliche Verteilung des Antagonisten auf dem Substrat mit entscheidend. Es ist damit zu rechnen, dass durch einen erhöhten Anteil an lebenden Zellen die Verbreitung und damit die Persistenz des Antagonisten verbessert wird.

Die Isolationsergebnisse der Versuche A und B zeigten, dass der neu geschaffene Raum (Schnittflächen) von zahlreichen Organismen sukzessive besetzt wurde (Kapitel 3.2.1.2 & 3.2.2.2). Die Wechselbeziehungen mit anderen Organismen stellen somit einen weiteren bedeutenden Punkt im Kontext der Persistenz von *T. atroviride* dar. Nach KLEIN & EVELEIGH (1998) kann eine detaillierte Erfassung aller Interaktionen zwischen Organismen wegen der großen Komplexität nur ansatzweise erfolgen. LOCKWOOD (1992) und WICKLOW (1992) versuchten in einem entwickelten ökologischen Konzept die Interaktionen zwischen pilzlichen Populationen untereinander und mit anderen Organismen einzugrenzen. Sie beschrieben, dass die

Interaktionen vorwiegend durch Konkurrenz um die Ressourcen Nahrung und Raum hervorgerufen werden und meist mittels zwei unterschiedlichen Strategien erfolgen (*exploitation competition* & *interference competition*). LOCKWOOD (1992) definierte die „*exploitation competition*“ als eine Konkurrenz, die nur auf eine schnellere Erschließung der knappen Ressourcen ohne direkte Interaktion (Hemmung) des Konkurrenten beruht. Die „*interference competition*“ dagegen geht von einer direkten chemischen oder mechanischen Interaktion aus, die es einem Organismus ermöglicht, durch Hemmung eines Anderen die Ressourcen zu erschließen (WICKLOW, 1992). In der Regel werden beide Strategien von einem Organismus verfolgt.

Neben der Gattung *Alternaria* und *Fusarium* nahmen die Bakterien einen großen Anteil an der Gesamtzahl der isolierten Organismen ein. Beruhend auf den vorherigen Ausführungen ist davon auszugehen, obwohl kein statistischer Zusammenhang zwischen diesen Organismen und fehlender Persistenz des Antagonisten hergestellt wurde, dass die auf den Schnittflächen isolierten Pilze und Bakterien direkt (*interference competition*) und/oder indirekt (*exploitation competition*) mit *T. atroviride* interagierten. Bereits SIMON & SIVASITHAMPARAM (1988) ermittelten in künstlichen Inokulationsversuchen einen hemmenden Einfluss verschiedener Bakterien **(1)** auf *Trichoderma* spp. In ähnlichen *in vitro*-Tests zeigten vor allem die Bakterien *Clavibacter michiganese* und *Pseudosomas syringae* eine signifikante Hemmwirkung gegen *Trichoderma* spp., die auf eine Produktion antibiotischer Substanzen zurückzuführen war (NAÁR & KECSKÉS, 1998). Die Autoren NAÁR & KECSKÉS (1998) und KREDICS et al. (2003a) beschreiben den Einfluss der Bakterien auf *Trichoderma* spp. als eine entscheidende Größe im Kontext der biologischen Kontrolle. Dies wird dadurch bestätigt, dass *Agrobacterium tumefaciens* in der Lage ist, die Enzyymbildung bei *T. atroviride* zu unterdrücken und damit das antagonistische Potenzial einzuschränken (ZEILINGER, 2004). Eine ähnliche Situation ergibt sich bei der Betrachtung der möglichen Interaktionen zwischen *Fusarium* spp. **(2)** und *T. atroviride*. Zwar existieren Studien, in denen *Trichoderma* spp. ein hohes antagonistisches Potenzial gegen *Fusarium*-Arten aufwies (CHET, 1990; SCARSELLETTI & FAULL, 1994; SCHIRMBÖCK et al. 1994; COONEY & LAUREN, 1998). Demgegenüber ermittelte LUTZ et al. (2003), dass das von *Fusarium culmorum* und *F. graminearum* ausgeschiedene Mycotoxin in der Lage ist, die Genexpression von

ech42 und damit die Bildung des Enzyms Chitinase bei *Trichoderma* spp. zu unterdrücken.

Inwieweit andere Organismen **(3)** mit dem Antagonisten auf den Schnittflächen interagierten, kann auf Grund fehlender Arbeiten nur spekuliert werden. Zusätzlich zu den Organismen, welche sich sukzessive auf den Schnittflächen angesiedelt haben, ist eine Interaktion zwischen *Trichoderma* sp. und endophytischen Pilzen und Bakterien nicht auszuschließen (CHAPELA, 1989, BROOKS et al. 1994; EVANS et al. 2003). Hinzu kommt, dass die Persistenz nicht nur durch interspezifische Konkurrenz, sondern auch durch intraspezifische Wechselwirkungen beeinträchtigt werden konnte. So erwähnt HARMAN et al. (1998) die Möglichkeit, dass durch eine Verschmelzung von Myzelien (Plasmo- Karyogamie) zweier *Trichoderma*-Stämme, die über ein unterschiedliches antagonistisches Potenzial verfügen, die Fähigkeiten des potenten Stammes verloren gehen kann.

#### **4.2.3 Diskussion zur Pilzanalyse**

Mit Hilfe der Diversitäts-Indices werden die Artenzahl und Abundanz, mit der jede Art vertreten ist, miteinander verbunden (LUDWIG & REYNOLDS, 1988). Durch dieses Vorgehen wird die quantitative Erfassung und Darstellung der Diversität sowie Vergleiche verschiedener definierter Räume erleichtert. Die in dieser Arbeit verwendeten Indices waren der Shannon-Weaver- und Margalef-Index sowie der Verteilungswert E (Evenness), die bereits von einigen Autoren zur Charakterisierung von Pilzpopulationen herangezogen wurden (MARIA & SRIDHAR, 2002; RICHARD et al. 2005; PAULUS & GADEK, 2006).

Die Auswertung dieser Diversitäts-Indices ließ im zeitlichen Verlauf durch steigende Werte eine sukzessive Besiedlung der Schnittflächen erkennen. Diese Sukzession an Bakterien und Pilzen wurden ebenfalls von SHIGO (1984b) und SPIERS & BREWSTER (1997) beobachtet. FRANKLAND (1992) beschreibt, dass die Flächen zuerst von schnell wachsenden ubiquitären Organismen besiedelt werden, die dann wiederum die Etablierung und Entwicklung anderer Pilze auf der jeweiligen Fläche begünstigen. Interessant war in diesem Zusammenhang, dass der Verteilungswert E keine dominanten Gattungen auf den Schnittflächen erkennen ließ und dies ebenfalls als ein Indiz für eine natürlich ablaufende Sukzession gesehen werden kann (PAULUS & GADEK, 2006).

SMITH et al. (1981) postulierte, dass einige Pilze wie *Phialophora melinii*, die im Zuge der Sukzession auf den Schnittflächen auftreten, in der Lage sind, die phenolischen Substanzen der Reaktionszonen zu modifizieren, so dass die Resistenz gegen eine Besiedlung von Holz abbauenden Pilzen eingeschränkt wird. Nach SMITH et al. (1981) konnte durch eine Beimpfung der Schnittflächen mit *T. harzianum* eine Besiedlung mit *Phialophora*-Arten reduziert werden und dadurch die Widerstandskraft der RZ gegen Fäuleerreger erhalten bleiben (passive Resistenz). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen mittels der Diversitäts-Indices und des Verteilungswertes E ergaben, dass die beimpften Schnittflächen eine deutlich verminderte Diversität aufwiesen und *T. atroviride* als dominante Gattung vorherrschend war. Der Antagonist war also in der Lage, andere Pilzarten zu verdrängen (substituieren). Inwieweit dadurch eine Modifizierung verhindert und die Widerstandskraft der Reaktionszone gegen Fäuleerreger erhalten werden konnte, ist wegen fehlender Daten nicht abschließend zu klären. Hierzu hätten quantitative Messungen phenolischer Verbindungen an den beimpften und unbeimpften Schnittflächen erfolgen müssen. Wegen Zeitmangels konnten diese Arbeiten leider nicht durchgeführt werden.

#### **4.2.3.1 Pilzidentifikation**

Einen Großteil der in dieser Arbeit durchgeführten Tätigkeiten nahmen die Pilzidentifikationen ein. Neben der klassischen Bestimmung anhand Bestimmungsschlüssel wurden bei *Trichoderma* spp. und den eingesetzten Holz abbauenden Pilze zusätzlich molekularbiologische Verfahren zur Charakterisierung herangezogen.

##### **4.2.3.1.1 Klassische Methodik**

Die konventionelle Identifikation der Organismen, welche nicht der Gattung *Trichoderma* angehörten, erfolgte mit Hilfe verschiedener Bestimmungsschlüssel anhand makro- und mikromorphologischer Merkmale (STALPERS, 1978; DOMSCH et al. 1980, VON ARX, 1981, WEBSTER, 1983, WANG et al. 1990, ROSE, 1993; BARNETT & HUNTER, 1998; ESSER, 2000). Die hierbei verwendeten Schlüssel ließen eine ausreichende Eignung für eine Identifikation auf Gattungs- und Artebene erkennen. Für die Bestimmung der *Trichoderma*-Isolate kamen die Schlüssel von RIFAI (1969), BISSETT (1984, 1991a,b,c, 1992) sowie GAMS & BISSETT (1998) zur Anwendung. In

vielen Fällen waren die Form und Pigmentation der Konidien, Chlamydosporen und Phialiden sowie der Verzweigungstyp der Konidiophoren nicht ausreichend, um einen phylogenetischen Zusammenhang zwischen *Trichoderma*-Arten herzustellen. Insbesondere die große Variabilität der makro- und mikromorphologischen Merkmale innerhalb einer Art, aber auch die Ähnlichkeiten der Konidiophoren, Phialiden und anderer Eigenschaften zwischen den Arten erschwerten eine exakte taxonomische Differenzierung. Diese Unzulänglichkeiten der morphologischen Merkmale der Gattung *Trichoderma* führten in der Vergangenheit mehrmals zu Fehlidentifikationen und damit zu einigen Kontroversen (KULLNIG et al., 2001; SAMUELS, 2006).

#### **4.2.3.1.2 Molekularbiologische Charakterisierung**

Durch die Implementierung von molekularbiologischen Verfahren zur Identifikation war ein gesichertes Monitoring des eingesetzten Antagonisten im Feld möglich (ABBASI et al. 1999; AVIS et al. 2001; DODD et al. 2004a,b). Hierbei kamen unterschiedliche Verfahren zur Anwendung: DNS-Sequenzierung, RAPD, Mikrosatelliten.

Die DNS-Sequenzierung der ITS-Region 1 und 2 ermöglichte sowohl bei *Trichoderma* spp. (HERMOSA et al. 2000; ANTAL et al. 2002; KUBICEK et al. 2003; PRYCE et al. 2003; WUCZKOWSKI et al. 2003; HERMOSA et al. 2004; MAYMON et al. 2004) als auch bei den eingesetzten Holz abbauenden Pilzen (HSEU et al. 1996; JASALAVICH et al. 2000) eine (Re-) Identifikation. Die erhaltenen Basenpaare (ca. 750) waren für eine Bestimmung auf Artebene ausreichend, aber nicht für eine Untersuchung auf Stammebene. So wurde für spezifische phylogenetische Studien zwischen *Trichoderma*-Stämmen von HERMOSA et al. (2004) deutlich weniger Basenpaare (ca. 200) amplifiziert. Für eine exakte Identifikation von Holz zersetzenden Pilze erfolgte nach OH et al. (2003) die Amplifizierung der ITS 1 und 4 Region.

Auf Grund des relativ großen Zeitaufwandes war die Bestimmung vieler Isolate mittels der DNS-Sequenzierung nur bedingt geeignet. Mit dem RAPD-Verfahren (*Random Amplified Polymorphic DNA*) war es möglich, in kurzer Zeit mehrere *Trichoderma*-Isolate zu untersuchen (RANGANATH & SHYAM PRASAD SHEEBA 2002; WILLIAMS et al. 1990; ZIMAND et al. 1994; CASTLE et al. 1998; LIECKFELDT et al. 1998; CHEN et al. 1999; McLEAN et al. 2005). Voraussetzung hierbei war, dass bekannte Referenzstämme vorhanden waren. Durch dieses Vorgehen konnten die

*Trichoderma*-Isolate aus den behandelten Wunden als die applizierte Art *T. atroviride* bestimmt werden. Allerdings konnte auch mit diesem Verfahren auf Grund der indifferenten Ergebnisse bei der Stamm-Unterscheidung keine endgültige Aussage getroffen werden, ob es sich bei den Isolaten um den applizierten Stamm *T. atroviride* 15603.1 handelte.

TENZER et al. (1999), LI et al. (2002) und ENKERLI et al. (2005) amplifizierten wegen der hohen Stammspezifität Mikrosatelliten der Pilze *Venturia inaequalis* und *Metarhizium anispliae*. NAEF et al. (2006) verwendete ebenfalls Mikrosatelliten um eine Re-Identifikation von *T. atroviride* zu gewährleisten. Beruhend auf diesen Ausführungen wurde eine Verifizierung des Stammes mit Hilfe der MP-PCR versucht. Es zeigte sich, dass die verwendeten stammspezifischen Primer nur unzureichend geeignet waren. Wie bereits bei der RAPD-PCR war auch hier keine endgültige Aussage bezüglich einer Stamm-Unterscheidung möglich. Aus Zeitmangel wurde dieses Verfahren nicht weiter verfolgt.

Abschließend bleibt zu konstatieren, dass in dieser Arbeit kein endgültiger Nachweis möglich war, ob es sich bei den *Trichoderma*-Isolaten um den applizierten Stamm *T. atroviride* 15603.1 handelte. Für diesen Nachweis sind oft einzelne Verfahren nicht ausreichend und nur eine Verwendung mehrerer Methoden Ziel führend (MAYMON et al. 2004). Allerdings wurde durch die Verwendung dieser molekularbiologischen Verfahren alle untersuchten Isolate, die aus den beimpften Schnittflächen re-isoliert wurden, als die Art *T. atroviride* identifiziert. Wegen dieser großen Anzahl an Übereinstimmungen auf Artebene ist es statistisch unwahrscheinlich, dass es sich bei diesen *Trichoderma*-Isolaten um unterschiedliche Stämme handelte.

#### **4.2.4 Formulierung und Applikation**

Für die erfolgreiche Anwendung eines biologischen Verfahrens ist der Aspekt der Etablierung des Antagonisten auf dem jeweiligen Substrat mit entscheidend. In dieser Arbeit wurden für die *Trichoderma*-Applikation unterschiedliche Verfahren formuliert und getestet.

