

Studien zum Einsatz von *Trichoderma*-Arten

Biologische Kontrolle Holz zersetzender Pilze an Bäumen

Von Mark Schubert, Thorsten Heller und Siegfried Fink, Freiburg, und Francis Schwarze, St. Gallen

Der Einsatz von Trichoderma-Arten (Stämmen) könnte 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. Sowohl in Labor- als auch in Feldstudien wurde daher eine Trichoderma-Applikation entwickelt. Das Verfahren soll den Antagonisten optimal auf dem Substrat etablieren und den Baum vor einer Infektion schützen.

Schon früh wurde erkannt, dass der Wundbehandlung nach Verletzungen (z.B. durch Schnittmaßnahmen) für den langfristigen Erhalt von Bäumen besondere Bedeutung zukommt [22]. Eine Wundbehandlung sollte demnach die vom Baum gebildeten Abwehrreaktionen nicht negativ beeinflussen, ggf. sogar fördern und vor einer Infektion durch Pathogene schützen. Vor diesem Hintergrund wurde eine Vielzahl von grundlegenden Arbeiten über die beste Schnittführung und den besten Schnittzeitpunkt von Bäumen sowie über die Wirkung und Pflanzenverträglichkeit chemischer und mechanischer Wundbehandlungen durchgeführt [2, 3, 15, 16, 17, 18, 30, 44, 45].

Diplom-Forstwirt M. Schubert ist öffentlich bestellter, vereidigter Sachverständiger und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie, Professur für Forstbotanik. Prof. Dr. F. Schwarze ist leitender Mitarbeiter der Eidgenössischen Materialprüfungs- und Forschungsanstalt (EMPA). T. Heller ist Student an der Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften der Freiburg. Prof. Dr. S. Fink ist Leiter der Professur für Forstbotanik der Universität Freiburg.

Für die Entwicklung alternativer Pflanzenschutzverfahren wurden bereits verschiedene Untersuchungen, basierend auf der Verwendung antagonistischer Mikroorganismen, zur biologischen Kontrolle phytopathogener Erreger durchgeführt und dokumentiert [7–9]. Besondere Aufmerksamkeit gewannen zunehmend Arten der Gattung *Trichoderma* als effektive Antagonisten gegen eine Vielzahl von Pflanzenkrankheiten [5, 25, 27–36, 39]. Das antagonistische Potenzial von *Trichoderma* spp. gegenüber anderen Pilzen beruht auf verschiedenen Mechanismen, die in zahlreichen Studien untersucht und diskutiert wurden [6, 11, 12, 13, 26]. Die Hemmung eines Pilzes durch *Trichoderma* spp. beruht auf:

- Produktion antibiotischer flüchtiger und nichtflüchtiger Substanzen [26];
- Mycoparasitierung und Ausscheiden von Enzymen [40];
- hohe Konkurrenzkraft um Nahrung und Raum [6, 7–10].

Bereits 1932 wies WEINDLING [46] 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 [24]. So finden mittlerweile auch kommerziell erhältliche *Trichoderma*-Produkte eine erfolgreiche Anwendung [35].

Material und Methoden

Alle Holz zersetzenden Pilze stammten aus den an der Professur für Forstbotanik vorhandenen Stammkulturen. Die Auswahl der Holzersetzer erfolgte aufgrund ihres häufigen Vorkommens in städtischen Gebieten sowie ihres natürlichen Auftretens an typischen Stadtbaumarten. Für die Auswahl der Antagonisten wurden folgende Punkte berücksichtigt: Zum einen sollte ein kommerziell erhältliches *Trichoderma*-Produkt (BINAB™ TF WP, Bio-Innovation AB, Karlsborg, Schweden) vertreten sein [35, 37] und zum anderen sollte, in den *in-vitro*-Studien mit *Trichoderma*/Pathogen-Kombinationen gearbeitet werden, über die bisher keine veröffentlichten Daten vorliegen.

