



## Präventiver Pflanzenschutz zur biologischen Bekämpfung der Erreger dreier bedeutender Pilzkrankheiten im ökologischen Weinbau

### Herausgeberin:

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)  
53168 Bonn

Tel.: +49 228 6845-280 (Zentrale)

Fax: +49 228 6845-787

E-Mail: [geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de](mailto:geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de)

Internet: [www.bundesprogramm-oekolandbau.de](http://www.bundesprogramm-oekolandbau.de)

Finanziert vom Bundesministerium  
für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz  
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

### Auftragnehmer:

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft  
Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische  
Sicherheit

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



Dieses Dokument ist in der Wissenschaftsplattform des Zentralen   
Internetportals "Ökologischer Landbau" archiviert und kann unter   
<http://www.orgprints.org/9150/> heruntergeladen werden.

## **Abschlußbericht**

**Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft  
Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit  
- Fachgruppe Mikrobiologie -  
Königin-Luise-Str. 19  
14195 Berlin**

**Forschungsprojektnummer: 02OE260**

**Projekttitle:  
Präventiver Pflanzenschutz zur biologischen Bekämpfung der  
Erreger dreier bedeutender Pilzkrankheiten im ökologischen  
Weinbau**

**Laufzeit: 01.06.2002 - 31.12.2003**

**Berichtszeitraum: Juni 2002 - