

## References

- BOLLEY, H. L., 1902: The use of the centrifuge in diagnosing plant diseases. Soc. Prom. Agr. Sci. **23**, 82–85.
- SPIERS, A. G., 1978: An agar leaf-disc technique for screening the effectiveness and persistence of fungicides for control of *Marssonina* on *Populus*. Plant Diseases Reporter **62**, 148–152.
- SPIERS, A. G.; WENHAM, H. T., 1983: Poplar seed-transmission of *Marssonina brunnea*. Eur. J. For. Path., (in press).
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H., 1980: Principles and procedures of statistics. A Biometrical approach. (2nd Ed.) McGraw Hill. 633 p.

*Author's address:* Dr. A. G. SPIERS, Water and Soil Science Centre, Aokautere, Ministry of Works and Development, Private Bag, Palmerston North, New Zealand

*Receipt of Ms. 2. 5. 1983*

*Department of Geography, East China Normal University, Shanghai  
und Lehrstuhl für Forstbotanik der Universität München, München*

## Selektivmedien zum Nachweis von *Heterobasidion annosum* in Feinwurzeln

VON SHEN ZHANG und O. HOLDENRIEDER

### Abstract

**Selective media for the assay of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. in fine roots.** The behaviour of four *Heterobasidion annosum* strains on several selective media containing orthophenylphenol and antibiotics was recorded. The media were tested for selectivity by reisolation of the fungus from artificially infected and contaminated root segments. The following medium is recommended for the assay of *H. annosum* in fine roots: Orthophenylphenol 50 mg/l, Streptomycinsulphate 100 mg/l in water agar.

### 1 Einleitung

Der Basidiomycet *Heterobasidion annosum* (Aphylophorales, Bondarzewiaceae) ist eines der bedeutendsten Forstpathogene der nördlichen Hemisphäre. Fundierte Kenntnisse über Infektion und Ausbreitung dieses Krankheitserregers sind eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung von wirksamen Bekämpfungsmaßnahmen. Die Infektionsbiologie von *H. annosum* ist – speziell bei der Fichte [*Picea abies* (L.) Karst.] – jedoch nur unzureichend bekannt (SCHÜTT 1979; JOHANSSON und UNESTAM 1982). Ein Grund dafür ist in methodischen Schwierigkeiten beim Nachweis dieses Pilzes zu suchen: In der Regel kann *H. annosum* nur anhand seiner typischen Nebenfruchtform identifiziert werden. Diese Konidialform wird entweder bei Inkubation des infizierten Substrates in einer feuchten Kammer (RISHBETH 1951) oder bei Kultur auf künstlichen Medien (BREFELD 1889) gebildet. Die Nachweismethode von RISHBETH ist für sehr kleine und stark kontaminierte Substratvolumina (wie z. B. Feinwurzelschnitte) nur bedingt geeignet, da *H. annosum* hier meist sehr schnell von anderen Pilzarten überwachsen wird und somit nicht mehr erkennbar ist. Dies gilt auch für Kulturversuche auf Malzextraktagar und anderen nährstoffreichen Sub-

straten. Dieses Problem könnte durch ein geeignetes Selektivmedium gelöst werden, welches Wachstum und Sporulation von *H. annosum* ermöglicht, konkurrierende Mikroorganismen jedoch hemmt. Literaturübersichten zu diesem Thema finden sich bei TSAO (1970), BANERJEE und LEVY (1970), sowie HALE und SAVORY (1976). Die vorliegende Untersuchung sollte einen Beitrag zur Entwicklung eines Selektivmediums leisten, das speziell zum Nachweis von *H. annosum* in Feinwurzeln geeignet ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Organismen und Herkunft der Isolate

- *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (*Fomes annosus* P. Karst.):  
 Isolat L 1 (Hetzenhausen / FA Freising, 9. 1. 1981),  
 Isolat Z (Hohenbachern / FA Freising, August 1982),  
 Isolat H (FA Heidenheim, Oktober 1982),  
 Isolat K (*Alnus glutinosa*, Windsfield / Oberbayern, 8. 1. 1980).  
*H. annosum* wurde – soweit nicht anders angegeben – von Fruchtkörpern an Fichtenstubben (*Picea abies* H. Karst.) isoliert.
- *Mucor* cf. *piriformis* Fischer (Faulstelle an Fichtenstubben, Isarau b. Freising, Januar 1983)
- *Penicillium* cf. *janthinellum* Biourge (Kontamination in alter *H. annosum*-Kultur, Januar 1983)
- *Trichoderma harzianum* Rifai (Faulstelle an Fichtenwurzel, Isarau b. Freising, Oktober 1982)
- *Trichoderma polysporum* (Link. ex Pers.) Rifai (Kontamination in alter *H. annosum*-Kultur, März 1983)
- *Trichoderma viride* Pers. ex Gray (Faulstelle an Fichtenwurzel, FA Heidenheim, Oktober 1982)
- Hefen (2 Isolate aus abgestorbenen Fichtenwurzeln, Isarau b. Freising, November 1982)
- Bakterien (3 Isolate aus abgestorbenen Fichtenwurzeln, Isarau b. Freising, November 1982)

Die Stammkulturen wurden auf Malzextraktagar bei 2°C gehalten.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung der Substrate

- Malzextraktagar (MA): 20 g Malzextrakt (Maltzin „trocken“, Diamalt) und 15 g Agar-Agar (Type 1615, Behrens) in 1 l demin. Wasser
- Teeagar (modifiziert) nach BISHT und HARSH (1981): 20 g gebrauchte Teeblätter (trocken) und 15 g Agar-Agar in 1 l demin. Wasser
- Wasseragar: 15 g Agar-Agar in 1 l demin. Wasser
- Selektivmedien: Zugabe von unterschiedlichen Mengen (s. Kap. 3) folgender Substanzen (gelöst) zu Malzextraktagar, Teeagar oder Wasseragar unmittelbar nach dem Autoklavieren:
  - a. Orthophenylphenol (= 2-Hydroxybiphenyl, Fluka)
  - b. Sulfanilamid (Roth)
  - c. Streptomycinsulfat (Merck)
  - d. Nystatin (= Moronal, Mycostatin, Serva)
  - e. Clotrimazol (= Canesten, Bayer)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Wir danken der Fa. Bayer AG, Leverkusen, für die Überlassung der Substanz.