Ein *in-vitro*-Screening zum antagonistischen Potenzial hatte das Ziel, einen geeigneten und gegen Holz abbauende Pilze

Tab. 1: In den Studien eingesetzte Holz abbauende Pilze

Pilzart	Isoliert aus	Isolat-Nr.
<i>Polyporus squamosus</i> (Schuppiger Porling)	<i>Tilia cordata</i> (Winter-Linde)	291101.2 ¹
<i>Ganoderma adspersum</i> (Wulstiger Lackporling)	<i>Fagus sylvatica</i> (Buche)	086699.2 ¹
<i>Ganoderma lipsiense</i> (Flacher Lackporling)	<i>Fagus sylvatica</i> (Buche)	250593.1 ¹
<i>Inonotus hispidus</i> (Zottiger Schillerporling)	<i>Fraxinus excelsior</i> (Esche)	200792.1 ¹
<i>Inonotus hispidus</i> (Zottiger Schillerporling)	<i>Platanus x hispanica</i> (Platane)	221105.1 ¹
<i>Kretzschmaria deusta</i> (Brandkrustenpilz)	<i>Acer pseudoplatanus</i> (Berg-Ahorn)	271098.1 ¹
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Austernseitling)	<i>Tilia cordata</i> (Winter-Linde)	140506.1 ¹

Tab. 2: In den Studien eingesetzte *Trichoderma*-Arten

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

¹ = Die Isolate stammen aus den an der Professur für Forstbotanik vorhandenen Kulturen
² = Die Isolate stammen vom Centraalbureau voor Schimmelcultures – Niederlande
³ = Die Isolate stammen von BINAB Bio-Innovation AB
* = *T. fasciculatum* Synonym *T. strictipile* (DRUZHNINA & KUBICEK, 2005)

Baumschutz

gut wirksamen *Trichoderma*-Stamm zu selektieren. In diversen Labortests sollten die wichtigsten Wirkungsmechanismen im Antagonismuskomplex von *Trichoderma* spp. untersucht werden. Hierbei kamen unter anderem Dualkultur- und Interaktions-Tests an Holz sowie Studien zum Wachstum- und Sporenverhalten unter Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren zur Anwendung. Die Durchführung 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.

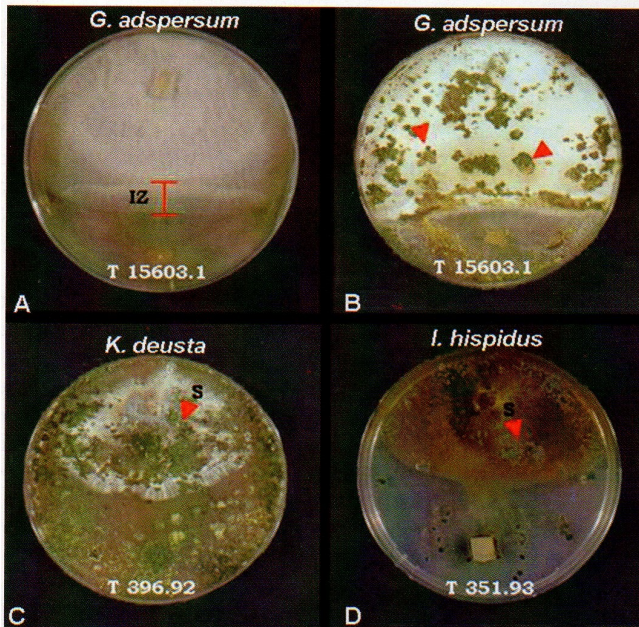


Abb. 1 (links): A: Interaktionszone von T 15603.1 und *G. adspersum* nach wenigen Tagen [IZ]. B: Nach der Inkubationszeit waren Sporenlager von T 15603.1 auf dem Myzel von *G. adspersum* zu erkennen. C: Deutliche Sporenlager von T 396.92 waren nach der Inkubationszeit auf dem Myzel von *K. deusta* zu erkennen [S]. D: T 351.93 überwuchs den Holzersetzer *I. hispidus* innerhalb der Inkubationszeit erfolgreich.