#### 4.2.4.1 Verfahren

Die Konzentration der CFU-Einheiten des Antagonisten wurde für alle Verfahren auf  $10^5$  Sporen/mm eingestellt. HARMAN & BJÖRKAN (1998) und HJELJORD et al. (2001) beobachteten, dass paradoxerweise höher gewählte Konzentrationen an Sporen, wegen verminderter Keimfähigkeit, nicht zwangsläufig zu einer verbesserten Etablierung führen.

Für das Keimen der Sporen ist, wie bereits ausführlich besprochen, neben genügend Nährstoffen (DANIELSON & DAVEY, 1973b) insbesondere die Wasserverfügbarkeit elementar (MARTÍN & NICOLÁS, 1970). HJELJORD et al. (2001) und HJELJORD & TRONSMO (2003) konnten nachweisen, dass durch eine Nährstoffzugabe das Keimen der Sporen von *T. atroviride* beschleunigt und die Keimungsrate erhöht wurde. Allerdings erwähnten die Autoren in diesem Zusammenhang, dass die mit Nährstoffen angereicherten Sporen einen erhöhten Wasserbedarf hatten und deutlich empfindlicher auf Wassermangel (signifikant reduzierte Keimungsrate) reagierten. Diese Beobachtungen könnten eine Erklärung sein, warum das Verfahren C die höchste Re-Isolationsrate aufwies und das Verfahren B in der Wirkung so stark zwischen den Standorten Ludwigshafen und Straßburg differierte. Da in Straßburg die Applikation des Antagonisten unter weitgehend optimalen Bedingungen erfolgte (Ø Temperatur: 17,8°C, Niederschlag 49,5mm), bewirkte die Nährstoffzugabe (Verfahren B) eine Steigerung der Keimungsrate und dadurch eine bessere Etablierung des Antagonisten auf den Schnittflächen. In Ludwigshafen dagegen herrschten in Bezug auf die Feuchtigkeit suboptimale Bedingungen (Ø Temperatur: 22,6°C, Niederschlag 29,5mm) und dies hatte zur Folge, dass der erhöhte Wasserbedarf der angereicherten Sporen nicht gesättigt werden konnte und die Nährstoffzugabe somit einen reduzierenden Effekt auf die Keimungsrate besaß.

Bei dem Verfahren C wurden die Sporen ebenfalls mit Nährstoffen versehen, aber durch die Verwendung des feuchtigkeitsspeichernden Gels (Luquasorb 1030) wurde für eine gewisse Zeit eine konstante Wasserverfügbarkeit gewährleistet und somit die Keimungsrate signifikant im Vergleich zu den restlichen Verfahren erhöht.

Eine Steigerung der Etablierung von *Trichoderma* spp. durch eine erhöhte Wasserverfügbarkeit wurde ebenfalls von MERCER & KIRK (1984b), BATTÀ (2004) und JAYARAJ et al. (2006) erreicht. Ein weiterer positiver Effekt war, dass das Gel gleichzeitig als Trägerstoff für die Sporen fungierte. Dadurch waren eine bessere

Haftung und eine gleichmäßigere Verteilung der Sporen auf den Schnittflächen gegeben (BATTA, 2004; JAYARAJ et al. 2006).

Insgesamt scheinen die Verfahren A und B wegen der unzureichenden durchschnittlichen Re-Isolationsraten aus den behandelten Wunden nicht geeignet, den Antagonisten auf den Schnittflächen zu etablieren. Darüber hinaus existiert bei allen Verfahren eine starke Abhängigkeit des Etablierungserfolges von den jeweiligen vorherrschenden klimatischen Bedingungen (Applikationszeitpunkt).

#### **4.2.4.2 Beeinträchtigungen von Nicht-Ziel-Organismen**

Für eine Anwendung des Antagonisten (*T. atroviride*) im Feld sollten neben seiner Wirkung gegen phytopathogene Pilze (Zielorganismen) ebenfalls mögliche Beeinträchtigungen von Nicht-Ziel-Organismen weitgehend bekannt bzw. kalkulierbar sein (HJELJORD & TRONSMO, 1998). So sind Fälle bekannt, in denen *Trichoderma* spp. wegen seiner mycoparasitischen Fähigkeiten größere Schäden an kommerziellen Champignon- und anderen Speisepilzkulturen verursachte (CASTLE et al. 1999; OSPINA-GIRALDO et al. 1999; WILLIAMS et al. 2003a).

Inwieweit eine Applikation und somit eine Erhöhung des Sporendrucks von *T. atroviride* einen negativen Einfluss auf Arthropoden, Vertebraten und damit eingeschlossen auf den Menschen besaß, kann auf Grund fehlender Studien nicht abschließend beantwortet werden.

Nach NEVALAINEN & NEETHLING (1998) sind keine stärkeren negativen Folgen einer *Trichoderma*-Applikation zu erwarten. Durch das kosmopolitische Vorkommen der Gattung *Trichoderma* wird bei einer Applikation der Antagonist in keinen für ihn fremden Lebensraum entlassen, sondern ausschließlich seine Verfügbarkeit im Zielgebiet erhöht. Dadurch werden unkontrollierte negative Einflüsse auf Flora und Fauna weitgehend minimiert (NEVALAINEN & NEETHLING, 1998).

Im Allgemeinen wird die Gattung *Trichoderma* für den Menschen als ungefährlich eingestuft (NEVALAINEN & NEETHLING, 1998). Allerdings existieren neuere Arbeiten, die belegen, dass einige *Trichoderma*-Arten in der Lage waren, zum einen allergische Reaktionen wie Sinusitis und Asthma auszulösen (JAAKKOLA et al. 2002; TANG et al. 2003) und zum anderen bei immunsupprimierten Patienten eine invasive Infektion hervorzurufen (KUHLS et al. 1999; CHOUAKI et al. 2002; KREDICS et al. 2003b). Als Auslöser dieser Symptome werden hauptsächlich die Arten *T. longibrachiatum* und *T. citrinoviride* verantwortlich gemacht (KUHLS et al. 1999;

CHOUAKI et al. 2002; TANG et al. 2003; KREDICS et al. 2003b). Hierbei handelt es sich um Arten, die vorwiegend in geschlossenen Räumen vorkommen und sich weitgehend an die Bedingungen von hohen Temperaturen angepasst haben (SAMUELS, 2006). Diese Ausführungen lassen zumindest ein erhöhtes Risiko für die Arbeiter, die eine *Trichoderma*-Applikation durchführen, erkennen. Allerdings muss hier erwähnt werden, dass die gesundheitsgefährdenden Komplikationen in geschlossenen Räumen und ausschließlich von Arten der Sektion *Longibrachiatum* hervorgerufen wurden. Bislang liegen keine Anzeichen einer Beeinträchtigung der Gesundheit durch *T. atroviride* (Sektion *Trichoderma*) vor. Des Weiteren ist durch die Anwendung im Freien und damit einhergehend durch die Luftverwehungen der Sporendruck deutlich reduziert. Auf Grund dessen kann zum jetzigen Stand ein erhöhtes Risiko einer Gesundheitsgefährdung durch eine *T. atroviride*-Applikation ausgeschlossen werden.

#### 4.3 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

In vielen Studien wurde mit Hilfe verschiedener *in vitro*-Versuche geeignete (potente) *Trichoderma*-Arten (-Stämme) für einen späteren Einsatz zur biologischen Kontrolle phytopathogener Pilze selektiert (BELL et al, 1982; GOLDFARB et al. 1989; CHET, 1990; BRUCE, 1992; SCHOEMAN et al. 1996; CANESSA & MORRELL, 1997; ROCO & PÉREZ, 2001; CLARKSON et al. 2004).

Auch in dieser Arbeit erwies sich das systematische *in-vitro*-Screening als effektiv, um unter Berücksichtigung der wichtigsten Mechanismen im Antagonismuskomplex und den wichtigsten Einflussfaktoren einen gegen Holzabbauende Pilze virulenten Stamm zu selektieren. Auf Grund der nicht unumstrittenen Übertragbarkeit der *in vitro*-Ergebnisse auf eine erfolgreiche Anwendung im Feld stellten sich die *ad planta*-Versuche als eine sinnvolle und unverzichtbare Ergänzung dar. Die erzielten Ergebnisse und Beobachtungen lassen die Möglichkeit einer erfolgreichen biologischen Kontrolle (Reduzierung der Infektionsrate) Holz zersetzender Pilze durch eine protektive Anwendung von *Trichoderma* spp. erkennen. Die gezielte Steigerung der Verfügbarkeit des potenten Antagonisten auf dem Zielsubstrat gewährleistet zudem eine Ausnutzung natürlicher Regulationsmechanismen und dadurch eine hohe Umweltverträglichkeit. So könnte die *Trichoderma*-Applikation

eine Alternative zu den auf chemischen Stoffen basierenden Wundbehandlung (Wundverschlussmittel) darstellen.

Allerdings erfolgt die Anwendung von *Trichoderma* spp. im Feld, d.h. in einem offenen System, welches durch die große Anzahl an möglichen Wechselwirkungen eine ausgesprochen hohe Komplexität aufweist. Eine Determinierung und Abschätzung aller Einflussfaktoren ist auf Grund dessen nahezu unmöglich und eine absolute und stetige Wirkung mittels eines biologischen Verfahrens schwer zu erreichen. In diesem Zusammenhang sind folgende Punkte zu nennen:

- Die Applikation des Antagonisten ist nicht zu jeder Zeit möglich. Der Etablierungserfolg von *Trichoderma* sp. war stark von den vorherrschenden Witterungsverhältnissen abhängig.
- Die Wirkung (biologische Fitness) von *Trichoderma* spp. unterliegt schwer vorhersagbaren Schwankungen – Keine DIN-Norm
- Eine Regulation des gesamten Schaderregerspektrums ist nicht möglich. Es existierten deutliche Unterschiede zwischen den eingesetzten Holz abbauenden Pilzen in Bezug auf die Resistenz (Bsp. *P. squamosus*).
- Wegen des langwierigen Prozesses der Wundheilung (Überwallung) ist die Persistenz des Antagonisten für den Erfolg mit entscheidend. Diese war über einen längeren Zeitraum wegen fehlender Anpassung und mehrerer anderer Faktoren bei *T. atroviride* eingeschränkt.

Die in den *in vitro* und *ad planta* Studien gewonnenen Ergebnissen sind sehr vielversprechend und lassen das Potenzial einer erfolgreichen biologischen Kontrolle Holz zersetzender Pilze erkennen. Deshalb wäre es wünschenswert, in weiterführenden *in vitro*-Screenings zum antagonistischen Potenzial neue Antagonist/Pathogen-Kombinationen unter Berücksichtigung kombinierter Einflussparameter zu untersuchen. Hierbei sollten Isolate Verwendung finden, die aus dem späteren Zielgebiet stammen. Durch dieses Vorgehen könnten genetisch bedingte Anpassungsprobleme der Antagonisten reduziert werden. Darüber hinaus wäre es von Interesse, in Langzeitstudien die Applikationsverfahren zu verbessern und die Persistenz des Antagonisten mit einem noch spezifischeren Monitoring zu bonitieren. Die in dieser Arbeit etablierten molekularbiologischen Verfahren, welche sich als eine unverzichtbare Ergänzung für die *Trichoderma*-Identifikation darstellten, sollten dahingehend modifiziert werden, dass eine Stammunterscheidung möglich ist.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Vor dem Hintergrund bereits existierender Studien über die erfolgreiche Anwendung von Antagonisten zur Regulation phytopathogener Pilze, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zum Einsatz von *Trichoderma*-Arten für die biologische Kontrolle von Holz zersetzenden Pilzen an Bäumen durchgeführt. Ein *in vitro*-Screening zum antagonistischen Potenzial hatte zum Ziel, einen geeigneten und gegen die Holz abbauenden Pilze *Ganoderma adspersum*, *Ganoderma lipsiense*, *Inonotus hispidus*, *Polyporus squamosus* und *Kretzschmaria deusta* virulenten *Trichoderma*-Stamm zu selektieren. Dabei kamen unter anderem Dualkultur- und Interaktions-Tests an Holz sowie Studien zum Wachstum- und Sporenverhalten unter Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren zur Anwendung. Die Implementierung der Durchlicht-Hellfeld- und Rasterelektronenmikroskopie erlaubte eine genaue Beobachtung der Interaktionen zwischen Antagonist und Pathogen. Ferner wurde der Effekt von *Trichoderma* spp. auf den Holzabbau und die Fäuledynamik der Holz zerstörenden Pilze mittels Gewichtsverlustmessungen sowie histologischen Studien analysiert.

Ergänzend wurden *ad planta* Studien an verschiedenen Standorten und Bäumen durchgeführt. Im Focus dieser künstlichen Inokulationsversuche stand zum einen die Formulierung eines Verfahrens, das den Antagonisten optimal auf dem Substrat etabliert, und zum anderen sollte die Persistenz sowie die protektive Wirkung bonitiert werden. Hierbei wurden für das Monitoring des Antagonisten in regelmäßigen Abständen standardisierte Re-Isolationen unter Berücksichtigung der Faktoren Entnahmeort, Exposition und Baumart vorgenommen. Die Identifikation der dabei gewonnenen Isolate erfolgte einerseits nach der konventionellen auf makro- und mikromorphologischen Merkmalen basierenden Methode und andererseits mit diversen molekularbiologischen Verfahren. Mit Hilfe der Diversitäts-Indices war es zudem möglich, eine sinnvolle Interpretation und Charakterisierung der isolierten Pilzpopulationen, der Diversität sowie Sukzession vorzunehmen.

Nachfolgend werden die wichtigsten Ergebnisse in Kurzform dargestellt:

I. Die *Trichoderma*-Arten ließen in den *in vitro*-Versuchen ein antagonistisches Potenzial gegen Holz abbauende Pilze erkennen. Hierbei existierten allerdings signifikante Unterschiede zwischen den eingesetzten Arten und Stämmen.

II. Die Holz zersetzenden Pilze differierten signifikant in Bezug auf die Sensitivität gegenüber einer *Trichoderma*-Applikation. *Polyporus squamosus* ließ in den meisten Labortests eine weitgehende Resistenz erkennen.

III. Ein Einfluss physikalischer und chemischer Parameter auf das Wachstum- und Sporenverhalten sowie auf das antagonistische Potenzial von *Trichoderma* spp. wurde insbesondere bei den Einflussgrößen Temperatur und Wasserverfügbarkeit verzeichnet.

IV. Einzig das Verfahren C mit dem feuchtigkeitsspeichernden Gel als Trägersubstanz war in der Lage, den Antagonisten auf dem Substrat zufrieden stellend zu etablieren. Zusätzlich unterliegt die *Trichoderma*-Applikation einer starken Abhängigkeit von den vorherrschenden klimatischen Bedingungen.

V. *Trichoderma atroviride* 15603.1 erzielte in den künstlichen Inokulationsversuchen einen hochsignifikanten protektiven Wirkungsgrad gegen die Holz abbauenden Pilze *Inonotus hispidus* und *Ganoderma adspersum* sowie einen signifikanten gegen *Polyporus squamosus*.

VI. Das Monitoring ließ eine eingeschränkte Persistenz des Antagonisten auf den Schnittflächen erkennen. Neben seiner fehlenden genetischen Anpassung waren klimatische Parameter und insbesondere das Substrat (Stressmetaboliten, Splint-Kernholz, etc.) sowie biotische Wechselwirkungen für die mangelnde Persistenz verantwortlich.

VII. Die morphologischen Merkmale der Gattung *Trichoderma* erwiesen sich als unzulänglich für eine exakte Re-Identifizierung des applizierten Antagonisten. Der ergänzende Einsatz molekularer Verfahren, insbesondere die DNS-Sequenzierung und RAPD-PCR gewährte eine genaue Identifikation der *Trichoderma*-Arten und zudem ein weitgehend spezifisches Monitoring des Antagonisten.

## 6. SUMMARY

The investigations were carried out to establish the application of *Trichoderma* spp. for biological control of wood decay fungi in trees. The objective of the studies was to select a suitable antagonistic *Trichoderma* strain against the wood decay fungi *Ganoderma adspersum*, *Ganoderma lipsiense*, *Inonotus hispidus*, *Polyporus squamosus* and *Kretzschmaria deusta* by *in vitro*-screening. For this purpose dual culture and interaction tests in wood as well as investigations on fungal growth and germination behaviour of conidia under different conditions were performed. Application of the light- and scanning electron microscopy allowed a precise observation of the interactions between the antagonistic strains and the selected decay fungi. In addition, the effect of *Trichoderma* spp. on the wood degradation and the behavioral patterns of the wood decay fungi were analyzed by means of wood weight loss measurements as well as histological studies. *Ad planta* field trials were carried out in different locations and hosts. The emphasis of the artificial inoculation tests was to develop and optimize a process which allows colonization of the wood substrate by the antagonist, its survival rate and its antagonistic (preventive) effect. For monitoring of the latter standardized re-isolations were carried out at regular intervals taking factors e.g. site, exposition and tree species into account. Identification of the obtained isolates was undertaken both with conventional methods based on macro- and micromorphological features and with various molecular-biological methods. Interpretation and characterization of the isolated fungal populations such as diversity and succession were analyzed with the help of diversity indices.

The most important results were:

- I. The applied *Trichoderma* species showed an antagonistic potential against wood decay fungi in the *in vitro* screenings. However, significant differences between the species and strains were found.
- II. The species of wood decay fungi showed significantly differences in their reaction to the *Trichoderma* application. *Polyporus squamosus* showed an extensive resistance in most lab tests.

III. An influence of physical and chemical parameters, in particular temperature and water potential, on growth and germination behaviour of conidia as well as on the antagonistic potential of *Trichoderma* spp. was evident.

IV. Only process C (using a humidity-storing gel as a carrier substance) enabled an effective establishment of the antagonist in the substrate. In addition, the *Trichoderma* application was strongly dependent on the prevailing climatic conditions.

V. In artificial inoculation tests *Trichoderma atroviride* 15603.1 achieved a highly significant preventive effect against the wood decay fungi *Inonotus hispidus* and *Ganoderma adspersum* as well as a significant effect against *Polyporus squamosus*.

VI. Monitoring results showed a limited persistence of the antagonist on the wound surfaces. Lack of genetic adaptation, climatic parameters, substrate/resource quality in particular (stress metabolites, sap- and heartwood, etc.) and biotic interactions may be held responsible for lack of persistence.

VII. The morphologic characteristics of the genus *Trichoderma* did not allow an accurate identification of the re-isolated *Trichoderma* species. Only molecular methods, especially the DNS-sequencing and RAPD PCR, enabled exact identification of the *Trichoderma* species and a broad specific monitoring of the investigated antagonist.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- ABBASI, P.A., MILLER, S.A., MEULIA, T., HOITINK, H.A.J. & KIM, J. (1999): Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5421-5426.
- ABBOTT, W.S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**: 265-267.
- AGRIOS, G.N. (1997): Plant Pathology. Academic Press, San Diego, California. 635 S.
- ADASKAVEG, J.E., GILBERTSON, R.L. & BLANCHETTE, R.A. (1990): Comparative Studies of Delignification Caused by *Ganoderma* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (6): 1932-1943.
- ALDRED, D., MAGAN, N. & LANE, B.S. (1999): Influence of water activity and nutrients on growth and production of squalestatin S1 by a *Phoma* sp. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 842-848.
- ANDREWS, J.H. (1992): Biological control in the phyllosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* **30**: 603-635.
- ANDRIAMIALISOA, Z., GIRAUD, M., LABIA, R. & VALLA, A. (2004): Chemical synthesis of 6-pentyl-2H-pyran-2-one: a natural antifungal biosynthesized by *Trichoderma* spp. *Chem. and Ecol.* **20**: 55-59.
- ANTAL, Z., MANCZINGER, L., KREDICS, L., KEVEI, F. & NAGY, E. (2002): Complete DNA sequence and analysis of a mitochondrial plasmid in the mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain T95. *Plasmid* **47**: 148-152.
- ARMSTRONG J.E., SHIGO A.L., FUNK D.T., MCGINNES E.A. & SMITH D.E. (1981): A macroscopic and microscopic study of compartmentalization and wound closure after mechanical wounding of black walnut trees. *Wood and Fiber* **13**: 275-291.
- ASIEGBU, F.O., JOHANSSON, M. & STENLID, J. (1999): Reactions of *Pinus sylvestris* (Scots Pine) root tissues to the presence of mutualistic, saprotrophic and necrotrophic micro-organisms. *J. Phytopath.* **147**: 257-264.
- ASKEW, D.J. & LAING, M.D. (1993): An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathol.* **42**: 686-690.
- AUST, H., BUCHENAUER, H. & BOCHOW, H. (1999): Glossar Phytomedizinischer Begriffe. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart. 123 S.
- AVIS, T.J. HAMELIN, R.C. & BELANGER, R.R. (2001): Approaches to molecular characterization of fungal biocontrol agents: some case studies. *Can. J. Plant Pathol.* **23**: 8-12.
- BADHAM, E.R. (1991): Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. *Mycologia* **83**: 455-463.
- BAILEY, B.A. & LUMSDEN, R.D. (1998): Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. 185-204.
- BALDER, H. (1992): Pflanzenverträglichkeit von Wundbehandlungen in der Baumpflege. *Gesunde Pflanzen* **44**: 296-302.
- BALDER, H. (1993): Aspekte des Pflanzenschutzrechts bei der Wundbehandlung in der Baumpflege. *Gesunde Pflanzen* **45**: 303-311.
- BANDYOPADHYAY, S., JASH, S. & DUTTA, S. (2003): Effect of different pH and temperature levels on growth and sporulation of *Trichoderma*. *Environ. & Ecol.* **21**: 770-773

- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. (1998): Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press. St. Paul, Minnesota. 224 S.
- BARTNICKI-GARCIA, S., BRACKER, C.E., GIERZ, G., LÓPEZ-FRANCO, R. & HAISHENG, L. (2000): Mapping the growth of fungal hyphae: orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of tuger. *Biophysical Journal* **79**: 2382-2390.
- BAUM, S. (2000): Abbau- und Ausbreitungsstrategien holzersetzender und endophytischer Pilze in Buche und anderen Laubbäumen. Dissertation Universität Freiburg. 144 S.
- BATTA, Y.A. (2004): Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection* **23**: 19-26.
- BELL, D.K., WELLS, H.D. & MARKHAM, C.R. (1982): *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* **75**: 379-382.
- BENÍTEZ, T., LIMÓN, C., DELGADO-JARANA, J. & REY, M. (1998): Glucanolytic and other enzymes and their genes. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. 101-128.
- BERGMAN, O. & NILSSON, T. (1971): Reduction of microbial deterioration in outside chip storage by alkali treatment. *Department of Forest Products Royal College of Forestry. Stockholm Res. Notes* **71**: 54
- BETINA, V. & FARKAŠ, V. (1998): Sporulation and light-induced development in *Trichoderma*. In: KUBICEK, C.P. & HARMAN, G.E. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis, London. 75-94.
- BIGGS, A.R. (1987): Occurrence and location of suberin in wound reaction zones in xylem of 17 tree species. *Phytopathology* **77**: 718-725.
- BILLY, C. (2000): Secondary imaging in variable pressure mode-short communication. *Microsom* **3**: 18
- BISBYS, G.R. (1939): *Trichoderma viride* Per.Ex Fr and notes on Hypocrea. *Br. mycol. Soc.* **23**: 149-168.
- BISSETT, J. (1984): A revision of the genus *Trichoderma*. I: Section *Longibrachiatum* sect. Nov. *Can. J. Bot.* **62**: 924-931.
- BISSETT, J. (1991a): A revision of the genus *Trichoderma*. II: Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* **69**: 2357-2372.
- BISSETT, J. (1991b): A revision of the genus *Trichoderma*. III: Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* **69**: 2372-2417.
- BISSETT, J. (1991c): A revision of the genus *Trichoderma*. IV: Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can. J. Bot.* **69**: 2418-2420.
- BISSETT, J. (1992): *Trichoderma atroviride*. *Can. J. Bot.* **70**: 639-641.
- BLAKEMAN, J.P. & FOKKEMA, N.J. (1982): Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* **20**: 167-192.
- BLANCHETTE, R.A. (1991): Delignification by wood-decay. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**: 381-398.
- BLANCHETTE, R.A. (1996): Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* **73**: 999-1010.
- BODDY, L. & RAYNER, A.D.M. (1983): Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and a re-appraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytologist*. **94**: 623-641.

- BOSTOCK, R.M. & STERMER, B.A. (1989): Perspectives on wound healing in resistance to Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27**: 343-471.
- BRAUN, H.J. (1970): Funktionelle Histologie der sekundären Sproßachse. I. Das Holz. Handbuch der Pflanzenanatomie. Bornträger, Berlin. 190 S.
- BRAUN, H. J. (1982): Lehrbuch der Forstbotanik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. 257 S.
- BREITENBACH, J. & KRÄNZLIN, F. (1984): Pilze der Schweiz, Band 1 Ascomyceten. Verlag Mykologia, Schweiz. 313 S.
- BREITENBACH, J. & KRÄNZLIN, F. (1986): Pilze der Schweiz, Band2: Nichtblätterpilze. Verlag Mykologia, Schweiz. 416 S.
- BROOKS, D.S., GONZÁLEZ, D.F. APPEL, D.N. & FILER, T.H. (1994): Evaluation of endophytic bacteria as potential control agents for oak wilt. *Biol. Control* **4**: 373-381.
- BROWN, H.L. & BRUCE, A. (1999): Assessment of the biocontrol potential of a *Trichoderma viride* isolate. Part I: Establishment of field and fungal cellar trials. *International Biodeterioration & Biodegradation* **44**: 219-223.
- BROWN, H.L., BRUCE, A. & STAINES, H.J. (1999): Assessment of the biocontrol potential of a *Trichoderma viride* isolate. Part II: Protection against soft rot and basidiomycete decay. *International Biodeterioration & Biodegradation* **44**: 225-231.
- BRUCE, A. (1992): Biological Control of Wood decay. Document No.: IRG/WP/1531-92.
- BRUCE, A. & HIGHLEY, J.L. (1991): Control of growth of wood decay Basidiomycetes by *Trichoderma* spp. and other potentially antagonistic fungi. *Forest Products Journal* **41**: 63-67.
- BRUCE, A., KING, B. & HIGHLEY, T.L. (1991): Decay resistance of wood removed from poles biologically treated with *Trichoderma*. *Holzforschung* **45**: 307-311.
- BRUCE, A., KUNDZEWICZ, A. & WHEATLEY, R.E. (1996): Influence of culture age on the volatile organic compounds produced by *Trichoderma aureoviride* and associated inhibitory effects on selected wood decay fungi. *Material und Organismen* **30**: 79-94.
- BRUCE, A., WHEATLEY, R.E., HUMPHRIS, A.N., HACKETT, C.A. & FLORENCE, M.E.J. (2000): Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. *Holzforschung* **54**: 481-486.
- BRUNNER, K., PETERBAUER, C.K., MACH, R.L., LORITO, M., ZEILINGER, S. & KUBICEK, R.L. (2003): The Nag1 *N*-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.* **43**: 289-295.
- BRUNNER, K., ZEILINGER, S., CILIENTO, R., WOO, S.L., LORITO, M., KUBICEK, C.P. & MACH, L. (2005): Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3959-3965.
- BUTCHER, J.A. (1968): The ecology of fungi infecting untreated sapwood of *Pinus radiata*. *Can. J. Bot.* **46**: 1557-1589.
- BUTIN, H. (1996): Krankheiten der Wald- und Parkbäume. Diagnose-Biologie-Bekämpfung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 261 S.
- CAMPBELL, R. (1994): Biological control of soil-borne diseases: some present problems and different approaches. *Crop Protection* **13**: 4-13
- CANESSA, E.A. & MORRELL, J.J. (1997): Biological control of wood decay fungi. 1. Effects of exogenous carbon on effectiveness. *Material und Organismen* **31**: 167-182.