Die Substanzen wurden in gelöster Form oder als Suspension in einer Konzentration von 200 mg/100 ml (Stammlösungen) zugegeben und durch kräftiges Schütteln verteilt. Die Lösung von Orthophenylphenol und Clotrimazol erfolgte in Äthanol (96%), die übrigen Verbindungen wurden in Wasser gelöst bzw. suspendiert. Sulfanilamid und Nystatin sind schwerlöslich, die Suspensionen wurden deshalb 5–10 Minuten lang im Ultraschallbad (Sonorex RK 100 H) behandelt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte nach dem Autoklavieren und Zugabe der Selektivsubstanzen im ca. 80°C heißen Medium mit Essigsäure (10%). Der pH-Wert wurde elektrisch gemessen (Gerät: WTW pH 39, Elektrode: Ingold 7,0 Ag [3 Mol/L] 400 M  $\Omega$ ).

### 2.2.2 Inokula, Kulturbedingungen und Auswertungsverfahren

Die Impfstücke (Durchmesser ca. 5 mm) wurden von wachsenden Kulturen auf MA entnommen und mit der Myzelseite nach unten aufgelegt, Konidien wurden in Form einer wässrigen Suspension aufgetragen (Alter der Mutterkultur ca. 2–3 Wochen), Basidiosporen wurden durch Exposition des Substrates unter dem Hymenophor eines Fruchtkörpers (15 Min.) aufgefangen. Zur Isolierung verschiedener Pilzarten wurden Fruchtkörperexplantate mit einer Größe von ca.  $2 \times 2 \times 1$  mm verwendet.

Mit Ausnahme der Beimpfung von Malzextraktagar (ohne Selektivzusätze) wurden sämtliche Arbeiten unsteril durchgeführt. Die Kulturen wurden in Petrischalen aus Kunststoff mit einem Durchmesser von 9 cm bei 21°C (z. T. auch bei Zimmertemperatur) im Dunkeln gehalten und in jeweils 2–4 Wiederholungen angesetzt.

Die Keimrate wurde durch das Auszählen von jeweils 100 Sporen in unterschiedlichen Zeitabständen bestimmt. Das Myzelwachstum wurde in geeigneten Abständen durch Markierung der Myzelfront an der Unterseite der Petrischale dokumentiert. Die Startphase wurde als der Zeitraum definiert, den der Pilz vom Zeitpunkt der Inokulation bis zur Ausbildung einer Kolonie mit einem Myzelradius von ca. 5 mm (vom Rand des Impfstückes aus gerechnet) benötigt. Die durchschnittliche Wachstumsrate wurde stets während der Phase annähernd linearen Wachstums (vgl. Abb. 1) unter Ausschluß der Startphase ermittelt. Bei zentral beimpften Kulturen wurden hierzu jeweils 4 Myzelradien gemessen, welche zwischen sich 90°-Winkel bilden. Bei exzentrisch beimpften Kulturen wurden jeweils 3 Myzelradien gemessen, die Winkel zwischen diesen betragen 30° (vgl. HOLDENRIEDER 1982, S. 21).

Zur Überprüfung der Selektivität verschiedener Medien wurden Fichtenwurzeln mit einem Durchmesser von 0,3–2,0 mm künstlich infiziert, anschließend kontaminiert und auf das betreffende Medium aufgelegt. Die Infektion erfolgte durch Auflegen der autoklavierten Wurzeln auf Kulturen von *H. annosum* (MA) für 4–5 Wochen bei 21°C. Die infizierten Wurzeln wurden unter fließendem Wasser gewaschen, in ca. 2 mm lange Abschnitte unterteilt und anschließend für 30 Minuten in eine Bodensuspension (ca. 1 cm<sup>3</sup> Gartenerde in 50 ml Wasser) eingelegt, welche mit *Trichoderma harzianum*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp. und Bakterien (jeweils 3 ca. 5 mm große Impfstücke) oder zusätzlich mit Hefen angereichert war.

Die so kontaminierten Proben wurden ohne weitere Behandlung auf die Selektivmedien aufgelegt und bei 21°C inkubiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Malzextraktagar mit einzelnen Selektivsubstanzen

Durch Kulturversuche auf Malzextraktagar, welchem jeweils nur eine antibiotisch wirksame Substanz zugesetzt war, sollte die Toleranz von *H. annosum* gegenüber verschiedenen Verbindungen und deren selektive Wirksamkeit gegenüber ausgewählten mikrobiellen Kontaminationen ermittelt werden.

3.1.1 *Heterobasidion annosum*

Durch Zugabe von Orthophenylphenol (OPP) zum Malzextraktagar wurde bei *H. annosum* in erster Linie die Startphase verlängert; nachdem sich der Pilz an das Medium adaptiert hatte, betrug die Wachstumsrate etwa 50% von der auf reinem Malzextraktagar (Abb. 1). Das Impfstück sowie ein ca. 5. mm breiter Bereich des Mediums um das Inokulum zeigten bereits nach zwei Tagen eine sehr deutliche, hyaline, rotbraune Verfärbung.

In Gegenwart von 50 mg/l OPP (und weniger) wuchsen alle getesteten Stämme. *H. annosum* L 1 und H entwickelten sich auch noch bei 60 mg/l OPP gut (vgl. Abb. 1), die übrigen Isolate starteten bei dieser Konzentration jedoch nur in Einzelfällen. Bei 70 mg/l OPP konnte innerhalb von 4 Wochen in keinem Fall mehr ein Myzelwachstum beobachtet werden.

Sämtliche Stämme entwickelten in Gegenwart von OPP ebenso wie auf MA charakteristische Konidiophoren in großer Zahl. Auch makroskopisch waren in der Regel keine deutlichen Änderungen der Kulturmorphologie erkennbar; eine Ausnahme bildete lediglich der Stamm K, welcher im Gegensatz zur Kultur auf MA in der Nähe des Impfstückes zahlreiche konfluierende Flecke sehr dichten, mehligten Luftmyzels aufwies.