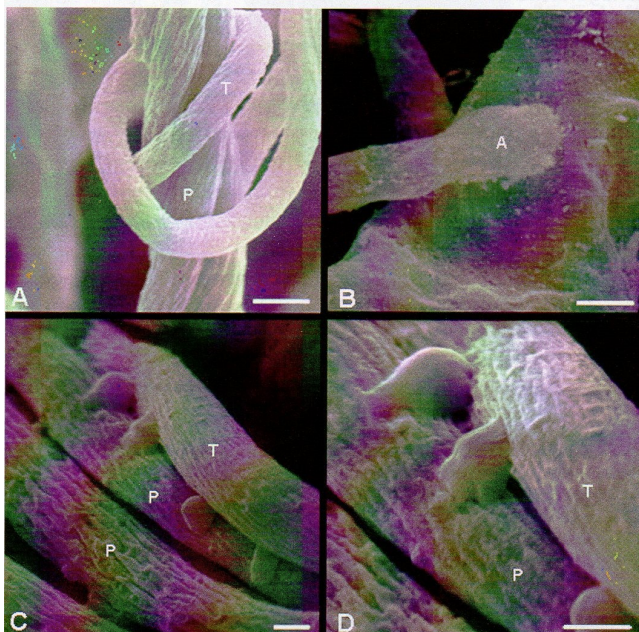


Abb. 2: A: *T. atroviride* 396.92 [T] wächst an den Hyphen von *G. adspersum* [P] entlang und umwickelt die Hyphen, um die Kontaktfläche zu vergrößern (MS = 1 µm). B: Bildung von Appressorien ähnlichen Strukturen [A] durch *T. atroviride* 352.93 (MS = 1 µm). C + D: Eindringen in das Myzel von *I. hispidus* [P] mittels Penetrationshyphen von *T. atroviride* 15603.1 [T] (MS = 1 µm). MS = Maßstab

Um die Dauerhaftigkeit und die antagonistische (schützende) Wirkung des letztlich selektierten *Trichoderma*-Stammes (*Trichoderma atroviride* 15603.1) auf Schnittflächen an Bäumen im Freiland zu untersuchen, wurden an 3 unterschiedlichen Standorten *ad-planta*-Feldversuche (A und B) angelegt und über 4 Vegetationsperioden bonitiert. Hierbei wurden an insgesamt 196 Bäumen von sechs verschiedenen Baumarten Schnittmaßnahmen gemäß der ZTV-Baumpflege [49] durchgeführt und die Wundflächen unmittelbar im Anschluss mit dem selektierten *Trichoderma*-Stamm beimpft (Tab. 3). Die Applikation der Sporensuspensionen von *T. atroviride* 15603.1 erfolgte mit 3 unterschiedlichen Verfahren: Neben 2 Sporenlösungen (105 Sporen/ml aqua dest.) mit und ohne Zusatzstoffe (Glucose & Stickstoff), die mit einer herkömmlichen Sprühflasche (500 ml; 0,5 mm Düsengröße) auf die Wundflächen aufgetragen wurde, kam als 3. Verfahren der Zusatz eines feuchtigkeitsspeichernden Gels (Luquasorb 1030, BASF AG) als Träger-substanz zur Anwendung; die Applikation des Gels erfolgte mithilfe eines Pinsels.

Im Blick des Feldversuches A stand die Dauerhaftigkeit des selektierten *Trichoderma*-Stammes auf dem Substrat [42]. Für das Monitoring des Antagonisten wurden 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 [41].

Für die Bonitierung der schützenden Wirkung des *Trichoderma*-Stammes erfolgten zudem künstliche Infektionsstudien an Bäumen (Versuch B). Nach der Applikation von *T. atroviride* auf die frischen Schnittflächen wurden im Anschluss an eine dreiwöchige Inkubationszeit die Astflächen zusätzlich mit den Holz zersetzenden Pilzen *Inonotus hispidus* 200792.1 *Ganoderma adspersum* und *Polyporus squamosus* inokuliert. Für die Auswertung wurden die Bäume gefällt und Stammsegmente mit den behandelten Schnittwunden entnommen. Für die Pilzanalyse, die histologischen Studien sowie zur Feststellung der Verfärbungen und

Die Durchführung 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.

Um die Dauerhaftigkeit und die antagonistische (schützende) Wirkung des letztlich selektierten *Trichoderma*-Stammes (*Trichoderma atroviride* 15603.1) auf Schnittflächen an Bäumen im Freiland zu untersuchen, wurden an 3 unterschiedlichen Standorten *ad-planta*-Feldversuche (A und B) angelegt und über 4 Vegetationsperioden bonitiert. Hierbei wurden an insgesamt 196 Bäumen von sechs verschiedenen Baumarten Schnittmaßnahmen gemäß der ZTV-Baumpflege [49] durchgeführt und die Wundflächen unmittelbar im Anschluss mit dem selektierten *Trichoderma*-Stamm beimpft (Tab. 3). Die Applikation der Sporensuspensionen von *T. atroviride* 15603.1 erfolgte mit 3 unterschiedlichen Verfahren: Neben 2 Sporenlösungen (105 Sporen/ml aqua dest.) mit und ohne Zusatzstoffe (Glucose & Stickstoff), die mit einer herkömmlichen Sprühflasche (500 ml; 0,5 mm Düsengröße) auf die Wundflächen aufgetragen wurde, kam als 3. Verfahren der Zusatz eines feuchtigkeitsspeichernden Gels (Luquasorb 1030, BASF AG) als Träger-substanz zur Anwendung; die Applikation des Gels erfolgte mithilfe eines Pinsels.