- CHAPELA, I.H. (1989): Fungi in healthy stems and branches of American beech and aspen: a comparative study. *New Phytol.* **113**: 65-75.
- CASTLE, A., SPERANZINI, D., RGHEI, N., ALM, G., RINKER, D. & BISSETT, J. (1998): Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:133-137.
- CHAVERRI, P. & SAMUELS, G.J. (2004): *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Stud. Mycol.* **48**: 1-116.
- CHEN, X., ROMAINE, C.P., TAN, Q., SCHLAGNHAUFER, B., OSPINA-GIRALDO, M.D., ROYSE, D.J. & HUFFS, D.R. (1999): PCR-based genotyping of epidemic and preepidemic *Trichoderma* isolates associated with Green Mold of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2674-2678.
- CHET, I. (1987): *Trichoderma* – application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. (Hrsg.): *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. John Wiley & Sons, New York. 137-160.
- CHET, J. (1990): Mycoparasitism – recognition, physiology and ecology. In: BAKER, R.R & DUNN, P.E. (eds): *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Alan Liss, New York. 725-733.
- CHET, I., HARMAN, G.E. & BAKER, R. (1981): *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Phythium* spp. *Microbiol. Ecol.* **7**: 29-38.
- CHET, I., BENHAMOU, N. & HARAN, S. (1998): Mycoparasitism and lytic enzymes. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma and Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. 153-172.
- CHET, I., HADAR, Y., ELAD, Y., KATAN, J. & HENIS, Y. (1979): Biological control of soil-borne plant pathogens by *Trichoderma Harzianum*. In: SCHIPPERS, B. & GAMS, W. (Hrsg.): *Soil-borne plant pathogens*. London, New York: Academic Press. 585-591.
- CHISSOE, W.F., VEZEY, E.L. & SKVARLA, J.J. (1994): Hexamethyldisilazane as a drying agent for pollen Scanning Electron Microscopy. *Biotechnic & Histochemistry* **69**: 192-198.
- CHOUAKI, T., LAVARDE, V., LACHAUD, L., RACCURT, C.P. & HENNEQUIN, C. (2002): Invasive infections due to *Trichoderma* species: Report of 2 cases, findings of *in vitro* susceptibility testing, and review of the literature. *Clinic. Infect. Dis.* **35**: 1360-1367.
- CLARKSON, J.P., MEAD, A., PAYNE, T. & WHIPPS, J.M. (2004): Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology* **53**: 353-362.
- COOK, R.J. (1979): Antagonism and biological control: Concluding remarks. In: SCHIPPERS, B. & GAMS, W. (Hrsg.): *Soil-borne plant pathogens*. Academic Press, London, New York. 653-657.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. (1983): *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathol. Society. St. Paul, Minnesota.
- COONEY, J.M. & LAUREN, D.R. (1998): *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. *Letters in Applied Microbiology* **27**: 283-286.
- COONEY, J.M., LAUREN, D.R. & PERRY-MEYER, L.J. (1997a): A novel tubular bioassay for measuring the production of antagonistic chemicals produced at the fungal/pathogen interface. *Letters in Applied Microbiology* **24**: 460-462.
- COONEY, J.M., VANNESTS, J.L., LAUREN, D.R. & HILL, R.A. (1997b): Quantitative determination of the antifungal compound 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PAP) using a simple plate bioassay. *Letters in Applied Microbiology* **24**: 47-50.

- CROSS, D. & KENERLEY, C.M. (2004): Modelling the growth of *Trichoderma virens* with limited sampling of digital images. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 486-494.
- CUTTLE, H.G., CRUMLEY, F.G. & COLE, P.D. (1986): 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**: 2943-2945.
- CYPIONKA, H. (2006): Grundlagen der Mikrobiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 302 S.
- DALLYN, H. (1978): Effect of substrate water activity on growth of certain xerophilic fungi. Ph.D. Thesis, South Bank University, London.
- DALLYN, H. & FOX, A. (1980): Spoilage of materials of reduced water activity by xerophilic fungi. In: Gould, G.W. (ed.): Microbial growth and survival in extremes of environment. Academic Press, London. 129-139.
- DANIELSON, R.M. & DAVEY, C.B. (1973a): Non-nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 495-504.
- DANIELSON, R.M. & DAVEY, C.B. (1973b): Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma in vitro*. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 517-524.
- DANIELSON, R.M. & DAVEY, C.B. (1973c): Carbon and nitrogen nutrition in *Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 506-515.
- DANIELSON, R.M. & DAVEY, C.B. (1973d): The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 485-494.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. (1971a): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **57**: 25-39.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. (1971b): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **57**: 41-48.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. (1971c): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Trans Br. Mycol. Soc.* **57**: 363-369.
- DELGADO-JARANA, J., PINTOR-TORO, J. A. & BENÍTEZ, T. (2000): Overproduction of  $\beta$ -1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. *Biochim Biophys Acta* **1481**: 289-296.
- DE MARCO, J.L., VALADARES-INGLIS, M.C. & FELIX, C.R. (2003): Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis Perniciosa*, the causal agent of witches broom of Cocoa. *Brazilian Journal of Microbiology* **34**: 33-38.
- DODD, S.L., HILL, R.A. & STEWART, A. (2004a): Monitoring the survival and spread of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* (C65) on kiwifruit using a molecular marker. *Australasian Plant Pathology* **33**: 189-196.
- DODD, S.L., HILL, R.A. & STEWART, A. (2004b): A duplex-PCR bioassay to detect a *Trichoderma virens* biocontrol isolate in non-sterile soil. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 1955-1965.
- DODD, S.L., LIECKFELDT, E. & SAMUELS, G.J. (2003): *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* **95**: 27-40.
- DOMSCH, K.H., GAMS, W. & ANDERSON, T.H. (1980): Compendium of soil fungi. Volume 2. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco. 342 S.
- DRUZHININA, I. & KUBICEK, C.P. (2005): Species concept and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J. Zhejiang Univ. SCI.* **2**: 100-112.

- DRUZHINIA, I.S., KOPCHINSKIY, A.G. & KUBICEK, C.P. (2006): The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* **47**: 55-64.
- DUBOURDIEU, D., DESPLANQUES, C. VILLETAZ, J.C. & RIBEREAU-GAYION, P. (1985): Investigations of an industrial  $\beta$ -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydrates Research* **144**: 277-287.
- DUBOS, B. & RICARD, J.L. (1974): Curative treatment of peach trees against silver leaf disease (*Stereum purpureum*) with *Trichoderma viride* preparations. *Plant Dis. Rep.* **58**: 147-150.
- DUFFY, B., SCHOUTEN, A. & RAAIJMAKERS, J.M. (2003): Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Ann. Rev. Phytopathol.* **41**: 501-538.
- DUJESIEFKEN, D. (1991): Der Kronenschnitt in der Baumpflege. *Neue Landschaft* **36**: 27-31.
- DUJESIEFKEN, D. (1992): Einfluss von Wundverschlussmitteln auf die Wundreaktion von Bäumen. *Gesunde Pflanzen* **44**: 306-311.
- DUJESIEFKEN, D. (1995). Wundbehandlung an Bäumen. Thalacker Verlag, Braunschweig. 148 S.
- DUJESIEFKEN, D. (1998): Wundverschlusmittel – lohnt der Einsatz? In DUJESIEFKEN, D. & KOCKERBECK, P. (Hrsg.): Jahrbuch der Baumpflege 1998: 206-207.
- DUJESIEFKEN, D. & STOBBE, H. (2002): The Hamburg tree pruning system – a framework for pruning of individual trees. *Urban Forestry & Urban Greening* **1**: 75-82.
- DUJESIEFKEN, D., KOWOLT, T. & LIESE, W. (1988): Vergleich der Schnittführung bei Astung von Linde und Roskastanie. *Allgemeine Forstzeitschrift.* **43**: 331-332.
- DUJESIEFKEN, D., STOBBE, H. & ECKSTEIN, D. (1998): Langzeitwirkung von Astungen im Holz von Linde und Roskastanie. *Fortwissenschaftliches Centralblatt* **117**: 305-315
- DUMAS, M.T. & BOYONOSKI, N.W. (1992): Scanning electron microscopy of mycoparasitism of *Armillaria* rhizomorphs by species of *Trichoderma*. *Eur. J. For. Path.* **22**: 379-383.
- EASTBURN, D.M. & BUTLER, E.E. (1991): Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* **83**: 257-263.
- EISNER, N.J., GILMAN, E.F. & GRABOSKY, J.C. (2002): Branch morphology impacts compartmentalization of pruning wounds. *Journal of Arboriculture* **28**: 99-105.
- EL-KATATNY, M.H., SOMITSCH, W., ROBRA, K.H., EL-KATATNY, M.S. & GÜBITZ, G.M. (2000): Production of chitinase and 1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Biotechnology* **38**: 173-180.
- ELAD, Y. & KIRSHNER, B. (1993): Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* as modified by abiotic conditions. *Phytoparasitica* **21**: 303-313.
- ELAD, Y. & KAPAT, A. (1999): The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Path.* **105**:177-189.
- ELAD, Y., CHET, I. & HENIS, Y. (1979): Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* **28**: 719-725.
- ELAD, Y., CHET, I. & HENIS, Y. (1981): A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica* **9**: 59-67.
- ELAD, Y., SADOWSKY, Z. & CHET, I. (1987): Scanning electron microscopical observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **88**: 259-263.

- ELAD, Y., BARAK, R., CHET, I. & HENIS, Y. (1983a): Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma* spp. and plant pathogenic fungi. *Phytopathol. Z.* **107**: 168-175.
- ELAD, Y., CHET, I., BOYLE, P. & HENIS, Y. (1983b): Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**: 85-88.
- ELSHERIF, M. & GROSSMANN, F. (1994): Comparative investigations on the antagonistic activity of fluorescent pseudomonads against *Gaeumannomyces graminis* var *triticii* *in vitro* and *in vivo*. *Microbial. Res.* **149**: 371-377.
- EJECHI, B.O. (1998): Effect of combined bacterial and urea treatment of wood by basidiomycete fungi. *Journal of Phytopathology.* **146**: 533-538.
- EJECHI, B.O. (2003): Tropical field assessment of combined *Trichoderma viride* *Proteus* sp. and urea protective treatment of wood against biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **51**: 109-114.
- EJECHI, B.O., OBUKWE, C.O. (1996): The influence of pH on biodeterioration of a tropical timber exposed to mixed cultures of biocontrol and wood-rot fungi. *Journal of Phytopathology.* **144**: 119-123.
- ENKERLI, J., KÖLLIKER, R., KELER, S. & WIDMER, F. (2005): Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Molecular Ecology Notes* **5**: 384-386.
- ESSER, K. (2000): Kryptogamen – Praktikum und Lehrbuch: Cyanobakterien, Algen, Pilze, Flechten. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 585 S.
- EUROPEAN STANDARD EN 113 (1996): Wood preservatives – Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes – Determination of the toxic values. CEN, European Committee for Standardization.
- EVANS, H.C., HOLMES, K.A. & THOMAS, S.E. (2003): Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycol. Prog.* **2**: 149-160.
- FOX, R.T.V. (2003): Managing *Armillaria* root rot. *Food, Agriculture & Environment* **1**: 95-100.
- FRANKLAND, J.C. (1992): Mechanisms in fungal Succession. In: CAROLL, G.C & WICKLOW, D.T. (eds): The fungal Community: Its organization and role in the ecosystem. Marcel Dekker, New York. 383-401.
- GADGIL, P.D. & BAWDEN, A.D. (1982): Infection of wounds in *Eucalyptus delegatensis*. *New Zealand Journal of Forestry Science* **11**: 262-270.
- GALINDO, E., FLORES, C., LARRALDE-CORONA, P., CORKIDI-BLANCO, G., ROCHA-VALADEZ, J.A. & SERRANO-CARREÓN, L. (2004): Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* **18**: 1-8.
- GAMS, W. & BISSETT, J. (1998): Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C.P. & HARMAN, G.E. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis, London. 3-34.
- GESETZ ZUM SCHUTZ DER KULTURPFLANZEN ( Pflanzenschutzgesetz) v. 14.05.1998, BGB1.I
- GILMAN, J.C. & ABBOTT, E.V. (1927): A summary of the soil fungi. *Iowa St. Coll. J. Sci.* **1**: 225-343.
- GIOVANNINI, I.S., JOB, D. & HMAMDA, A. (2004): Selection of *Grifola frondosa* and *Fomitopsis pinicola* strains resistant to *Trichoderma viride* in teflon tubes confrontation method. *Mycological Progress* **3**: 329-336.

- GOLDFARB, B., NELSON, E.E. & HANSEN, E.M. (1989): *Trichoderma* spp.: Growth rates and antagonism to *Phellinus weirii* in vitro. *Mycologia* **81**: 375-381.
- GLASS, B.P. & MCKENZIE, H. (1989): Decay distribution in relation to pruning and growth stress in plantation-grown *Eucalyptus regnans* in New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science* **19**: 210-220.
- GRADINGER, C. (2001): Phylogenie und Biodiversität der Pilzgattung *Trichoderma* – ein molekularer Ansatz. Dissertation Technische Universität München.
- GROSCLAUDE, C.; RICARD, J.L. & DUBOS, B. (1973): Inoculation of *Trichoderma viride* spores via pruning shears for biological control of *Stereum purpureum* on plum tree wounds. *Plant Dis. Rep.* **57**: 25-28.
- GROSSER, D. (1977). Die Hölzer Mitteleuropas. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg–New York. 299 S.
- HANSON, L.E. & HOWELL, C.R. (2004): Elicitors of plant defence responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology* **94**: 171-176.
- HARMAN, G.E. (2000): The myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* **84**: 377-393.
- HARMAN, G.E. (2006): Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathol.* **96**: 190-194.
- HARMAN, G.E. & BJÖRKMAN, T. (1998): Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. 229-265.
- HARMAN, G.E. ; HAYES, C.K. & ONDIK, K.L. (1998): Asexual genetics in *Trichoderma* and *Gliocladium*: Mechanisms and implications. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis, London 243-270..
- HARMAN, G.E., LORITO, M. & LYNCH, J.M. (2005): Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. *Adv. Appl. Microbiol.* **56**: 313-330
- HARMAN, G.E., PETZOLDT, R., COMIS, A. & CHEN, J. (2004): Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and effects of these interactions on disease caused by *Phythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **94**: 147-153.
- HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I. & LORITO, M. (2004): *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 43-56.
- HARAM, S., SCHICKLER, H., OPPENHEIM, A. & CHET, I. (1996): Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* **86**: 980-985.
- HARTIG, R. (1882): Lehrbuch der Baumkrankheiten. Springer Verlag. Berlin. 198 S.
- HERMOSA, M.R., GRONDONA, I., ITURRIAGA, E.A., DIAZ-MINGUEZ, J.M., CASTRO, C., MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. (2000): Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1890-1898.
- HERMOSA, M.R., KECK, E., CHAMORRO, I., RUBIO, B., SANZ, L., VIZCAÍNO, J.A., GRONDONA, I & MONTE, E. (2004): Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol. Res.* **108**: 897-906.
- HERR, J.M. (1992): New uses for calcium chloride solution as a mounting medium. *Biotechnic & Histochemistry* **67**: 9-13.
- HIGHLEY, T. L. (1997): Control of wood decay by *Trichoderma* (*Gliocladium*) *virens*. I. Antagonistic properties. *Material und Organismen* **31**: 79–89.