*H. annosum* L 1 erwies sich als tolerant gegenüber hohen Konzentrationen Streptomycin und Sulfanilamid. Die Wirkung dieser Substanzen äußerte sich ähnlich wie bei OPP vorwiegend in einer Verlängerung der Startphase. Bei Nystatin und Clotrimazol war zugleich die Wachstumsrate stark reduziert (Abb. 1). Sämtliche Isolate von *H. annosum* waren gegenüber Clotrimazol relativ stark empfindlich und wurden bereits durch 100 mg/l abgetötet. Die Sporulation wurde von keinem der getesteten Antibiotika beeinträchtigt.

Die Sporenkeimung von *H. annosum* wurde durch verschiedene Selektivsubstanzen unterschiedlich stark verzögert, Basidiosporen und Konidien reagierten dabei sehr ähnlich. (Abb. 2 und 3). Die maximale OPP-Konzentration, welche ohne starke Beeinträchtigung der Keimrate toleriert wurde, lag bei 50 mg/l. Die Basidiosporen keimten bereits bei 60 mg/l nicht mehr, die Konidien nur noch zu einem geringen Prozentsatz. Streptomycinsulfat hemmte den Keimvorgang deutlich weniger als Sulfanilamid.

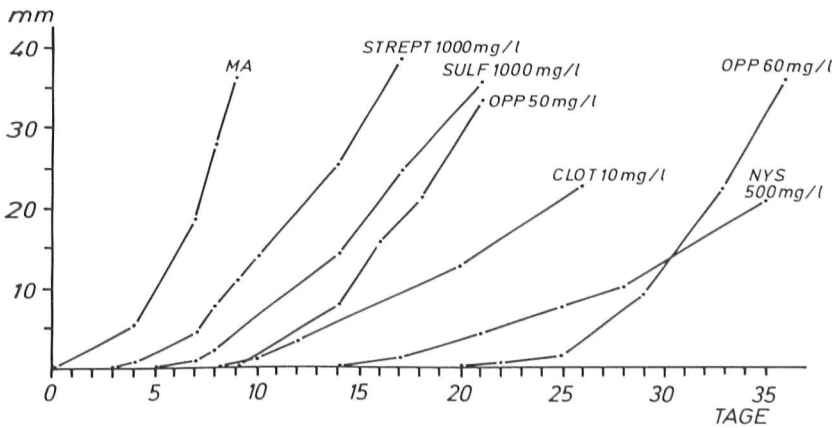


Abb. 1. Myzelwachstum von *Heterobasidion annosum* L 1 auf Malzextraktagar (MA) sowie auf MA mit Zusätzen von Streptomycinsulfat (STREPT), Sulfanilamid (SULF), Nystatin (NYS), Clotrimazol (CLOT) und Orthophenylphenol (OPP). Durchschnittswerte von jeweils zwei Wiederholungen. Die Kulturen wurden bei Zimmertemperatur (ca. 18°C) gehalten

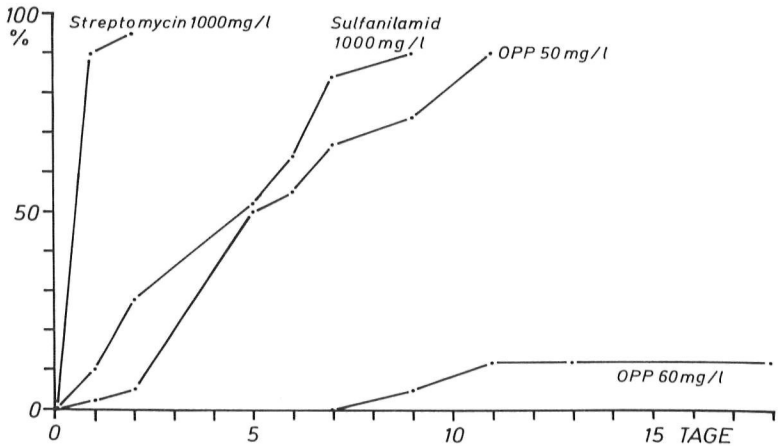


Abb. 2. Konidienkeimung bei *H. annosum* L1 in Gegenwart von verschiedenen Selektivsubstanzen (Zusätze zu MA) bei 21°C (Durchschnittswerte aus jeweils zwei Wiederholungen)

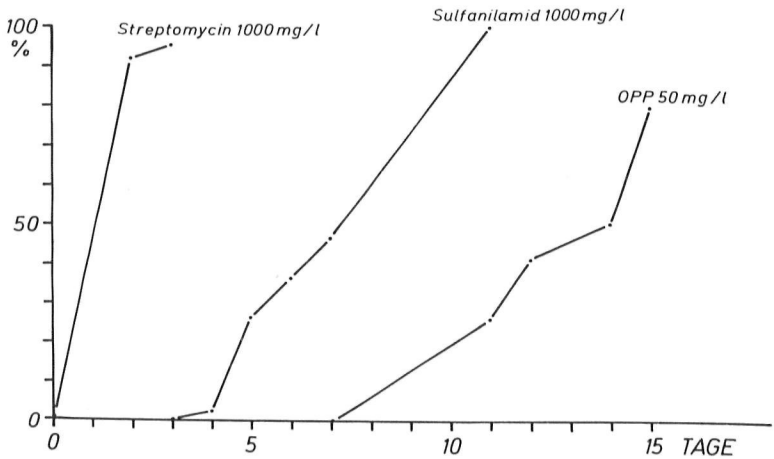


Abb. 3. Keimung von Basidiosporen von *H. annosum* in Gegenwart von verschiedenen Selektivsubstanzen (Zusätze zu MA) bei 21°C (Durchschnittswerte aus jeweils zwei Wiederholungen)