Tab. 3: In den Feldversuchen eingesetzte Baumarten

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

des Überwallungsprozentes im Bereich der Wunden wurden von 78 Bäumen und 242 Schnittflächen Proben entnommen [28, 34]. Abschließend ist der Wirkungsgrad [%] des selektierten Antagonisten nach der Formel von ABBOTT [1] ermittelt worden.

Ergebnisse und Diskussion

Die statistische Analyse der erzielten ID-Werte aus den *in-vitro* Laborversuchen ließ neben signifikanten Unterschieden zwischen den eingesetzten *Trichoderma*-Arten auch signifikante Differenzen zwischen den *T. atroviride*-Stämmen erkennen. Bei den *T. atroviride*-Stämmen 15603.1 und 351.93 sowie bei *T. virens* konnte jeweils ein ID-Wert von 3,6 ermittelt werden. Sie verfügten somit über ein hohes antagonistisches Potenzial. Hingegen ließen *T. atroviride* 396.92 mit einem ID-Index von 3 und *T. fasciculatum* (*strictipile*) mit einem Wert 2,2 nur ein eingeschränktes antagonistisches Potenzial erkennen.

In den Dualkultur-Tests parasitierte und tötete *T. virens* im Durchschnitt in 97 % der Fälle das Myzel der Holzersetzer, gefolgt von *T. atroviride* 15603.1 (87,5 %) und *T. atroviride* 351.93 (82,6 %). Das signifikant schlechteste Ergebnis war bei *T. fasciculatum* mit einer Parasitierungsrate von 35,5 % verzeichnet. In den Dualkultur-Tests wurde in allen Fällen ein Hyphen-Kontakt zwischen *Trichoderma* sp. und dem Holz zersetzenden Pilz beobachtet (Abb. 1A-D). Allerdings waren nicht alle *Trichoderma*-Arten (-Stämme) in der Lage, die Wirte zu überwachsen und zu parasitieren. So deutet vieles darauf hin, dass der Erstkontakt entscheidet, ob es zu einer Parasitierung des Wirtsmyzels durch *Trichoderma* spp. kommt. Neuere Studien konnten belegen, dass, noch bevor die Myzelien der Pilze interagieren, kleinere Mengen an extrazellulären Exochitinasen von *Trichoderma* spp. ausgeschieden werden [4, 21]. 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 [47–48].

Die durchgeführten licht- und rasterelektronenmikroskopischen Studien gewährten einen Einblick in die parasitären Mechanismen (Abb. 2A-D). So konnte ein gezieltes Hyphenwachstum in Richtung des Zielwirts beobachtet werden. Dies lässt auf eine chemotrophische Aktivität schließen [6]. Die Hyphen von *Trichoderma* spp. wuchsen und verzweigten sich auf eine atypische Weise entlang des Myzels der Wirte, um die Kontaktoberfläche zu vergrößern. Zudem konnten gewebeähnliche Strukturen sowie eine Bildung von Haken beobachtet werden, die fest an der Zellwand hafteten. Ein Eindringen in das Myzel der Pathogene erfolgte mittels kleiner und dünner Penetrationshyphen. Bei der Parasitierungsphase ist die Produktion und Aktivität verschiedener hydrolytischer Enzyme, wie β -1,3-Glucanasen, Endo- und Exo-Chitinasen, Cellulasen, Proteasen und Lipasen zum Abbau der Zellwände von großer Bedeutung [7–9, 29, 31, 38]. Der Mycoparasitismus war mit dem kompletten Zellwandabbau und dem Ausfluß (Efflux) des gesamten lebenden Inhalts der Wirtszelle, dem Cytoplasma, beendet. Um die Dualkultur-Tests zum antagonistischen Potenzial von *Trichoderma* spp. gegen Holz abbauende Pilze zu intensivieren, wurden Interaktionsstudien an Holz (*Platanus x hispanica*) nach dem European Standard EN 113 [20] durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Interaktionstests ließen eine hochsignifikante Reduzierung des Gewichtsverlustes (Holzabbau) durch eine Vorbehandlung des Holzes mit einer Sporenlösung von *Trichoderma* spp. um durchschnittlich 62,95 % erkennen. Dabei konnte die Effektivität der schützenden Wirkung von *Trichoderma* spp. durch die Zugabe der Zusatzstoffe Glucose und Harnstoff signifikant um