- HIGHLEY, T.L. & RICARD, J. (1988): Antagonism of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* against wood decay fungi. *Material und Organismen* **23**: 157-169.
- HIGHLEY, T.L., PADMANABHA, H.S.A. & HOWELL, C.R. (1997): Control of wood decay by *Trichoderma (Gliocladium) virens* II. Antibiosis. *Material und Organismen* **31**: 158-166.
- HIGHLEY, T.L., CLAUSEN, C.A., CROAN, S.C., GREEN, F., ILLMAN, B.L. & MICALES, J.A. (1994): Research on biodeterioration of wood. I. Decay mechanisms and biocontrol. Res. Pap. FPL-RP-529. Madison, WI: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory. 20 S.
- HJELJORD, L. & TRONSMO, A. (1998): *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. 131 -151
- HJELJORD, L.G. & TRONSMO, A. (2003): Effect of germination initiation on competitive capacity of *Trichoderma atroviride* P1 conidia. *Phytopathology* **93**: 1593-1598.
- HJELJORD, L.G., STENSIVAND, A. & TRONSMO, A. (2001): Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum (atroviride)* P1 against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **91**: 1172-1180.
- HOITINK, H.A.J., MADDEN, L.V. & DORRANCE, A.E. (2006): Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathol.* **96**: 186-189.
- HOLDENRIEDER, O. (1984): Investigations on biological control of *Heterobasidion annosum* in Norway spruce (*Picea abies*) with antagonistic fungi. II. Interaction experiments in wood. *Eur. J. For. Path.* **14**: 137-153.
- HOLMES, K.A., SCHROERS, H.J., THOMAS, S.E., EVANS, H.C. & SAMUELS, J. (2004): Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress* **3**: 199-210.
- HONEGGER, R. (1985): Scanning Electron Microscopy of the fungus-plant cell interface: A simple preparative technique. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **84**: 530-533.
- HOWELL, C.R. (1998): The role of antibiosis. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. 173-184.
- HOWELL, C.R. (2003): Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease* **87**: 4-10.
- HOWELL, C.R. (2006): Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* **96**: 178-180
- HOWELL, C.R., DEVAY, J.E., GARBER, R.H. & BATSON, W.E. (1997): Field control of cotton seedlings diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. *Journal of Cotton Science* **1**: 15-20.
- HOWELL, C. R., HANSON, L. E., STIPANOVIC, R. D. & PUCKHABER, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopath.* **90**: 248-252.
- HSEU, R.S., WANG, H.H., WANG, H.F. & MONCALVO, J.M. (1996): Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of Internal Transcribed Spacer Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1354-1363.
- HULME, M.A. & STRANKS, D.W. (1970): Induction and the regulation of cellulose production by fungi. *Nature* **226**: 469-470.

- HUMPHRIS, S.N., WHEATLEY, R.E. & BRUCE, A. (2001): The effects of specific volatile organic compounds produced by *Trichoderma* spp. on the growth of wood decay basidiomycetes. *Holzforschung* **55**: 233-237.
- HÜTTERMANN, A. & CWIELONG, P. (1982): The cell wall of *Fomes annosus* (*Heterobasidion annosum*) as target for biochemical control. 1. Direct lysis of the cell wall by lytic enzymes from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. For. Path.* **12**: 238-245.
- JAAKKOLA, M.S., LATITINEN, S., PIIPARI, R., UITTI, J., NORDMAN, H., HAAPALA, A.M. & JAAKKOLA, J.J. (2002): Immunoglobulin G antibodies against indoor dampness-related microbes and adult-onset asthma: A population-based incident case-control study. *Clinic. Exp. Immunol.* **129**: 107-112.
- JACKSON, A.M., WHIPPS, J.M. & LYNCH, J.M. (1991): Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 494-501.
- JAHN, H. (1990): Pilze an Bäumen. Patzer Verlag, Berlin, Hannover. 272 S.
- JASALAVICH, C.A., OSTROFSKY, A. & JELLISON, J. (2000): Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4725-4734.
- JAYARAJ, J., RADHAKRISHNAN, N.V. & VELAZHAHAN, R. (2006): Development of formulations of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control of damping-off of tomato caused by *Phytophthora aphanidermatum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **39**: 1-8.
- JOHNSON, L.F., BERNARD, E.C. & PEIYUANQUAN (1987): Isolation of *Trichoderma* spp. at low temperatures from Tennessee and Alaska (USA) soils. *Plant Disease* **71**: 137-140.
- KAARIK, A.A. (1974): Decomposition of wood. In: DIXON, C.H. (ed.): Biology of Plant Litter Decomposition. Academic Press, London.
- KEMP, M.S. & BURDEN, R.S. (1986): Phytoalexins and stress metabolites in the sapwood of trees. *Phytochemistry* **25**: 1261-1269.
- KEMPF, H.J. (1988): Biologische Bekämpfung von pflanzenpathogenen Pilzen, insbesondere *Fusarium culmorum*, durch *Erwinia herbicola* und andere mikrobielle Antagonisten. Dissertation, Universität Göttingen.
- KHATTABI, N., EZZAHIRI, B., LOUALI, L. & OIHABI (2004): Effect of nitrogen fertilizers and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii*. *Agronomie* **24**: 281-288.
- KING, E.J. & BROWN, M.F. (1983): A technique for preserving aerial fungal structures for scanning electron microscopy. *Can. J. Microbiol.* **29**: 653-658.
- KISS, G. & HANSSON, H.C. (2004): Application of osmolality for the determination of water activity and the modelling of cloud formation. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* **4**: 7667-7689.
- KLEIN, D. & EVERLEIGH, D.E. (1998): Ecology of *Trichoderma*. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma and Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis, London. 57-74.
- KLOEPPER, J.W. (1991): Development of *in vivo* assays for pre-screening antagonists of *Rhizoctonia solani* on cotton. *Phytopathology* **81**: 1006-1013.
- KNUDSEN, G.R. & ESCHEN, D.J. (1991): Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* **75**: 466-480.
- KÖHL, J. & MOLHOEK, W.M.L. (2001): Effect of water potential on conidial germination and antagonism of *Ulocladium atrum* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **91**: 485-491.
- KÖHLER, W., SCHACHTEL, G. & VOLESKE, P. (2002): Biostatistik – Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 301 S.

- KOIVULA, A., LINDER, M. & TEERI, T.T. (1998): Structure-function relationships in *Trichoderma* cellulolytic enzymes. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor & Francis, London. 3-23.
- KOMMEDAHL, T., WINDELS, C.E., SARBINI, G. & WILEY, H.B. (1981): Variability in performance of biological and fungicidal seed treatments in corn, peas and soybeans. *Protection Ecology* **3**: 55-61.
- KOVACH, J., PETZOLDT, R., HARMAN, G. E. (2000): Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for *Botrytis* control. *Biol. Control* **18**: 235-242.
- KRAUS, G.F., DRUZHININA, I., GAMS, W. BISSET, J., ZAFARI, D., SZAKACS, G., KOPTCHINSKI, A., PRILLINGER, H., ZARE, R. & KUBICEK, C.P. (2004): *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. *Mycologia* **96**: 1059-1073.
- KRÄMER, J. (2002): Lebensmittel-Mikrobiologie. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart. 406 S.
- KREDICS, L., ANTAL, Z. & MANCZINGER, L. (2000): Influence of water potential on growth, Enzyme secretion and *In vitro* Enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. *Curr. Microbiol.* **40**: 310-414.
- KREDICS, L., ANTAL, Z., MANCZINGER, L., SZERKERES, A., KEVEI, F. & NAGY, E. (2003a): Influence of environmental parameters on *Trichoderma* Strains with biocontrol potential. *Food Technol. Biotechnol.* **41**: 37-42.
- KREDICS, L., ANTAL, Z., DOCZI, I., MANCZINGER, L., KEVEI, F. & NAGY, E. (2003b): Clinical importance of the genus *Trichoderma*-a review. *Acta Microbiol. Immunol. Hungarica* **50**: 105-117.
- KREDICS, L., MANCZINGER, L., ANTAL, Z., PENZES, Z., SZEKERES, A., KEVEI, F. & NAGY E. (2004): *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *J Appl Microbiol.* **96**: 491-498.
- KREISEL, H. (1961): Die phytopathogenen Großpilze Deutschlands. Fischer Verlag, Jena. 284 S.
- KUBICEK, C.P., MACH, R.L., PETERBAUER, C.K. & LORITO, M. (2001): *Trichoderma*: From genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology* **83**: 11-23.
- KUBICEK, C.P., BISSET, J., DRUZHININA, I., KULLING-GRADINGER, C. & SZAKACS, G. (2003): Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: A case study on South. East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 310-319.
- KUBICEK-PRANZ, E.M. (1998): Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis, London. 95-119.
- KUHLS, K., LIECKFELDT, E., BÖRNER, T. & GUÉHO, E. (1999): Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. *Med. Mycol.* **37**: 25-33.
- KULLNIG, C., SZAKACS, G. & KUBICEK, C.P. (2002): Molecular phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma* – a multigene approach. *Mycol. Res.* **106**: 757-767.
- KULLNIG, C., MACH, R.L., LORITO, M. & KUBICEK, C.P. (2000): Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2232-2234.
- KULLING, C.M., KRUPICA, T., WOO, S.L., MACH, R.L., REY, M., BENITEZ, T., LORITO, M. & KUBICEK, C.P. (2001): Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol. Res.* **105**: 773-782.
- KWASNA, H. (1997): Antagonistic effect of fungi from Scots pine stump roots against *Heterobasidion annosum* and *Armillaria ostoyae*. *Acta Mycologica* **32**: 369-381.

- LEVY, E., EYAL, Z., CARMELY, S., KASHMAN, Y. & CHET, I. (1989): Suppression of *Septoria tritici* and *Puccinia recondita* of wheat by an antibiotic-producing fluorescent pseudomonad. *Plant Pathology* **38**: 564-570.
- LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, G.C. (1980): Integrated control of *Rhizoctonia* fruit rot of cucumber. *Phytopathology* **70**: 85-89.
- LI, G.Q., HUANG, H.C., ACHARYA, S.N. & ERICKSON, R.S. (2004): Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmental controlled and field conditions. *Plant Disease* **88**: 1246-1251.
- LI, G.Q., HUANG, H.C., ACHARYA, S.N. & ERICKSON, R.S. (2005): Effectiveness of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma atroviride* in suppression of sclerotinia blossom blight of alfalfa. *Plant Pathology* **54**: 204-211.
- LI, Y.C., KORZOL, A.B., FAHIMA, T. BEILES, A. & NEVO, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* **11**: 2453-2465.
- LIESE, W., DUJESIEFKEN, D. & BREMER, J. (1988): Wundreaktionen bei Linde nach Astung in der Baumpflege. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* **107**: 184-196.
- LIECKFELDT, E., KUHL, K. & MUTHUMEENAKSHI, S. (1998): Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis, London. 35-56.
- LIECKFELDT, E., KULLING, C., SAMUELS, G.J. & KUBICEK, C.P. (2000): Sexually competent, sucrose- and nitrate-assimilating strains of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) from South American soils. *Mycologia* **92**: 374-380.
- LIFSHITZ, R. LIFSHITZ, S. & BAKER, R. (1985): Decrease in incidence of *Rhizoctonia* preemergence damping-off by use of integrated and chemical controls. *Plant Disease* **69**: 4341-4344.
- LIMÓN, M.C., PINTOR-TORO, J.A. & BENÍTEZ, T. (1999): Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* Transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* **89**: 254-261.
- LIMÓN, M.C., CHACÓN, M.R., MEJÍAS, R., DELGADO-JARANA, RINCÓN, A.M., CODÓN, A.C. & BENÍTEZ, T. (2004): Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CET 2413 by addition of cellulose binding domain. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* **64**: 675-685.
- LINDSEY, D.L. & BAKER, R. (1967): Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* **57**: 1262-1263.
- LOCKWOOD, J.L. (1992): Exploitation competition. In: CAROLL, G.C & WICKLOW, D.T. (eds): *The fungal Community: Its organization and role in the ecosystem*. Marcel Dekker, New York. 243-263.
- LONSDALE, D. (1992): Treatment of tree wounds. *Arboriculture Research Note* **109**: 1-5.
- LONSDALE, D. & LODGE, A.H. (1993): Die Behandlung von Ästungswunden: - Eine Beurteilung des Wertes in Beziehung zum Zurücksterben des Kambiums, der Wundüberwallung und der Besiedlung von Mikroorganismen. Tagungsband 11. Osnabrücker Baumpflegetage.
- LORITO, M., HARMAN, D.E., HAYES, C.K., BROADWAY, R.M., TRONSMO, A., & DI PIETRO, A. (1993): Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopat.* **83**: 302-307.
- LORITO, M. HAYES, C.K., DI PIETRO, A. & WOO, S.L. (1994): Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase and an *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **84**: 398-405.
- LUARD, E.J. & GRIFFIN, D.M. (1981): Effect of water potential on fungal growth and turgor. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **76**: 33-40.

- LUDWIG, J.A. & REYNOLDS, J.F. (1988): Statistical ecology. A primer on methods and computing. John & Sons, New-York-Chichester, Brisbane Toronto-Singapore.
- LUPO, S., DUPONT, J., & BETTUCCI, L. (2002): Ecophysiology and saprophytic ability of *Trichoderma* spp. *Cryptogamie Mycologie* **23**: 71-80.
- LUTZ, M.P., FEICHTINGER, G., DÉFAGO, G. & DUFFY, B. (2003): Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3077-3084.
- LYNCH, J.M. & MOFFAT, A.J. (2005): Bioremediation – prospects for the future application of innovative applied biological research. *Ann. Appl. Biol.* **146**: 217-221.
- MACH, R.L., PETERBAUER, C.K., PAYER, K., JAKSITS, S., WOO, S.L., ZEILINGER, S., KULLNIG, C.M., LORITO, M. & KUBICEK, C.P. (1999): Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1858-1863.
- MAGAN, N. (1988). Fungal colonization and decomposition of cereal straw. *Int. Biodeterioration* **24**: 435-444.
- MAGAN, N. & LACEY, J. (1984): Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **82**: 83-93.
- MAGAN, N., CAYLEY, G.R. & LACEY, J. (1984): Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and Wheat Grain. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1113-1117.
- MALEK, J. V., MOLITOR, W., PESSLER, K. & WAWRIK, H. (1999). Der Baumpfleger. Ulmer Verlag, Stuttgart. 569.S.
- MARGALEF, R. (1958): Information theory in ecology. *General Systematics* **3**: 36-71.
- MARIA, G.L. & SRIDHAR, K.R. (2002): Richness and diversity of filamentous fungi on woody litter of mangroves along the west coast of India. *Current Science* **83**: 1573-1580.
- MARÍN, S., COMPANYYS, E., SANCHIS, V., RAMOS, A.J. & MAGAN, N. (1998): Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycol. Res.* **102**: 959-964.
- MARTÍN, J.F. & NICOLÁS, G. (1970): Physiology of spore germination in *Penicillium notatum* and *Trichoderma lignorum*. *Trans. Br. mycol. Soc.* **55**: 141-148.
- MAYMON, M., MINZ, D. BARBUL, O., ZVEIBIL, A., ELAD, Y. & FREEMAN, S. (2004): Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to ap-PCR and ITS sequences analyses. *Phytoparasitica* **32**: 370-375.
- MCAFEE, B.J. & TAYLOR, A. (1999): A review of the volatile metabolites of fungi found on wood substrates. *Natural Toxins* **7**: 283-303.
- MCLEAN, K.L., SWAMINATHAN, J., FRAMPTON, C.M., HUNT, J.S., RIDGWAY, H.J. & STEWART, A. (2005): Effect of formulation on the rhizosphere competence and biocontrol ability of *Trichoderma atroviride* C52. *Plant Pathology* **54**: 212-218.
- MERCER, P.C. (1982): Tree wounds and their treatment. *Arboricultural Journal* **6**: 131-137.
- MERCER, P.C. & KIRK, S.A. (1984a): Biological treatments for the control of decay in tree wounds. I. Laboratory tests. *Ann. Appl. Biol.* **104**: 211-219.
- MERCER, P.C. & KIRK, S.A. (1984b): Biological treatments for the control of decay in tree wounds. II. Field tests. *Ann. Appl. Biol.* **104**: 211-219.
- MERRILL, W. & COWLING, E.B. (1966): Role of nitrogen in wood deterioration: Amount and distribution of nitrogen in fungi. *Phytopathology* **56**: 1083-1090.