### 3.1.2 Andere Mikroorganismen

OPP erwies sich in einer Konzentration von 50 mg/l (in MA) als ausreichend wirksam gegen *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. polysporum*, *Mucor* sp. und *Penicillium* sp. Sowohl die Sporenkeimung als auch das Myzelwachstum dieser Pilzarten wurde vollständig gehemmt. Unterhalb von 50 mg/l war dies nicht mehr der Fall: Bereits bei 40 mg/l konnten *T. harzianum* und *T. viride* keimen, stellten aber das Wachstum ein, nachdem die Keimschläuche innerhalb von 2 Wochen eine Länge von 30–80 µm erreicht hatten. *T. harzianum* wuchs aus dem Impfstück aus und bildete in diesem Zeitraum Kolonien mit einem Radius von ca. 20 mm. Die Sporen von *T. polysporum* keimten und bildeten ein sehr dichtes Myzel, dessen Radius jedoch nach 14 Tagen nur ca. 5 mm betrug. Das Wachstum von *Penicillium* sp. war ebenfalls stark eingeschränkt; der Pilz bildete ein extrem dichtes, weißes, makroskopisch hefeartig erscheinendes Myzel. *Mucor* sp. entwickelte sich in Gegenwart von 40 mg/l OPP sowohl aus Sporen als auch aus Myzel relativ stark (Kolonieradius nach 2

Wochen 12–23 mm). Im Gegensatz zu den übrigen Pilzarten sporulierte *Mucor* sp. auf diesem Medium. Auf Malzextraktagar mit einem Zusatz von 30 mg/l OPP wuchsen *Mucor* sp. und *T. harzianum* deutlich besser; *T. harzianum* sporulierte unter diesen Bedingungen bereits nach 10 Tagen, während bei *T. polysporum* kein Unterschied zum Verhalten auf MA mit 40 mg/l OPP erkennbar war. *T. viride* konnte bei 30 mg/l OPP in 2 Wochen lediglich nicht sporulierende Kolonien mit einem Radius von ca. 5 mm bilden. Hefen und Bakterien wurden von OPP auch bei einer Konzentration von 70 mg/l nicht merklich gehemmt.

OPP wirkte nur teilweise fungizid: So konnten noch 5–20% der Sporen von *Trichoderma harzianum*, *T. polysporum* und *T. viride*, welche 4 Wochen bei 21°C auf einem Medium mit 50 mg/l OPP aufbewahrt worden waren, nach Überimpfen auf reinen Malzextraktagar keimen. Bei *Penicillium* sp. und *Mucor* sp. war unter den gleichen Bedingungen keine Keimung mehr zu beobachten. Nach Einwirkung von 70 mg/l OPP für 4 Wochen waren auch die Konidien der *Trichoderma*-Arten nicht mehr keimfähig.

Die getesteten Antibiotica hatten in Konzentrationen, welche ein Wachstum von *H. annosum* zuließen, keine deutliche Wirkung auf *Trichoderma* spp., *Mucor* sp. und *Penicillium* sp.; Hefen wurden auch durch 500 mg/l Nystatin oder 100 mg/l Clotrimazol nicht vollständig gehemmt, gegen Bakterien war nur Streptomycin in einer Konzentration von 1000 mg/l effektiv.

### 3.2 Komplexe Selektivmedien

Da keine der untersuchten Substanzen gegen sämtliche als Kontaminationen auftretenden Mikroorganismengruppen gleichermaßen wirksam war (vgl. Kap. 3.1), wurden verschiedene Kombinationen z. T. unter Variation von pH-Wert und Nährstoffkonzentration getestet.

#### 3.2.1 Reduktion des pH-Wertes

*H. annosum* wuchs auf Malzextraktagar auch bei reduziertem pH, Wachstumsgeschwindigkeit und Keimrate waren jedoch bei den einzelnen Isolaten unterschiedlich stark verändert (Tab. 1).

Der pH-Wert von normalem Malzextraktagar (ohne Säurezusatz) lag bei 4,5. Das Bakterienwachstum wurde nur bei pH 3,5 vollständig gehemmt, Hefen entwickelten sich bei allen Aziditätsstufen sehr stark.

Eine Kombination von niedrigem pH-Wert und OPP-Zusatz erwies sich als unbrauchbar. Im einzelnen wurden bei einer gleichbleibenden Konzentration von 50 mg/l OPP die pH-Werte 3,5, 3,8 und 4,0 eingestellt und diese Substrate mit *H. annosum* und anderen Pilzarten inokuliert (n = 3). Weder die *H. annosum*-Isolate noch *Trichoderma* spp., *Mucor* sp. oder *Penicillium* sp. konnten auf diesen Medien innerhalb von 4 Wochen starten und auch eine Sporenkeimung war in keinem Fall möglich. Bakterien wurden erst bei pH-Werten unter 4,0 gehemmt, das Wachstum von Hefen wurde durch das Ansäuern nicht merklich beeinflusst. Bei OPP-Konzentrationen unter 50 mg/l (bei pH 3,8) war keine ausreichende Wirkung mehr gegen *Trichoderma* spp., *Mucor* sp. und *Penicillium* sp. vorhanden.

Tabelle 1

Durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit (mm/Tag, n = 4) und Keimrate (%) nach 48 h (n = 2) von vier *H. annosum*-Isolaten auf Malzextraktagar mit unterschiedlichem pH-Wert bei 21°C

pH	Heterobasidion annosum-Isolat							
	L 1		Z		H		K	
	mm/Tag	%	mm/Tag	%	mm/Tag	%	mm/Tag	%
4,5	7,9	70	7,6	72	6,2	66	7,8	68
4,0	5,6	84	5,4	78	7,4	72	3,2	76
3,5	5,3	46	5,1	62	6,2	60	2,9	58

## 3.2.2 Malzextraktagar mit OPP und verschiedenen Antibiotica

Diese Versuchsreihe sollte klären, wie sich eine Kombination der in Kap. 3.1 beschriebenen Stoffe auf *H. annosum* und auf die Selektivität des Mediums auswirkt. Die Konzentration von 50 mg/l OPP wurde beibehalten, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Streptomycin bzw. Sulfanilamid bereits bei einer Reduktion des OPP-Zusatzes auf 40 mg/l eine vollständige Hemmung von *Trichoderma* spp. nicht mehr gegeben war.

Die Ergebnisse des Experimentes sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefaßt. Alle *H. annosum*-Isolate entwickelten sich auf den getesteten Substraten (nach Inokulation mit Impfstücken) gut und waren eindeutig identifizierbar (vgl. Kap. 3.1). Die Verlängerung der Startphase auf Selektivmedien im Vergleich zu Kulturen auf reinem Malzextraktagar war stammsspezifisch und wurde primär durch OPP verursacht, unterschiedliche Konzentrationen Sulfanilamid bzw. Streptomycin hatten hierauf praktisch keinen Einfluß. Die Wachstumsrate wurde – außer bei sehr hohen Antibiotikakonzentrationen – nur in relativ geringem Ausmaß reduziert. Die einzelnen Isolate reagierten auch hier individuell (Tab. 2).