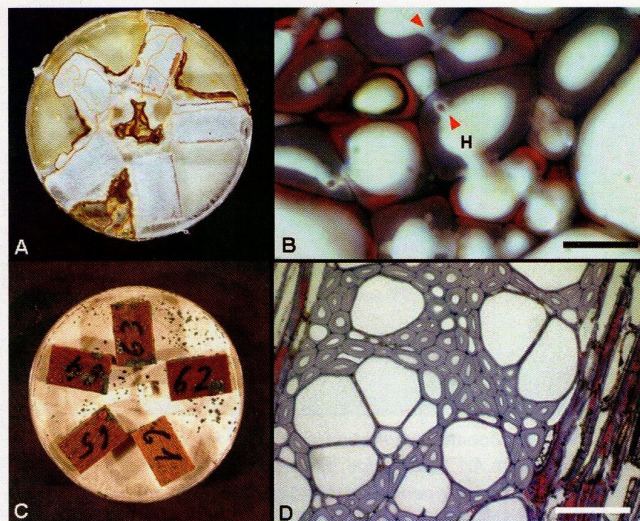


Abb. 3: A: Dichtes, weißes Myzel mit amorpher Kruste von *G. adspersum* auf den Kontrollproben. B: Progressiver Zellwandabbau mittels simultaner Fäule. In unmittelbarer Umgebung der Hyphen [H] erfolgte der Abbau (MS = 5 μ m). C: *T. atroviride* 15603.1 verhinderte eine Besiedlung des Holzes durch *G. adspersum* D: Das mit *T. atroviride* 15603.1 vorbehandelte Holz war weitgehend frei von Zersetzungerscheinungen (MS = 50 μ m).

12,65 % erhöht werden. *Trichoderma atroviride* 15603.1 erzielte 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 wurde bei *T. fasciculatum* mit einer mittleren Reduzierung des Gewichtsverlusts von 44,8 % ermittelt. Die histologische Analyse der mit den Holz abbauenden Pilzen inokulierten Proben (ohne *Trichoderma*-Beimpfung) ließ deutliche Abbauerscheinungen an den Proben erkennen. Dagegen waren die mit *Trichoderma*-beimpften Holzproben weitgehend frei von Zellwandmodifikationen (Abb. 3A-D).

Neben den unterschiedlichen Eigenschaften und Fähigkeiten der einzelnen *Trichoderma*-Arten (-Stämme) und den festgelegten Testbedingungen (C- & N-Quelle, Fe-Angebot, P-Verfügbarkeit, pH-Wert, Temperatur, Wasserregime) waren die Zielorganismen eine entscheidende Größe in den Laborstudien. In dieser Arbeit war offenkundig, 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 [43] berichteten, dass *Polyporus adustus* sich *in vitro* als sehr widerstandsfähig gegenüber *T. viride* erwies. HIGHLEY [23] ermittelte in verschiedenen Labortests eine geringe Wirkung von *Trichoderma* spp. gegen den Pilz *Gleophyllum trabeum*. 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 Emitierung von Substanzen, die in der Lage sind, einzelne Mechanismen im Antagonismuskomplex von *Trichoderma* spp. außer Kraft zu setzen. So wurde beobachtet, 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 verhindert [32]. Weitere Selbstverteidigungsmechanismen von *P. squamosus* könnten der aktive Efflux von antibiotischen Metabo-

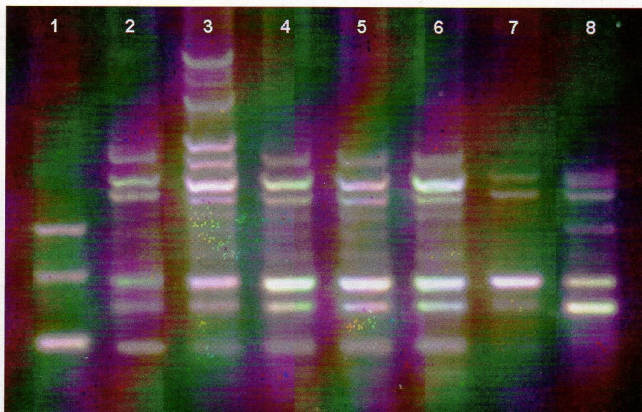


Abb. 4: Nach 30 Monaten Inkubationszeit: 1 = *T. fasciculatum* (strictipile). 2 = Die applizierte Art *T. atroviride* 15603.1. 3 = *T. atroviride* 396.92. 4-6 = *Trichoderma*-Isolate aus den beimpften Schnittflächen am Standort Ludwigshafen und Straßburg. 7+8 = *Trichoderma*-Isolate aus unbehandelten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

liten sowie die Möglichkeit der Entgiftung fungizider Substanzen sein [14].