- METZLER, B. (1997): Quantitative assessment of fungal colonization in Norway spruce after green pruning. *Eur. J. Forest Pathol.* **27**: 1-11.
- MEYER, R.J. & PLASKOWITZ, J.S. (1989): Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma*. *Mycologia* **81**: 201-207.
- MIGHELI, Q., HERRERA-ESTRELLA, A., AVATANEO, M. & GULLINO, M.L. (1994): Fate of transformed *Trichoderma harzianum* in the phylloplane of tomato plant. *Mol. Ecol.* **3**: 152-159.
- MONTE, E. (2001): Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiol.* **4**: 1-4.
- MORRELL, J.J. (1990): Effects of volatile chemicals on the ability of microfungi to arrest basidiomycetous decay. *Material und Organismen* **25**: 267-274.
- MOUSSA, T.A.A. (2002): Studies on biological control of sugarbeet pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn. *Online Journal of Biological Science* **2**: 800-804.
- MULLIS K. B., FALOONA F. A., SCHARF S. J., SAIKI R.K., HORN G. T., EHRLICH H. A. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- MURMANIS, L.L., HIGHLEY, T.L. & RICARD, J. (1988): Hyphal interaction of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma polysporum* with wood decay fungi. *Material und Organismen* **23**: 271-279.
- NAÁR, Z. & KECSKES, M. (1998): Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma* species. *Microbiol. Res.* **53**: 119-129.
- NAEF, A., SENATORE, M. & DÉFAGO, G. (2006): A microsatellite based method for quantification of fungi in decomposing plant material elucidates the role of *Fusarium graminearum* DON production in the saprophytic competition with *Trichoderma atroviride* in maize tissue microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 211-220.
- NEVALAINEN, H. & NEETHLING, D. (1998): The safety of *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds.): *Trichoderma and Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis, London. 193-205.
- NICOLOTTI, G. & VARESE, G.C. (1996): Screening of antagonistic fungi against air-borne infection by *Heterobasidion annosum* on Norway spruce. *Forest Ecology and Management* **88**: 249-257.
- NICOLOTTI, G., GONTHIER, P., VARESE, G.C. (1999): Effectiveness of some biocontrol and chemical treatments against *Heterobasidion annosum* on Norway spruce stumps. *Eur. J. For. Path.* **29**: 339-346.
- NIRENBERG, H. (1981): A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Can. J. Bot.* **59**: 1599-1609.
- NULTSCH, W. (2001): Allgemeine Botanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 663 S.
- O'BRIEN, R.W. & RALPH, B.J. (1966): The cell wall composition and the taxonomy of some basidiomycetes and ascomycetes. *Annals of Botany* **30**: 831-843.
- OH, S.K., KAMDEM, D.P., KEATHLEY, D.E. & HAN, K.H. (2003): Detection and species identification of wood-decaying fungi by hybridization of immobilized sequence-specific oligonucleotide probes with PCR-amplified fungal ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers. *Holzforschung* **57**: 346-352.
- OSPINA-GIRALDO, M.D., ROYSE, D.J., CHEN, X. & ROMAINE, C.P. (1999): Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology* **89**: 308-313.
- PAPAVIZAS, G.C. (1985): *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology and potential for biocontrol. *Phytopathology* **23**: 23-54.

- PAPAVIZAS, G.C. & LUMSDEN, R.D. (1982): Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Plant Disease* **66**: 1019-1020.
- PAULUS, B. & GADEK, P. (2006): Successional patterns of Microfungi in fallen leaves of *Ficus pleurocarpa* (Moraceae) in an Australian tropical rain forest. *Biotropica* **38**: 42-51.
- PEARCE, R.B. (2000): Decay development and its restriction in trees. *Journal of Arboriculture* **26**: 1-11.
- PÉREZ, L.M., METTIFOGO, S., ZALDÍVAR, M. & MUSALEM, M. (1991): Sooty molds infecting citrus species in Chile: identification of the associated fungi and their ability to secrete plant cell wall hydrolyzing enzymes. *Fitopatología* **26**: 28-38.
- PEZET, R., PONT, P. & TABACCHI, R. (1999): Simple analysis of 6-pentyl- $\alpha$ -Pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochemical Analysis* **10**: 285-288.
- POTTLE, H.W. & SHIGO, A.L. (1975): Treatment of wounds on *Acer rubrum* with *Trichoderma viride*. *Eur. J. For. Path.* **5**: 274-279.
- POTTLE, H.W., SHIGO, A.L. & BLANCHARD, R.O. (1977): Biological control of wound Hymenomycetes by *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease Reporter* **61**: 687-690.
- PRYCE, T.M., PALLADINO, S., KAY, I.D. & COOMBS, G.W. (2003): Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using automated capillary electrophoresis system. *Medical Mycology* **41**: 369-381.
- RAMAKRISHNA, N. LACEY, J. & SMITH, E. (1993): Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. *Mycol. Res.* **97**: 1393-1402.
- RANGANATH, H.R. & SHYAM PRASAD SHEEBA, G. (2002): PCR-fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collections – a need for re-identification of these economically important fungi. *Current Science* **83**: 372-374
- RAYNER, A.D.M. & BODDY, L. (1988): Fungal decomposition of wood, its biology and ecology. John Wiley & Sons Ltd Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. 587 S.
- REDFERN, D.B. & FILIP, G.M. (1991): Inoculum and infection. In: SHAW C.G. & KILE, G.A. (Hrsg.): *Armillaria* root disease. USDA Washington D.C. 48-61.
- REIB, I. (1986): Schimmelpilze. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. 229 S.
- RICARD, J.L. (1981): Commercialization of *Trichoderma* based mycofungicide: some problems and solutions. *Biocontrol News and Information* **2**: 95-98.
- RICHARD, F., MILLOT, S., GARDES, M. & SELOSSE, M.A. (2005): Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* **166**: 1011-1023.
- RIFAI, M.A. (1969): A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* **116**: 1-56.
- RISBETH, J. (1961): Inoculation of pine stumps against infection by *Fomes annosus*. *Nature* **191**: 826-827.
- ROCO, A. & PÉREZ, L.M. (2001): *In vitro* biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. *Journal of Biotechnology* **4**: 68-73.
- ROIGER, D.J., JEFFERS, S.N. & CALDWELL, R.W. (1991): Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biol. Biochem.* **23**: 353-359.
- ROLOFF, A. (2001): Baumkronen – Verständnis und praktische Bedeutung eines komplexen Naturphänomens. Ulmer Verlag. Stuttgart. 164 S.

- ROSE, D.R. (1993): Rotters: an expert key for the identification of wood-rotting fungi in culture. *Binary* **5**: 43-46.
- RUBIO, M.B., HERMOSA, M.R., KECK, E. & MONTE, E. (2005): Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial Ecology* **49**: 25-33.
- SAHAI, A.S. & MANOCHA, M.S. (1993): Chitinase of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interactions. *FEMS Microbiology Reviews* **11**: 317-338.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning. A Laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SAMUELS, G.J. (1996): *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* **100**: 923-935.
- SAMUELS, G.J. (2006): *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* **96**: 195-206.
- SAMUELS, G.J., PETRINI, O. & MANGUIN, S. (1994): Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* **86**: 421-435.
- SCARSELLETTI, R. & FAULL, J.L. (1994): *In vitro* activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici*. *Mycol. Res.* **98**: 1207-1209.
- SCHLICK, A., KUHL, W., LIECKFELDT, E. BÖRNER, T. & MESSNER, K. (1994): Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutations in fungal DNA: implication of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* **26**: 74-78.
- SCHLÖSSER, E. (1983): Allgemeine Phytopathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 280S.
- SCHIRMBÖCK, M., LORITO, M., HAYES, C.K., ARISAN-ATAC, I., SCLA, F., HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (1994): Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4364-4370.
- SCHMIDT, O. & MORETH, U. (2002): Data bank of rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. *Wood Science and Technology* **36**: 429-433.
- SCHMIDT, P.F. (1994): Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse. Expert-Verlag. 810 S.
- SCHOEMAN, M.W., WEBBER, J.F. & DICKINSON, D.J. (1994): A rapid method for screening potential biocontrol agents of wood decay. *Eur. J. For. Path.* **24**: 154-159.
- SCHOEMAN, M.W., WEBBER, J.F. & DICKINSON, D.J. (1995): Efficacy of *Trichoderma* protection applied in chain saw oil or by direct application in water. *Material und Organismen* **29**: 305-309.
- SCHOEMAN, M.W., WEBBER, J.F. & DICKINSON, D.J. (1996): The effect of diffusible metabolites of *Trichoderma harzianum* on *in vitro* interactions between basidiomycete isolates at two different temperature regimes. *Mycol. Res.* **100**: 1454-1458.
- SCHWARZE, F.W.M.R. (1995): Entwicklung und biomechanische Auswirkungen von holzersetzenden Pilzen in lebenden Bäumen und *in vitro*. Diss. Univ. Freiburg. Erndtebrück: SVK, 163 S.
- SCHWARZE, F.W.M.R. (2001): Holzersetzungsstrategien von Pilzen und ihre Bedeutung für die Fäuledynamik im lebenden Baum. Habilitationsschrift, Universität Freiburg, 91S.
- SCHWARZE, F.W.M.R. (2002): Development and Prognosis of Decay in the Sapwood of living trees. *Arboricultural Journal* **25**: 321-337.

- SCHWARZE, F.W.M.R. & FINK, S. (1994): Ermittlung der Holzzersetzung am lebenden Baum. Möglichkeiten und Grenzen verschiedener Diagnosemethoden zur Erfassung von Holzzersetzungsmustern. *Neue Landschaft* **39**: 182-193.
- SCHWARZE, F.W.M.R. & FINK, S. (1997): Reaction zone penetration and prolonged persistence of xylem rays in London plane wood degraded by the basidiomycete *Inonotus hispidus*. *Mycol. Res.* **101**: 1201-1214.
- SCHWARZE, F.W.M.R. & BAUM, S. (2000): Mechanisms of reaction zone penetration by decay fungi in wood of beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytol.* **146**: 129-140.
- SCHWARZE, F.W.M.R. & FERNER, D. (2003): Ganoderma on trees – Differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboricultural Journal* **27**: 59-77.
- SCHWARZE, F.W.M.R., ENGELS, J. & MATTHECK, C. (1999): Holzzersetzende Pilze in Bäumen. Strategien der Holzzersetzung. Rombach Verlag, Freiburg. 245 S.
- SCHWARZE, F.W.M.R., BAUM, S & FINK, S. (2000a): Resistance of fibre regions in wood of *Acer pseudoplatanus* degraded by *Armillaria mellea*. *Mycol. Res.* **104**: 126-132.
- SCHWARZE, F.W.M.R., BAUM, S. & FINK, S. (2000b): Dual modes of degradation within oak wood by the brown rot fungus *Fistulina hepatica*. *Mycol. Res.* **104**: 846-852.
- SCHWARZE, F.W.M.R., GRÜNER, J., SCHUBERT, M. & FINK, S. (2002): Abwehrreaktionen und Pilzinfektion in *Fraxinus excelsior* und *Tilia platyphyllos* nach Stammverletzungen – eine differenzierte Betrachtung des CODIT – Modells. Tagungsband 20. Osnabrücker Baumpflegetage.
- SEEHANN, G. (1979): Holzerstörende Pilze an Straßen- und Parkbäumen in Hamburg. *Mitt. Dtsch. Dendrolog. Ges.* **71**: 193-221.
- SEUNG-UK, O., YUN, B., LEE, S. & YOO, I. (2005): Structures and biological activities of novel antibiotic peptaibols neotroviridins A-D from *Trichoderma atroviride* F80317. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **15**: 384-387.
- SHANNON, C.E. & WEAVER, W. (1949): The mathematical theory of communication. Urbana IL: The University of Illinois Press.
- SHIELDS, J.K., ATWELL, E.A. (1963): Effect of mold, *Trichoderma viride* on decay of birch by four storage rot fungi. *For. Prod. J.* **13**: 262-265.
- SHIGO, A.L. (1980): Branches. *Journal of Arboriculture* **6**: 300-304.
- SHIGO, A.L. (1984a): Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Ann. Rev. Phytopathol.* **22**: 189-214.
- SHIGO, A.L. (1984b): Tree decay and pruning. *Arboricultural Journal* **8**: 1-12.
- SHIGO, A.L. & HILLIS, W.E. (1973): Heartwood, discolored wood, and microorganisms in living trees. *Ann. Rev. Phytopathol.* **11**: 197-222.
- SHIGO, A.L. & SHORTLE, W.C. (1984): Wound dressings: Results of studies over thirteen years. *Arboricultural Journal* **9**: 193-210.
- SHIGO A.L., SHORTLE W.C. & GARRETT P.W. (1977): Genetic control suggested in compartmentalization of discolored wood associated with tree wounds. *Forest Science* **23**: 179-182.
- SHORTLE W.C., SMITH K.T. (1990): Decay column boundary layer formation in maple. *Biodeterioration Research* **3**: 377-389.
- SHUMAN, S. (1994): Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**: 32678-32684.