Tabelle 2

Verhalten von vier *H. annosum*-Isolaten auf Selektivmedien mit unterschiedlicher Zusammensetzung (Inokulation mit Impfstücken, Mittelwerte aus jeweils 4 Wiederholungen) und Bakterienwachstum (+++ = stark, ++ = mittel, + = schwach, – = kein Wachstum) bei 21°C

Kulturmedium: Malzextraktagar mit			<i>Heterobasidion annosum</i> -Isolat								Bakterien
			L 1		Z		H		K		
Ortho-phenyl-phenol mg/l	Strepto-mycin mg/l	Sulfanil-amid mg/l	Start-phase (Tage)	Wachs-tums-rate mm/Tag	Start-phase (Tage)	Wachs-tums-rate mm/Tag	Start-phase (Tage)	Wachs-tums-rate mm/Tag	Start-phase (Tage)	Wachs-tums-rate mm/Tag	
50	50	50	5	4,7	5	4,3	5	3,1	8	1,6	++ (+)
50	100	100	5	4,3	5	4,2	5	3,1	9	1,7	++
50	250	250	5	4,0	5	3,6	5	2,6	9	1,7	++
50	500	500	5	3,2	5	2,6	5	1,6	9	1,9	+
50	500	–	5	3,0	5	3,2	5	2,6	9	1,5	++
50	–	500	5	3,5	5	3,1	5	2,5	9	1,4	++ (+)
50	1000	–	5	1,6	5	1,5	5	1,7	9	2,1	–
50	–	1000	5	3,0	5	2,3	5	2,0	9	0,7	++
–	–	–	2	7,9	2	7,6	2	6,2	2	7,8	+++

Die Sporenkeimung von *H. annosum* war auf allen Substraten mehr oder weniger deutlich gehemmt. Dies kommt sowohl in einer Verzögerung des Keimvorganges als auch in einer Reduktion der Keimrate zum Ausdruck. Sulfanilamid erwies sich dabei im Vergleich zu Streptomycin als toxischer (Tab. 3). Auf reinem Malzextraktagar betrug die Keimrate bei allen Isolaten bereits nach 48 h etwa 60–80%.

*H. annosum* entwickelte auf den meisten Selektivmedien nach Konidieninokulation innerhalb von 4–6 Wochen ca. 2–5 mm große Kolonien, unter welchen sich das Substrat rotbraun verfärbte. Nur bei einer Streptomycinkonzentration von 1000 mg/l kam es zum Wachstumsstillstand, nachdem die Keimschläuche eine Länge von 20–50 µm erreicht hatten.

Das Bakterienwachstum wurde nur durch einen Zusatz von 1000 mg/l Streptomycin vollständig gehemmt (vgl. Tab. 2). Während *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. polysporum*, *Mucor* sp. und *Penicillium* sp. in allen Fällen zuverlässig unterdrückt wurden, wuchsen Hefen auf sämtlichen Medien ohne erkennbare Beeinflussung. Aus diesem Grund wurde versucht, diese Organismen durch einen Zusatz von 100 mg/l Nystatin zu einem Komplexmedium aus OPP (50 mg/l), Streptomycin (100 mg/l) und Sulfanilamid (100 mg/l)

Tabelle 3

Keimverhalten von vier *H. annosum*-Isolaten auf verschiedenen Selektivmedien

B = Beginn der Keimung nach Tagen, % = Keimrate nach 20 Tagen bei 21°C

Medium: Malzextraktagar + 50 mg/l OPP sowie		<i>H. annosum</i> -Isolat							
Streptomycin mg/l	Sulfanilamid mg/l	L I		Z		H		K	
		B	%	B	%	B	%	B	%
100	100	10	10	11	8	11	10	11	21
250	250	12	4	12	5	15	5	14	9
500	500	12	5	17	3	11	6	17	7
500	—	5	48	5	32	5	24	5	28
—	500	7	14	12	5	12	11	17	8
1000	—	6	32	8	12	7	4	10	6
—	1000	6	12	7	2	10	7	—	0

zu eliminieren. Auf diesem Substrat war jedoch kein Myzelwachstum von *H. annosum* mehr möglich, während sich Hefen immer noch in beschränktem Umfang entwickeln konnten. Ein Zusatz von 10 mg/l Clotrimazol anstelle von Nystatin erwies sich ebenfalls als nicht ausreichend wirksam.

Komplexmedien aus OPP, Streptomycin und Sulfanilamid waren auch zur Reisolierung von *H. annosum* aus infizierten Feinwurzeln brauchbar, sofern diese nicht mit Hefen kontaminiert waren (vgl. Tab. 5). Nach ca. 3–4 Wochen wurden die aus kontaminierten Proben erhaltenen *H. annosum*-Kulturen regelmäßig von *Trichoderma harzianum* überwachsen, was jedoch den Nachweis von *H. annosum* nicht beeinträchtigte, da dieser Pilz das Substrat stets als erster besiedelte und zudem das Medium um das Inokulum charakteristisch verfärbte. Von solchen Kulturen entnommene Impfstücke mit *T. harzianum* konnten auf frischem Selektivmedium nicht weiterwachsen.

OPP-haltige Substrate waren gut haltbar: Nach einmonatiger Lagerung bei 21°C sowie nach zweimonatiger Lagerung bei 2°C war keine Veränderung der Selektivwirkung feststellbar. Auch die Stammlösungen waren bei 2°C mindestens 8 Wochen haltbar.

Außer *H. annosum* konnten auch andere Basidiomyceten auf einem OPP-haltigen Substrat kultiviert werden, die Tab. 4 gibt eine Übersicht über die getesteten Arten.