Die Auswertung der *ad-planta*-Feldversuche zeigte, dass auch nach 30 Monaten der Antagonist aus den behandelten Schnittflächen nachgewiesen (re-isoliert) werden konnte (Abb. 4). Die höchste Re-Isolationsrate (Ø 74,8 %) wurde aus den Wunden erzielt, die mit dem feuchtigkeitsspeichernden Gel behandelt wurden. Hingegen waren die restlichen Verfahren nicht in der Lage, den Antagonisten auf den Schnittflächen zufrieden stellend zu etablieren. In diesem Zusammenhang muss allerdings erwähnt werden, dass die Beharrlichkeit von *T. atroviride* in einem Zeitraum von 30 Monaten an allen Standorten bereits stark eingeschränkt war. So lag

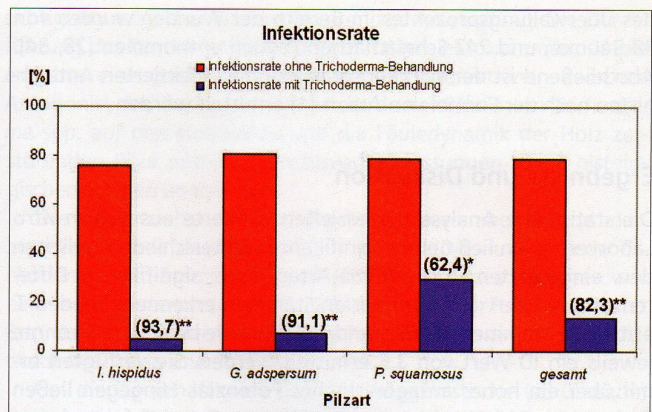


Abb. 5: (Zahl) = Wirkungsgrad [%]. Signifikante Reduzierung der Infektionsrate durch die Beimpfung ist mit * gekennzeichnet. * = signifikant ($p \leq 0,05$); ** = hochsignifikant ($p \leq 0,001$).

die Isolationsrate des Antagonisten nach zwei Monaten deutlich höher als nach 30 Monaten. Neben der fehlenden genetischen Anpassung waren klimatische Parameter und insbesondere das Substrat (Stressmetaboliten, Splint- bzw. Kernholz etc.) sowie biotische Wechselwirkungen für die mangelnde Dauerhaftigkeit verantwortlich.

Ein elementarerer Aspekt der erfolgreichen biologischen Kontrolle von Schadorganismen ist letztendlich die Wirkung des Antagonisten im Feld [19]. Aus diesem Grund wurden die künstlichen Inokulationsversuche (Versuch B) durchgeführt und der Wirkungsgrad [%] von *T. atroviride* 15603.1 ermittelt (Abb. 5). Die höchste Infektionsrate bei den unbehandelten Wunden (ohne *Trichoderma*) erzielte *G. adspersum* mit 81 %, gefolgt von *P. squamosus* (79 %) und *I. hispidus* (76 %). Durch die vorherige Beimpfung der

AFZ - Stellenmarkt

DerWald

PRONATUR

sucht zum nächstmöglichen Zeitpunkt im Einsatzgebiet Südwestdeutschland:

1 DIPL. FORSTINGENIEUR/IN (FH)

mit erfolgreich abgeschlossener Laufbahnprüfung für den gehobenen Forstdienst und Führerschein Klasse B.

Abwechslungsreiche Aufgaben wie Organisation und Betreuung der Holzernte, Pflanzungen und Maschineneinsätze erwarten Sie ebenso wie die Durchführung von Lehrgängen, Waldführungen und Projektarbeiten.

2 FORSTWIRTE/INNEN

mit Berufserfahrung, Führerschein Klasse B und idealerweise Kletterschein A und B.