- SIEBER, T.N., KOWALSKI, T., HOLDENRIEDER, O. (1995): Fungal assemblages in stem and twig lesions of *Quercus robur* in Switzerland. *Mycol. Res.* **99**: 534-538.
- SIMON, A., & SIVASITHAMPARAM, K. (1988): Interactions among *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Trichoderma koningii* and soil bacteria. *Can. J. Microbiol.* **34**: 871-876.
- SINCLAIR, W.A., LYON, H.H. & JOHNSON, W.T. (1987): Diseases of trees and shrubs. Cornell University Press, Ithaca, New York. 574 S.
- SITTE, P., WEILER, E.W., KADEREIT, J.W., BRESINSKY, A. & KÖRNER, C. (2002): Strasburger – Lehrbuch der Botanik. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin. 1123 S.
- SMITH, K.T., BLANCHARD, R.O. & SHORTLE, W.C. (1981): Postulated mechanism of biological control of decay fungi in Red Maple wounds treated with *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **71**: 496-498.
- SPIERS, A.G. & BREWSTER, D.T. (1997): Evaluation of chemical and biological treatments for control of *Chondrostereum purpureum* infection of pruning wounds in willows, apples and peaches. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **25**: 19-31.
- SRINIVASAN, U., STAINES, H. J., BRUCE, A. (1992): Influence of media type on antagonistic modes of *Trichoderma* spp. against wood decay basidiomycetes. *Material und Organismen* **27**: 301–321.
- STALPERS, J.A. (1978). Identification of wood inhabiting *Aphyllophorales* in pure culture. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, *Studies in Mycology* **16**: 1-248.
- SUTTON, L.M. & STARZYK, M.J. (1972): Procedure and analysis of a useful method in determining mycelial dry weights from agar plates. *Appl. Microbiol.* **24**: 1011-1012.
- TAKASHIMA, S., NAKAMURA, A., HIDAKA, M., MASAKI, H. & UOZUMI, T. (1999): Molecular cloning and expression of the novel fungal  $\beta$ -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *Journal of Biochemistry* **125**: 728-736.
- TANG, P., MOHAN, S., SIGLER, L., WITTERICK, I., SUMMERBELL, R., CAMPBELL, I. & MAZZULLI, T. (2003): Allergic fungal sinusitis associated with *Trichoderma longibrachiatum*, *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5333-5336.
- TENZER, I., IVANISSEVICH, S., MORGANTE, M. & GESSLER, C. (1999): Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **89**: 748-753.
- TIEDT, L.R., JOOSTE, W.J. & HAMILTON-ATTWELL, V.L. (1987): Technique for preserving aerial fungus structures for Scanning Electron Microscopy. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **88**: 420-422.
- TRONSMO, J. & RAA, W.S. (1977): Atagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **89**: 216-220.
- TRONSMO, A. & DENNIS, C. (1978): Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **71**: 469-474.
- TURNER, D., KOVACS, W., KUHL, K., LIECKFELDT, E., PETER, B., ARSIAN-ATAV, I., STRAUSS, J., SAMUELS, G.J., BÖRNER, T. & KUBICEK, C.P. (1997): Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. *Mycol. Res.* **101**: 449-459.
- VARESE, G.C., BUFFA, G., LUPPI, A.M., GONTHIER, P. NICOLOTTI, G., CELLERINO, G.P. (1999): Effects of biological and chemical treatments against *Heterobasidion annosum* on the microfungal communities of *Picea abies* stumps. *Mycologia* **91**: 747-755.
- VEGH, I., FOUCHER, S. & LE BERRE, A. (1994): Phytopathological consequences of pruning plane trees in urban environments and screening for natural antagonists against wood decay basidiomycetes. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **29**: 315-328.

- VENÄLÄINEN, M., HARJU, A.M., KAINULAINEN, P., VITANEN, H. & NIKULAINEN, H. (2003): Variation in the decay resistance and its relationship with other wood characteristics in old Scots pines. *Ann. For. Sci.* **60**: 409-417.
- VINDELØV, J. & ARNEBORG, N. (2002): Effects of temperature, water activity, and syrup film composition on the growth of *Wallemia sebi*: Development and assessment of a model predicting growth lags in syrup agar and crystalline sugar. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1652-1657.
- VITERBO, A., MONTERO, M., RAMOT, O., NTE, E., LLOBELL, A. & CHET, I. (2002): Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr. Genet.* **42**: 114-122.
- VIZCAÍNO, J.A., SANZ, L., BASILIO, A., VICENTE, F., GUTIÉRREZ, S., HERMOSA, M.R. & MONTE, E. (2005): Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycol. Res.* **109**: 1397-1406.
- VON ARX, J.A. (1981): The genera of fungi sporulating in pure culture. Cramer, Vaduz. 215 S.
- WAGENFÜHR, R. (1996). Holzatlas. Fachbuchverlag, Leipzig. 688 S.
- WALLANDER, H. & PALLON, J. (2005): Temporal changes in the elemental composition of Rhizopogon rhizomorphs during colonization of patches with fresh organic matter or acid-washed sand. *Mycologia* **97**: 295-303.
- WANG, C.J.K. & ZABEL, R.A. (1990): Identification manual for fungi from utility poles in the eastern United States. ATCC, Maryland. 356 S.
- WANG, Y.Z., WEBER, J.L., ZHONG, G. & TANKSLEY, S.D. (1994): Survey of plant short tandem repeats. *Theoretical and Applied Genetics* **88**: 1-6
- WANG, E., TONG, W.Z., JIANG, F.L., ZHAO, P.J. (2001): Study on control of *Armillariella tabescens* in willow. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology* **21**: 41-44.
- WARDLAW, T.J. & NEILSEN, W.A. (1999): Decay and others defects associated with pruned branches of *Eucalyptus nitens*. *Tasforests* **11**: 49-57.
- WEBSTER, J. (1983): Pilze – Eine Einführung. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 641 S.
- WEINDLING, R. (1932): *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathol.* **22**: 837-845.
- WEINDLING, R. (1934): Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* **24**: 1153-1179.
- WHEATLEY, R.E., HACKETT, C., BRUCE, A. & KUNDZEWICZ, A. (1997): Effect of substrate composition on the production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi. *Intern. Biodet. & Biodeg.* **39**: 199-205.
- WHIPPS, J.M. & MAGAN, N. (1987): Effects of nutrient status and water potential of media on fungal growth and antagonist-pathogen interactions. *Eppo Bulletin* **17**: 581-591.
- 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. (eds.): PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press. San Diego - California.
- WICKLOW, D.T. (1992): Interference competition. In: CAROLL, G.C & WICKLOW, D.T. (eds): The fungal Community: Its organization and role in the ecosystem. Marcel Dekker, New York. 265-274.
- WILKINS, K., FOG NIELSEN, K., DU DIN, S. (2003): Patterns of volatile metabolites and nonvolatile Trichothecenes produced by isolates of *Stachybotrys*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium* and *Memnoniella*. *Environmental Science & Pollution Research (ESPR)* **10**: 162-166.

- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* **18**: 6531-6535.
- WILLIAMS, J., CLARKSON, J.M., MILLS, P.R. & COOPER, R.M. (2003a): Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4192-4199.
- WILLIAMS, J., CLARKSON, J.M., MILLS, P.R. & COOPER, R.M. (2003b): A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4190-4191.
- WODZINSKI, R.S., UMHOLTZ, T.E., RUNDLE, J.E. & BEER, S.V. (1994): Mechanisms of inhibition of *Erwinia amylovora* by *Erwinia herbicola* *in vitro* and *in vivo*. *J. Appl. Bacteriol.* **76**: 22-29.
- WOO, S.L., SCALA, F. & LORITO, M. (2006): The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* **96**: 181-185.
- WUCZKOWSKI, M., DRUZHININA, I., GHERBAWY, Y., KLUG, B., PRILLINGER, H. & KUBICEK, C.P. (2003): Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiol. Res.* **158**: 125-133.
- YANG, D.Q. (2005): Isolation of wood-inhabiting fungi from Canadian hardwood logs. *Can. J. Microbiol.* **51**: 1-6.
- YEDIDIA, I., BENHAMOU, N., & CHET, I. (1999): Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1061-1070.
- ZEILINGER, S. (2004): Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr. Gen.* **45**: 54-60.
- ZEILINGER, S., GALHAUP, C., PAYER, K., WOO, S.L., MACH, R.L.; FEKETE, C., LORITO, M. & KUBICEK, C.P. (1999): Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet. Biol.* **26**: 131-140.
- ZIMAND, G., VALINSKY, L., ELAD, Y., CHET, I. & MANULIS, S. (1994): Use of RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycol. Res.* **98**: 531-534
- ZIMMERMANN, M.H. & ZIEGLER, H. (1975). List of sugars and sugar-alcohols in sieve-tube exudates. In: ZIMMERMANN, M.H. & MILBURN, J.A. (eds), 'Encyclopedia of Plant Physiology', New Series, vol. 1: Appendix III, 479-503.
- ZTV-BAUMPFLEGE (2006): Zusätzliche Technische Vertragsbedingungen und Richtlinien für Baumpflege. FLL, Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung Landschaftsbau e. V.

## ANHANG

Tabelle 1: Impfkampagne am Standort Ludwigshafen, BASF Werksgelände

Nummer	Baumart	Alter	Vitalität	Höhe	BHD	Kronen Ø	Behandlung	Besonderheiten
1	<i>Platanus</i>	15	1,5	10	30	6	Verf. A	S <sup>4</sup> ; W <sup>2</sup>
2	<i>Platanus</i>	15	1,5	10	30	6	Verf. A	
3	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Verf. A	
4	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Verf. A	
5	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Verf. A	W <sup>2</sup>
6	<i>Platanus</i>	25	1	8	25	8	Verf. A	W <sup>2</sup>
7	<i>Platanus</i>	25	1	8	25	8	Verf. A	
8	<i>Platanus</i>	25	1	8	25	8	Verf. A	
9	<i>Platanus</i>	25	0,5	10	30	8	Verf. A	W <sup>2</sup>
10	<i>Platanus</i>	25	0,5	10	30	8	Verf. A	W <sup>2</sup>
11	<i>Platanus</i>	25	0,5	10	30	8	Verf. A	
12	<i>Platanus</i>	25	0,5	10	30	8	Verf. A	
13	<i>Platanus</i>	30	0,5	12	50	12	Verf. B	
14	<i>Platanus</i>	30	0,5	12	50	12	Verf. B	W <sup>2</sup>
15	<i>Platanus</i>	30	1	12	50	12	Verf. B	
16	<i>Platanus</i>	15	1	10	30	6	Verf. B	W <sup>2</sup>
17	<i>Platanus</i>	15	1,5	10	30	6	Verf. B	S <sup>3</sup>
18	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Verf. B	
19	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Verf. B	
20	<i>Platanus</i>	20	1	12	40	10	Verf. B	W <sup>2</sup>
21	<i>Platanus</i>	25	0,5	10	30	8	Verf. B	W <sup>2</sup>
22	<i>Platanus</i>	25	1	10	30	8	Verf. B	W <sup>2</sup>
23	<i>Platanus</i>	25	1	10	30	8	Verf. B	
24	<i>Platanus</i>	25	0,5	10	30	8	Verf. B	
25	<i>Platanus</i>	30	1	12	50	12	Verf. C	
26	<i>Platanus</i>	30	0,5	12	50	12	Verf. C	
27	<i>Platanus</i>	30	0,5	12	50	12	Verf. C	W <sup>2</sup>
28	<i>Platanus</i>	30	1	12	50	12	Verf. C	W <sup>2</sup>
29	<i>Platanus</i>	30	0,5	12	50	12	Verf. C	
30	<i>Platanus</i>	15	1	10	30	6	Verf. C	
31	<i>Platanus</i>	15	1,5	10	30	6	Verf. C	S <sup>4</sup>
32	<i>Platanus</i>	20	1	12	40	10	Verf. C	
33	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Verf. C	
34	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Verf. C	W <sup>2</sup>
35	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Verf. C	
36	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Verf. C	
37	<i>Platanus</i>	30	1	12	50	12	Kontrolle	
38	<i>Platanus</i>	30	0,5	12	50	12	Kontrolle	
39	<i>Platanus</i>	30	0,5	12	50	12	Kontrolle	W <sup>2</sup>
40	<i>Platanus</i>	30	1	12	50	12	Kontrolle	W <sup>2</sup>
41	<i>Platanus</i>	15	1,5	10	30	6	Kontrolle	S <sup>3</sup>
42	<i>Platanus</i>	15	1	10	30	6	Kontrolle	
43	<i>Platanus</i>	15	1,5	10	30	6	Kontrolle	W <sup>2</sup>
44	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Kontrolle	W <sup>2</sup>
45	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Kontrolle	
46	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Kontrolle	
47	<i>Platanus</i>	20	0,5	12	40	10	Kontrolle	
48	<i>Platanus</i>	25	0,5	10	30	8	Kontrolle	
49	<i>Platanus</i>	25	1	10	30	8	Kontrolle	
50	<i>Platanus</i>	25	1	10	30	8	Kontrolle	
51	<i>Platanus</i>	25	0,5	8	25	8	Kontrolle	

Nummer	Baumart	Alter	Vitalität	Höhe	BHD	Kronen Ø	Behandlung	Besonderheiten
52	<i>Platanus</i>	25	1	8	25	8	Kontrolle	u; W <sup>2</sup>
53	<i>Platanus</i>	25	1	8	25	8	Kontrolle	S <sup>4</sup>
54	<i>Platanus</i>	25	1	8	25	8	Kontrolle	
54	<i>Acer</i>	25	1,5	10	15	10	Verf. A	
55	<i>Acer</i>	25	2	10	15	10	Verf. A	T; S <sup>4</sup> ; P <sup>2</sup>
56	<i>Acer</i>	20	2	7	20	8	Verf. A	T
57	<i>Acer</i>	20	1,5	7	25	7	Verf. A	
58	<i>Acer</i>	20	2	7	20	8	Verf. B	T; S <sup>4</sup> ; P <sup>2</sup>
59	<i>Acer</i>	20	1,5	7	20	8	Verf. B	
60	<i>Acer</i>	15	2	5	15	5	Verf. B	T
61	<i>Acer</i>	20	2	10	25	7	Verf. B	T
62	<i>Acer</i>	25	2	10	30	12	Verf. C	T
63	<i>Acer</i>	25	2	10	30	12	Verf. C	T; S <sup>4</sup> ; P <sup>2</sup>
64	<i>Acer</i>	25	1,5	10	30	12	Verf. C	
65	<i>Acer</i>	25	1,5	10	20	9	Verf. C	
66	<i>Acer</i>	25	2	10	15	11	Kontrolle	T; S <sup>4</sup> ; P <sup>2</sup>
67	<i>Acer</i>	20	1,5	7	20	8	Kontrolle	
68	<i>Acer</i>	20	2	7	20	8	Kontrolle	T
69	<i>Acer</i>	25	2	10	30	12	Kontrolle	T; W <sup>3</sup>
70	<i>Acer</i>	15	2	5	15	5	Kontrolle	T; S <sup>4</sup> ; P <sup>2</sup>
71	<i>Robinia</i>	20	2	8	25-30	8	Verf. A	T
72	<i>Robinia</i>	20	2	8	25-30	8	Verf. A	T
73	<i>Robinia</i>	20	2	8	25-30	8	Verf. B	T; S <sup>1</sup>
74	<i>Robinia</i>	20	1,5	8	25-30	8	Verf. B	
75	<i>Robinia</i>	20	1,5	8	30	8	Verf. C	
76	<i>Robinia</i>	20	2	8	30	8	Verf. C	T
78	<i>Robinia</i>	20	1,5	8	25-30	8	Kontrolle	
79	<i>Robinia</i>	20	2	8	25-30	8	Kontrolle	T; S <sup>4</sup>
80	<i>Robinia</i>	20	1,5	8	30	8	Kontrolle	
81	<i>Populus</i>	70/90	1	35	90	20-25	V. A;B;C; K	4 Wunden>50cm