Tabelle 4

Wachstum verschiedener Basidiomyceten auf einem Selektivmedium (MA mit 50 mg/l OPP,

100 mg/l Streptomycin und 100 mg/l Sulfanilamid) innerhalb von 4 Wochen bei 21°C

Inokula: M = Myzel aus Reinkultur, F = Fruchtkörperexplantat, S = infiziertes Substrat

Wachstum	Kein Wachstum (-) bzw. Wachstum nur in Einzelfällen (+)
<i>Amylostereum areolatum</i> (Chaill. in Fr.) Boid. F	<i>Agaricus bisporus</i> (Lge.) Imbach F-
<i>Armillaria mellea</i> s. l. S	<i>Coniophora puteana</i> (Schum. ex Fr.) Karst. M-
<i>Bjerkandera adusta</i> (Willd. ex Fr.) Karst. F	<i>Dacrymyces stillatus</i> Nees ex Fr. F, M, S-
<i>Chondrostereum purpureum</i> (Pers. ex Fr.) Pouz. F	<i>Exidia glandulosa</i> (Bull. ex St. Amans) Fr. F-
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sow. ex Fr.) Karst. F	<i>Flammulina velutipes</i> (Curt. ex Fr.) Sing. F+
<i>Hypholoma fasciculare</i> (Huds. ex Fr.) Kumm. F	<i>Gloeophyllum sepiarium</i> (Wulf. ex Fr.) Karst. F+
<i>Hypholoma capnoides</i> (Fr. ex Fr.) Kumm. M	<i>Gloeophyllum odoratum</i> (Wulf. ex Fr.) Imaz. F-
<i>Phlebia radiata</i> Fr. F	<i>Gloeophyllum abietinum</i> (Bull. ex Fr.) Karst. F+, M-
<i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jül. M	<i>Hirneola auricula-judae</i> (Bull. ex St. Amans) Berk. F-
<i>Radulomyces confluens</i> (Fr.) M. P. Christ. F	<i>Phellinus</i> sp. F-
<i>Stereum birsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray F	<i>Resinicium bicolor</i> (Alb. et Schw. ex Fr.) Parm. M+
<i>Stereum sanguinolentum</i> (A. & S. ex Fr.) Boid F, S	
<i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pil. F, M	
<i>Trichaptum abietinum</i> (Dicks. ex Fr.) Ryv. F	



Tabelle 5

Nachweis von *H. annosum* L 1 in künstlich infizierten und kontaminierten Wurzelabschnitten  
(Länge ca. 2 mm) auf verschiedenen Selektivmedien bei 21°C

Kontamination A = Bodensuspension mit *Trichoderma*, *Mucor*, *Penicillium* und Bakterien; Kontamination B = A + Hefen (vgl. 2.2.2) MA = Malzextraktagar, WA = Wasseragar, TA = Teeagar, OPP = Orthophenylphenol, Strept. = Streptomycinsulfat, Sulf. = Sulfanilamid

Medium	Kontamination	Wurzel Durchmesser (a = 0,3–0,8 mm b = 0,8–1,5 mm)	n	<i>H. annosum</i> positiv		Inkubations- dauer (Tage)
				n	%	
MA	–	a	29	29	100	3
		b	22	22	100	
WA	A	a	15	15	100	5
		b	26	26	100	
	B	a	28	28	100	
		b	12	12	100	
MA + 50 mg/l OPP + 250 mg/l Strept. + 250 mg/l Sulf.	A	a	12	12	100	10
		b	13	13	100	
	B	a	19	1	5	
		b	16	5	31	
MA + 50 mg/l OPP + 100 mg/l Strept. + 100 mg/l Sulf.	B	a	19	2	10	10
		b	12	11	91	
MA + 50 mg/l OPP + 1000 mg/l Sulf.	A	a	14	14	100	14
		b	8	8	100	
	B	a	10	0	0	
		b	12	3	25	
WA + 50 mg/l OPP + 100 mg/l Strept.	A	a	38	38	100	20
		b	27	27	100	
	B	a	14	14	100	
		b	9	9	100	
TA + 50 mg/l OPP + 100 mg/l Strept.	A	a	35	34	97	10
		b	26	26	100	
	B	a	15	15	100	
		b	12	12	100	

Die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Pilze war meist stark reduziert, typische Myzelmerkmale (Oidien, Schnallen, Rhizomorphen) waren jedoch auch bei Kultur auf dem Selektivmedium vorhanden.

### 3.2.3 Selektivmedien mit reduziertem Nährstoffangebot

Teeagar ohne OPP-Zusatz besaß keine ausreichende Selektivität für *H. annosum*. Das Wachstum war nur bei *Trichoderma polysporum* und bei Bakterien verringert, die übrigen Kontaminationen entwickelten sich ungehindert. *Trichoderma viride* sporulierte auf Teeagar sogar deutlich besser als auf Malzextraktagar.

Ein Zusatz von 50 mg/l OPP war auch bei Teeagar gegen die *Trichoderma*-Arten, *Mucor* sp. und *Penicillium* sp. wirksam. Bakterien konnten durch 100 mg/l Streptomycin vollständig gehemmt werden. Die Entwicklung von Hefen war auf diesem Medium dagegen nur wenig eingeschränkt. Die *H. annosum*-Isolate wuchsen mit einer Geschwindigkeit von 1,0–3,7 mm/Tag (Dauer der Startphase 5–9 Tage) und bildeten morphologisch normale Konidiphoren. Auch die Reisolierung aus kontaminierten Wurzelabschnitten war möglich

(Tab. 5), allerdings wurden die Proben nach zwei Wochen von *Trichoderma harzianum* überwachsen (vgl. 3.2.2).

Auf Wasseragar mit OPP (50 mg/l) und Streptomycin (100 mg/l) wurden sämtliche Kontaminationen gehemmt, während alle Isolate von *H. annosum* innerhalb von 14 Tagen auf dem Impfstück Konidiophoren bildeten und das Substrat rotbraun verfärbten. Auch aus kontaminierten Wurzelabschnitten konnte der Pilz in allen Fällen reisoliert werden (Tab. 5), allerdings war bei sehr kleinen Proben ( $\varnothing < 0,8$  mm) keine Verfärbung des Mediums feststellbar. *Trichoderma harzianum* konnte auf diesem Substrat *H. annosum* nach 4–6 Wochen vereinzelt überwachsen. *H. annosum* konnte auch auf Wasseragar ohne Selektivzusätze in kontaminierten Proben nachgewiesen werden (Tab. 5), wurde jedoch hier bereits innerhalb von 2–3 Wochen häufig von anderen Pilzen verdrängt.