Ihre Bewerbungsunterlagen schicken Sie bitte an:
Pro Natur GmbH
 Schönauer Straße 10, D-69118 Heidelberg
 E-Mail: kontakt@pronatur-hd.de

Wir sind ein junges expandierendes Unternehmen, das sich der nachhaltigen und ökologischen Umweltarbeit verschrieben hat. Wir sind nicht nur Forstunternehmen und Holzhandel, sondern auch in der forstlichen Bildungsarbeit aktiv. Garten- und Landschaftsbau, Baumpflege und Gutachtererstellung gehören ebenso zu unserem Dienstleistungsspektrum wie Spezialbaumfällungen und Beratungstätigkeiten.

Die
Waldbesitzervereinigung Weilheim e.V.
 sucht
eine/einen stellvertr. Geschäftsführin/er
 in Vollzeitstellung mit forstlicher Ausbildung.
 Voraussetzung Forsttechniker/Forsttechnikerin
 Bezahlung erfolgt nach BAT
 Schriftliche Bewerbungen bis 02.03.2007 an:
WBV-Weilheim e.V.
 Hardtstraße 6, 82362 Weilheim Tel.. 0881/8483

Forst live
 30.03. - 01.04.2007 Messe Offenburg
 www.forst-live.de

Schnittflächen mit *T. atroviride* 15603.1 konnte die durchschnittliche Infektionsrate von 78,7 % hochsignifikant auf 13,9 % 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. adpersum* verzeichnet. Dies ist insofern interessant, da diese Pilze sich in den *in vitro*-Tests als weitgehend 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.

Folgerungen und Ausblick

In vielen Studien wurde mithilfe verschiedener *in vitro*-Versuche geeignete (potente) *Trichoderma*-Arten (-Stämme) für einen späteren Einsatz zur biologischen Kontrolle phytopathogener Pilze selektiert [6,8,38]. 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 Holz abbauende Pilze virulenten Stamm zu selektieren. Aufgrund 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 schützende 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. 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 Abgrenzung und Abschätzung aller Einflussfaktoren ist aufgrund dessen nahezu unmöglich und eine absolute und stetige Wirkung mittels eines biologischen Verfahrens schwer zu erreichen. In diesem Zusammenhang sind folgende Punkte zu nennen:

- Das Auftragen des Antagonisten ist nicht zu jeder Zeit möglich. Der Etablierungserfolg von

Literaturverzeichnis:

- [1] ABBOTT, W. S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- [2] BALDER, H. (1992): Pflanzenverträglichkeit von Wundbehandlungen in der Baumpflege. *Gesunde Pflanzen* 44: 296-302.
- [3] BALDER, H. (1993): Aspekte des Pflanzenschutzrechts bei der Wundbehandlung in der Baumpflege. *Gesunde Pflanzen* 45: 303-311.
- [4] BRUNNER, K.; PETERBAUER, C. K.; MACH, R. L.; LORITO, M.; ZELLINGER, 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] COOK, R. J.; BAKER, K. F. (1983): The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathology Society*, St. Paul, Minnesota.
- [10] 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.
- [11] DENNIS, C.; WEBSTER, J. (1971): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 25-39.
- [12] DENNIS, C.; WEBSTER, J. (1971): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 41-48.
- [13] DENNIS, C.; WEBSTER, J. (1971): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 363-369.
- [14] DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. (2003): Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Ann. Rev. Phytopathology* 41: 501-538.
- [15] DUJESIEFKEN, D. (1992): Einfluss von Wundverschlussmitteln auf die Wundreaktion von Bäumen. *Gesunde Pflanzen* 44: 306-311.
- [16] DUJESIEFKEN, D. (1995): *Wundbehandlung an Bäumen*. Thales Verlag, Braunschweig. 148 S.
- [17] DUJESIEFKEN, D. (1998): Wundverschlussmittel – lohnt der Einsatz? In: Dujesiefken, D.; Kockerberk, P. (Hrsg.): *Jahrbuch der Baumpflege 1998*: 206-207.
- [18] DUJESIEFKEN, D.; STOBBE, H.; ECKSTEIN, D. (1998): Langzeitwirkung von Astungen im Holz von Linde und Rosskastanie. *Fortwissenschaftliches Centralblatt* 117: 305-315.
- [19] ELSHERIF, M.; GROSSMANN, F. (1994): Comparative investigations on the antagonistic activity of fluorescent pseudomonads against *Gaeumannomyces graminis var tritici* in vitro and in vivo. *Microbiol. Res.* 149: 371-377.
- [20] 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.
- [21] HARMAN, G. E. (2006): Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194.
- [22] HARTIG, R. (1882): *Lehrbuch der Baumkrankheiten*. Springer Verlag, Berlin. 198 S.
- [23] HIGHELLEY, T. L. (1997): Control of wood decay by *Trichoderma (Gliocladium) virens*. I. Antagonistic properties. *Material and Organisms* 31: 7989.
- [24] 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.
- [25] 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. *Phytopathology*