**Legende:**

u = unterständig

T = Trockenstress

K = Käferbefall

P<sup>1:2</sup> = Pilzbefall (Blätter<sup>1</sup>; Holz<sup>2</sup>)W<sup>1:2:3</sup> = Wuchsanomalien (Krebs<sup>1</sup>; Beulen<sup>2</sup>; Drehwuchs<sup>3</sup>)S<sup>1:2:3:4</sup> = Schäden (Krone<sup>1</sup>; Stamm<sup>2</sup>; Stammfuß<sup>3</sup>, Wurzeln<sup>4</sup>)A = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml]B = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml + 0,2% Glucose + 0,1 % Harnstoff]C = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml + 0,2% Glucose + 0,1 % Harnstoff + 0,4 % Natriumpolyacrylat]

Gesamt Ludwigshafen: 81 Bäume

**Tabelle 2:** Impfkampagne am Standort Straßburg Rue de Saint Joseph

Nummer	Baumart	Alter	Vitalität	Höhe	BHD	Kronen Ø	Behandlung	Besonderheiten
1	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	14	Verf. A	W <sup>2</sup>
2	<i>Platanus</i>	30	0,5	12	45	12	Verf. A	S <sup>1</sup>
3	<i>Platanus</i>	30	1	13	50	11	Verf. A	-
4	<i>Platanus</i>	35	1,5	13	50	14	Verf. A	S <sup>4</sup> ; W <sup>2</sup>
5	<i>Platanus</i>	30	1	12	45	12	Verf. A	S <sup>1</sup>
6	<i>Platanus</i>	30	1	12	45	12	Verf. A	-
7	<i>Platanus</i>	20	1,5	11	40	9	Verf. A	S <sup>1</sup> , u
8	<i>Platanus</i>	20	1,5	12	35	8	Verf. A	u
9	<i>Platanus</i>	25	0,5	12	40	11	Verf. A	-
10	<i>Platanus</i>	30	1	13	40	12	Verf. B	-
11	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	14	Verf. B	-S <sup>1</sup>
12	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	14	Verf. B	-
13	<i>Platanus</i>	35	1,5	14	45	13	Verf. B	S <sup>3</sup> ; W <sup>2</sup>
14	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	14	Verf. B	W <sup>2</sup>
15	<i>Platanus</i>	35	1	13	50	14	Verf. B	-
16	<i>Platanus</i>	35	0,5	14	50	13	Verf. B	S <sup>1</sup>
17	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	14	Verf. B	-
18	<i>Platanus</i>	35	1,5	14	50	12	Verf. B	-
19	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	14	Verf. B	W <sup>2</sup>
20	<i>Platanus</i>	35	1	13	50	14	Verf. C <sup>S</sup>	-
21	<i>Platanus</i>	35	1,5	13	50	14	Verf. C <sup>S</sup>	S <sup>1</sup> ; W <sup>2</sup>
22	<i>Platanus</i>	30	1,5	12	45	13	Verf. C <sup>S</sup>	-
23	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	14	Verf. C <sup>S</sup>	S <sup>1</sup>
24	<i>Platanus</i>	35	0,5	14	50	14	Verf. C <sup>S</sup>	-
25	<i>Platanus</i>	35	1	13	50	14	Verf. C <sup>S</sup>	W <sup>2</sup>
26	<i>Platanus</i>	35	1	13	45	14	Verf. C <sup>S</sup>	-
27	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	14	Verf. C <sup>S</sup>	S <sup>1</sup>
28	<i>Platanus</i>	20	1	10	35	9	Verf. C <sup>S</sup>	u
29	<i>Platanus</i>	35	0,5	13	45	14	Kontrolle	-
30	<i>Platanus</i>	30	1	12	45	12	Kontrolle	-
31	<i>Platanus</i>	35	1,5	12	50	14	Kontrolle	S <sup>3</sup>
32	<i>Platanus</i>	20	1,5	9	30	7	Kontrolle	u; S <sup>4</sup> ; W <sup>2</sup>
33	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	13	Kontrolle	-
34	<i>Platanus</i>	35	1	14	50	14	Kontrolle	S <sup>1</sup> ; W <sup>2</sup>
35	<i>Platanus</i>	35	0,5	13	50	14	Kontrolle	W <sup>2</sup>
36	<i>Platanus</i>	35	0,5	14	50	14	Kontrolle	S <sup>1</sup>
37	<i>Platanus</i>	35	1,5	13	45	12	Kontrolle	-

**Legende:**

u = unterständig

T = Trockenstress

K = Käferbefall

P<sup>1:2</sup> = Pilzbefall (Blätter<sup>1</sup>; Holz<sup>2</sup>)W<sup>1:2:3</sup> = Wuchsanomalien (Krebs<sup>1</sup>; Beulen<sup>2</sup>; Drehwuchs<sup>3</sup>)S<sup>1:2:3:4</sup> = Schäden (Krone<sup>1</sup>; Stamm<sup>2</sup>; Stammfuß<sup>3</sup>, Wurzeln<sup>4</sup>)A = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml]B = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml + 0,2% Glucose + 0,1 % Harnstoff]C<sup>S</sup> = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml + 0,5% Glucose + 0,2 % Harnstoff]

Gesamt Straßburg: 37 Bäume

**Tabelle 3:** Künstliche Inokulationsversuche, Freiburg-Lehen

Nummer	Baumart	Alter	Vitalität	Höhe	BHD	Kronen Ø	Behandlung	Besonderheiten
1	<i>Tilia</i>	22	0,5	14	24	7	A + P <sub>1</sub> + T	S <sup>1</sup>
2	<i>Tilia</i>	22	1	13	21	6	A + P <sub>2</sub> + T	
3	<i>Tilia</i>	22	1	10	15	5	A + P <sub>3</sub> + T	
4	<i>Tilia</i>	22	1	11	16	5	B + P <sub>1</sub> + T	P <sup>1</sup>
5	<i>Tilia</i>	22	0,5	11	16	5	B + P <sub>2</sub> + T	
6	<i>Tilia</i>	22	0,5	11	17	5	B + P <sub>3</sub> + T	
7	<i>Tilia</i>	22	1	10	16	4	C + P <sub>1</sub> + T	
8	<i>Tilia</i>	22	1,5	9	14	4	C + P <sub>2</sub> + T	u, T
9	<i>Tilia</i>	22	1,5	9	14	4	C + P <sub>3</sub> + T	u, S <sup>3</sup>
10	<i>Tilia</i>	22	0,5	11	15	5	P <sub>1</sub>	
11	<i>Tilia</i>	22	0,5	11	15	5	P <sub>1</sub>	
12	<i>Tilia</i>	22	0,5	12	17	4	P <sub>2</sub>	
13	<i>Tilia</i>	22	1	13	16	5	P <sub>2</sub>	S <sup>1</sup>
14	<i>Tilia</i>	22	1	10	15	6	P <sub>3</sub>	
15	<i>Tilia</i>	22	1	10	16	5	P <sub>3</sub>	
16	<i>Tilia</i>	22	0,5	10	18	6	Verf. A	T
17	<i>Tilia</i>	22	1	9	13	5	Verf. A	
18	<i>Tilia</i>	22	1	8	14	5	Verf. B	T
19	<i>Tilia</i>	22	1,5	12	12	5	Verf. B	u
20	<i>Tilia</i>	22	1,5	11	13	6	Verf. C	u
21	<i>Tilia</i>	22	2	10	13	6	Verf. C	U, S <sup>2</sup>
22	<i>Tilia</i>	22	1	14	23	2	Kontrolle	S <sup>1</sup>
23	<i>Tilia</i>	22	1	11	18	5	Kontrolle	
24	<i>Tilia</i>	22	2	11	17	5	Kontrolle	u
25	<i>Acer</i>	15	1	10	17	4	Verf. A	
26	<i>Acer</i>	15	1	8	16	5	Verf. B	W <sup>2</sup>
27	<i>Acer</i>	15	1	8	17	6	Verf. B	
28	<i>Acer</i>	15	0,5	9	19	5	Verf. C	
29	<i>Acer</i>	15	0,5	9	17	5	Verf. C	
30	<i>Acer</i>	15	1,5	9	14	6	P <sub>1</sub>	U, S <sup>2</sup>
31	<i>Acer</i>	15	1	8	15	5	P <sub>1</sub>	
32	<i>Acer</i>	15	1	9	15	5	P <sub>2</sub>	
33	<i>Acer</i>	15	2	10	18	5	P <sub>2</sub>	u
34	<i>Acer</i>	15	0,5	10	17	4	P <sub>3</sub>	
35	<i>Acer</i>	15	0,5	8	17	3	P <sub>3</sub>	
36	<i>Acer</i>	15	0,5	9	19	4	A + P <sub>1</sub> + T	T
37	<i>Acer</i>	15	1	10	17	4	A + P <sub>2</sub> + T	
38	<i>Acer</i>	15	1	12	21	5	A + P <sub>3</sub> + T	
39	<i>Acer</i>	15	1	12	22	6	B + P <sub>1</sub> + T	W <sup>2</sup>
40	<i>Acer</i>	15	1	9	16	6	B + P <sub>2</sub> + T	
41	<i>Acer</i>	15	1,5	9	14	6	B + P <sub>3</sub> + T	u
42	<i>Acer</i>	15	0,5	10	18	6	C + P <sub>1</sub> + T	
43	<i>Acer</i>	15	0,5	10	18	4	C + P <sub>2</sub> + T	P <sup>1</sup>
44	<i>Acer</i>	15	1	12	19	5	C + P <sub>3</sub> + T	
45	<i>Acer</i>	15	1	11	19	5	Kontrolle	
46	<i>Acer</i>	15	2	11	12	6	Kontrolle	u
47	<i>Acer</i>	15	0,5	10	20	6	Kontrolle	
48	<i>Quercus</i>	15	1	10	19	4	Verf. A	T
49	<i>Quercus</i>	15	1	9	20	5	Verf. B	
50	<i>Quercus</i>	15	0,5	9	21	5	Verf. C	
51	<i>Quercus</i>	15	0,5	9	18	6	A + P <sub>1</sub> + T	u, T
52	<i>Quercus</i>	15	1,5	10	14	5	A + P <sub>2</sub> + T	u
53	<i>Quercus</i>	15	1	10	18	5	A + P <sub>3</sub> + T	
54	<i>Quercus</i>	15	0,5	12	21	6	B + P <sub>1</sub> + T	
55	<i>Quercus</i>	15	0,5	11	16	6	B + P <sub>2</sub> + T	

Nummer	Baumart	Alter	Vitalität	Höhe	BHD	Kronen Ø	Behandlung	Besonderheiten
56	<i>Quercus</i>	15	2	8	11	5	B + P <sub>3</sub> + T	u, T
57	<i>Quercus</i>	15	1	9	11	6	C + P <sub>1</sub> + T	
58	<i>Quercus</i>	15	1,5	9	11	4	C + P <sub>2</sub> + T	u
59	<i>Quercus</i>	15	0,5	9	18	4	C + P <sub>3</sub> + T	
60	<i>Quercus</i>	15	1,5	10	19	6	P <sub>1</sub>	u, T
61	<i>Quercus</i>	15	1	10	17	6	P <sub>2</sub>	
62	<i>Quercus</i>	15	1	8	17	5	P <sub>3</sub>	
63	<i>Quercus</i>	15	0,5	9	18	5	Kontrolle	
64	<i>Populus</i>	8-10	1	7	13	4	A + P <sub>1</sub> + T	T
65	<i>Populus</i>	8-10	1	7	12	1,5	A + P <sub>2</sub> + T	
66	<i>Populus</i>	8-10	1	6	10	2	A + P <sub>3</sub> + T	
67	<i>Populus</i>	8-10	0,5	6	9	1,5	B + P <sub>1</sub> + T	
68	<i>Populus</i>	8-10	0,5	7	11	1	B + P <sub>2</sub> + T	
69	<i>Populus</i>	8-10	1	8	15	2	B + P <sub>3</sub> + T	P <sup>1</sup>
70	<i>Populus</i>	8-10	0,5	7	14	2	C + P <sub>1</sub> + T	
71	<i>Populus</i>	8-10	0,5	6	13	3	C + P <sub>2</sub> + T	
72	<i>Populus</i>	8-10	0,5	6	13	2	C + P <sub>3</sub> + T	S <sup>2</sup>
73	<i>Populus</i>	8-10	1	7	11	3	P <sub>1</sub>	
74	<i>Populus</i>	8-10	0,5	7	10	3	P <sub>2</sub>	
75	<i>Populus</i>	8-10	0,5	7	12	2	P <sub>3</sub>	
76	<i>Populus</i>	8-10	1	6	12	2	Verf. A	u
77	<i>Populus</i>	8-10	1	7	14	3	Verf. B	
78	<i>Populus</i>	8-10	0,5	6	12	2	Verf. C	

**Legende:**

u = unterständig

T = Trockenstress

K = Käferbefall

P<sup>1;2</sup> = Pilzbefall (Blätter<sup>1</sup>; Holz<sup>2</sup>)W<sup>1;2;3</sup> = Wuchsanomalien (Krebs<sup>1</sup>; Beulen<sup>2</sup>; Drehwuchs<sup>3</sup>)S<sup>1;2;3;4</sup> = Schäden ( Krone<sup>1</sup>; Stamm<sup>2</sup>; Stammfuß<sup>3</sup>, Wurzeln<sup>4</sup>)A = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml]B = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml + 0,2% Glucose + 0,1 % Harnstoff]C = [CFU: 10<sup>5</sup> Sporen/ml + 0,2% Glucose + 0,1 % Harnstoff + 0,4 % Natriumpolyacrylat]P<sub>1</sub> = *Inonotus hispidus* (Bull.:Fr.) KarstenP<sub>2</sub> = *Ganoderma adspersum* (S. Schulz.) DonkP<sub>3</sub> = *Polyporus squamosus* (Hud.:Fr.) Fr.

Gesamt Lehen: 78 Bäume