#### 4 Diskussion

Für *H. annosum* (und andere holzbewohnende Basidiomyceten) wurden wiederholt Selektivmedien vorgeschlagen (RUSSELL 1956; HENDRIX und KUHLMAN 1962; HENDRIX 1966; HUNT und COBB 1971; BISHT und HARSH 1981). Diese Medien sind durch häufig sehr unterschiedliche Zusammensetzung gekennzeichnet und enthalten zum Teil schwer erhältliche bzw. toxische Wirkstoffe. Die Medien von KUHLMAN und HENDRIX (1962) sowie KUHLMAN (1966) haben sich offensichtlich nicht bewährt (STIEPMANN 1974), die von BISHT und HARSH (1981) beschriebene Selektivwirkung von Teeagar konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Auch das von RUSSELL (1956) empfohlene Medium mit 60 mg/l OPP war zum Nachweis von *H. annosum* nur bedingt geeignet, da ein Teil der Isolate unter diesen Bedingungen nicht wuchs; die von demselben Autor vorgeschlagene Reduktion des pH-Wertes zur Kontrolle von Bakterien erwies sich als unbrauchbar, da die Empfindlichkeit von *H. annosum* gegenüber OPP bei niedrigem pH stark zunahm.

OPP war jedoch in einer Konzentration von 50 mg/l optimal wirksam gegen verschiedene *Trichoderma*-Arten, *Mucor* sp. und *Penicillium* sp.; *H. annosum* und einige andere Basidiomyceten waren gegenüber dieser Substanz tolerant. Diese Wirkung wurde weder durch die Art des Basismediums (Malzextraktagar, Teeagar oder Wasseragar), noch durch die Zugabe von Streptomycin bzw. Sulfanilamid negativ beeinflusst. Die einzelnen Isolate von *H. annosum* waren gegenüber OPP unterschiedlich empfindlich, was bei der außerordentlichen physiologischen Variabilität dieser Pilzart (vgl. VOLGER et al. 1980) nicht überrascht. Aus diesem Grunde erscheint es sinnvoll, z. B. für Infektionsexperimente möglichst OPP-tolerante Stämme zu verwenden, die auf einem Selektivmedium gut reisolierbar sind.

Die Konidienkeimung wurde durch Zugabe von Antibiotika zu einem OPP-haltigen Basismedium in Abhängigkeit von der Konzentration dieser Substanzen deutlich gehemmt. (Tab. 3); auf Medien mit jeweils nur einer Wirksubstanz war dies nicht der Fall (Abb. 2). Für eine Isolierung von *H. annosum* aus Sporen im Boden sind solche Medien somit nur bedingt geeignet.

Gegen *Trichoderma* wirkte OPP fungistatisch, nach Abbau des Wirkstoffes durch Basidiomyceten konnte sich *T. harzianum* ungehindert ausbreiten. Die Brauchbarkeit des Mediums wurde jedoch hierdurch nicht beeinträchtigt. Eine Gewöhnung von *T. harzianum* an OPP konnte nicht nachgewiesen werden, es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß resistente Biotypen existieren (vgl. RUSSELL 1956). Falls unerwünschte Pilze auftreten sollten, die mit 50 mg/l OPP nicht kontrollierbar sind, könnte ein Zusatz von weiteren Wirkstoffen (vgl. PAPAIVIZAS und LUMSDEN 1982) sinnvoll sein.

Gegen Bakterien war von den getesteten Antibiotika Streptomycin am effektivsten, besonders in Kombination mit Teeagar oder Wasseragar; Hefen konnten nur durch Reduktion des Nährstoffangebotes am Wachsen gehindert werden.

Medien mit 50 mg/l OPP sind außer für *H. annosum* auch für andere Basidiomyceten geeignet (vgl. Tab. 4) und könnten von besonderer Bedeutung für den Nachweis von *Armillaria mellea* s. l. und verschiedenen „*Stereum*“-Arten sein.

Obwohl auch mit Wasseragar sehr gute Ergebnisse erzielt wurden (vgl. Tab. 5), ist ein Zusatz von OPP und Streptomycin zu diesem Substrat zu empfehlen, denn unter natürlichen Bedingungen kann neben einer oberflächlichen Kontamination (wie sie experimentell simuliert wurde) auch eine Besiedelung tieferer Substratbereiche durch andere Mikroorganismen vorhanden sein, so daß es während der Inkubation bereits im Inneren der Probe zu einer Verdrängung von *H. annosum* kommt. Außerdem erleichtert die auffällige Verfärbung des OPP-haltigen Mediums durch *H. annosum* den Nachweis dieses Pilzes beträchtlich. Da sich das Myzel auf dem nährstoffarmen Medium (Wasseragar) nur langsam ausbreitet, während auf der Probe bereits dichte Konidiophorenrasen vorhanden sind, ist ein Mindestabstand der einzelnen Proben von ca. 1 cm ausreichend. Eine Petrischale bietet somit für ca. 40 Proben ausreichend Platz, wobei von Vorteil ist, daß die Beimpfung unsteril durchgeführt werden kann.

### Danksagung

Die Untersuchung wurde durch ein vom Bayerischen Staatsministerium für Unterricht und Kultus gewährtes Stipendium für SHEN ZHANG im Rahmen des wissenschaftlichen Austausches mit der VR China gefördert, wofür wir unseren Dank aussprechen möchten. Herr Prof. Dr. P. H. TSAO (University of California) hat durch anregende Hinweise weitergeholfen, Herrn Prof. Dr. P. SCHÜTT (Universität München) danken wir für fachliche Diskussionen und die Durchsicht des Manuskriptes.