- 96: 186-189.
- [26] HOWELL, C. R. (1998): The role of antibiotics. In: Harman, G. E.; Kubicek, C. P. (eds.): *Trichoderma and Gliocladium*. Vol 2. Enzymes, biological control, and commercial applications. Taylor, Francis, London. 173-184.
- [27] 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.
- [28] LIESE, W.; DUJESIEFKEN, D.; BREMER, J. (1988): Wundreaktionen bei Linde nach Astung in der Baumpflege. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 107: 184-196.
- [29] 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* C2T413 by addition of cellulose binding domain. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 64: 675-685.
- [30] LONSDALE, D. (1992): Treatment of tree wounds. *Arboriculture Research Note* 109: 1-5.
- [31] 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. *Phytopathology* 83: 302-307.
- [32] 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.
- [33] MANGAN, 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.
- [34] METZLER, B. (1997): Quantitative assessment of fungal colonization in Norway spruce after green pruning. *Eur. J. Forest Pathol.* 27: 1-11.
- [35] MONTE, E. (2001): Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiol.* 4: 1-4.
- [36] PAPA-VIZAS, G. C. (1985): *Trichoderma and Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Phytopathology* 23: 23-54.
- [37] RICARD, J. L. (1981): Commercialization of *Trichoderma* based mycofungicide: some problems and solutions. *Biocontrol News and Information* 2: 95-98.
- [38] 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.
- [39] SAMUELS, G. J. (1996): *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100: 923-935.
- [40] 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.
- [41] SCHUBERT, M.; SCHWARZE, F.; FINK, S. (2006): Konventionelle und molekulargenetische Identifikation von *Trichoderma*-Arten für die biologische Kontrolle von phytopathogenen Pilzen an Bäumen. In: Dujesiefken, D.; Kockerberk, P. (Hrsg.): *Jahrbuch der Baumpflege*. Thales Verlag, Braunschweig. S. 214-218.
- [42] SCHWARZE, F.; SCHUBERT, M. (2003): Studien zum potenziellen Einsatz von *Trichoderma*-Arten als Biologische Kontrolle gegen holzzerstörende Pilze an Stadtbäumen. *Tagungsband*, 21. Osnabrücker Baumpflegetag. [43] 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.
- [44] SHIGO, A. L. (1984a): Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Ann. Rev. Phytopathology* 22: 189-214.
- [45] SHIGO, A. L. (1984b): Tree decay and pruning. *Arboricultural Journal* 8: 1-12.
- [46] WEINDLING, R. (1932): *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22: 837-845.
- [47] 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.
- [48] ZELLINGER, 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.
- [49] ZTV-Baumpflege (2006): *Zusätzliche Technische Vertragsbedingungen und Richtlinien für Baumpflege*. FLL, Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung Landschaftsbau e. V.

Trichoderma sp. war stark von den vorherrschenden Witterungsverhältnissen abhängig.

- Die Wirkung 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 (z.B. *P. squamosus*).
- Wegen des langwierigen Prozesses der Wundheilung (Überwallung) ist die Dauerhaftigkeit des Antagonisten für den Erfolg mit entscheidend. Diese war über einen längeren Zeitraum wegen fehlender Anpassung und mehrerer anderer Faktoren bei *T. atroviride* eingeschränkt. Allerdings sind wahrscheinlich die ersten Monate nach Verletzung besonders wichtig, da

später auch wirtseigene Abgrenzungsmechanismen (Kompartimentierung) greifen.

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 werden in weiterführenden *in vitro*-Screenings zum antagonistischen Potenzial neue Antagonist/Pathogen-Kombinationen unter Berücksichtigung kombinierter Einflussparameter untersucht werden. Hierbei werden Isolate Verwendung finden, die aus dem späteren Zielgebiet stammen. Durch dieses Vorgehen lassen sich genetisch bedingte Anpassungsprobleme der Antagonisten reduzieren. ◀