### Zusammenfassung

Auf Selektivmedien mit Orthophenylphenol (OPP) und verschiedenen Antibiotika (Streptomycin, Sulfanilamid, Nystatin, Clotrimazol) wurden Mycelwachstum und Keimverhalten von vier *Heterobasidion annosum*-Isolaten und anderen Mikroorganismen (*Trichoderma* spp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., Bakterien, Hefen und verschiedene Basidiomyceten) untersucht. Die Selektivität der Medien wurde durch Reisolierung von *H. annosum* aus künstlich infizierten und kontaminierten Feinwurzelabschnitten von *Picea abies* überprüft. Die optimale OPP-Konzentration für *H. annosum* lag bei 50 mg/l; eine Reduktion des pH-Wertes zur Kontrolle von Bakterien erwies sich auf OPP-haltigem Medium als ungeeignet. Von den getesteten Antibiotika war Streptomycin am effektivsten. Dies war besonders bei gleichzeitiger Reduktion des Nährstoffangebotes der Fall. Zum Nachweis von *H. annosum* in Feinwurzeln wird eine Kombination von 50 mg/l OPP und 100 mg/l Streptomycinsulfat in Wasseragar empfohlen.

### Summary

#### *Selective media for the assay of Heterobasidion annosum (Fr.) Bref. in fine roots*

On selective media with Orthophenylphenol (OPP) and different antibiotics (Streptomycin, Sulfanilamid, Nystatin, Clotrimazol) mycelial growth and germination of four *Heterobasidion annosum* strains and other microorganisms (*Trichoderma* spp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., Bacteria, yeasts and some basidiomycetes) were recorded. The selectivity of the media was tested by reisolation of *H. annosum* from artificially infected and contaminated fine roots of *Picea abies*. A concentration of 50 mg OPP/l was optimal for *H. annosum*. Reduction of pH for control of bacteria was not useful on media with OPP. Among the antibiotics, Streptomycin was most effective, especially in media with reduced nutrients. For the assay of *H. annosum* in fine roots a medium with 50 mg/l OPP and 100 mg/l Streptomycinsulphate in water agar is recommended.

### Résumé

#### *Milieux sélectifs pour isolement d'Heterobasidion annosum (Fr.) Bref. dans les racines fines*

Sur des milieux sélectifs comportant l'orthophénylphénol et divers antibiotiques (streptomycine, sulfanilamide, nystatine, clotrimazol), la croissance mycélienne et la germination de quatre souches d'*Heterobasidion annosum* et d'autres micro-organismes (*Trichoderma* spp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., des bactéries, des levures et quelques basidiomycètes) ont été obtenues. La sélectivité des milieux a été

testée par réisolement d'*H. annosum* à partir de racines fines de *Picea abies* infectées artificiellement et contaminées. Une concentration de 50 mg/l était optimale pour *H. annosum*; la diminution du pH en vue de lutter contre les bactéries n'était pas utile avec les milieux à l'orthophénylphénol. Parmi les antibiotiques, la streptomycine était la plus efficace, en particulier sur les milieux avec des matières nutritives réduites. Pour les tests avec *H. annosum* sur racines fines, un milieu contenant 50 mg/l d'O. P. P. et 100 mg/l de sulfate de streptomycine et de l'eau gélosée est recommandé.

### Literatur

- BANERJEE, A. K.; LEVY, J. F., 1970: Techniques for the isolation of fungi from wood. *Int. Biotet. Bull.* **6**, 37–41.
- BISHT, N. S.; HARSH, N. S. K., 1981: Use of waste tea leaves as an aid to culture of some wood-rotting fungi. *Int. Biotet. Bull.* **17**, 19–20.
- BREFELD, O., 1889: Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie. VIII. Basidiomyceten III. Leipzig, S. 149–184.
- HALE, M. D. C.; SAVORY, J. G., 1976: Selective agar media for the isolation of basidiomycetes from wood – a review. *Int. Biotet. Bull.* **12**, 112–115.
- HOLDENRIEDER, O., 1982: Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung von *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (*Fomes annosus* P. Karst) mit antagonistischen Pilzen. Diss. Univ. München.
- HUNT, R. S.; COBB, F. W., 1971: Selective medium for the isolation of wood-rotting basidiomycetes. *Can. J. Bot.* **49**, 2064–2065.
- JOHANSSON, M.; UNESTAM, T., 1982: The search for resistance to *Heterobasidion annosum* root rot in Norway spruce – old and new approaches in studies of infection biology. *Eur. J. For. Path.* **12**, 346–357.
- KUHLMAN, E. G., 1966: Recovery of *Fomes annosus* spores from soil. *Phytopathology* **56**, 885.
- KUHLMAN, E. G.; HENDRIX, F. F., 1962: A selective medium for the isolation of *Fomes annosus*. *Phytopathology* **52**, 1310–1312.
- PAPAZYZAS, G. C.; LUMSDEN, R. D., 1982: Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Plant Disease* **66**, 1019–1020.
- RISHBETH, J., 1951: Observations on the biology of *Fomes annosus*, with particular reference to East Anglian pine plantations. II. Spore production, stump infection, and saprophytic activity in stumps. *Ann. Bot.*, N. S. **15**, 1–22.
- RUSSELL, P., 1956: A selective medium for the isolation of basidiomycetes. *Nature* **177**, 1038–1039.
- SCHÜTT, P., 1979: Ungelöste Probleme der Forstpathologie – 100 Jahre nach Robert Hartig. *Forstwiss. Cbl.* **98**, 74–79.
- SIEPMANN, R., 1974: Zum Vorkommen von *Fomes annosus* (Fr.) Karst. im Boden von Fichtenbeständen (*Picea abies* Karst.) *Eur. J. For. Path.* **4**, 74–88.
- TSAO, P. H., 1970: Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopath.* **8**, 157–186.
- VOLGER, C.; BLOCK, J.; BÖCKMANN, C., 1980: Die physiologische und genetische Variabilität von *Fomes annosus* (Fr.) Cooke – ein Problem bei der biologischen Bekämpfung des Pilzes in Fichten-Erstaufforstungen? *Proc. 5th Int. Conf. on Problems of Butt and Root Rot in Conifers*, Kassel, 1978. (IUFRO). Hann. Münden, S. 169–181.

*Anschriften der Verfasser:* Dr. SHEN ZHANG, Department of Geography, East China Normal University, Shanghai, China  
Dr. O. HOLDENRIEDER, Lehrstuhl für Forstbotanik der Universität München, Amalienstraße 52, D-8000 München 40

*Eingang des Ms.* 8. 6. 1983

This document is a scanned copy of a printed document. No warranty is given about the accuracy of the copy. Users should refer to the original published version of the material.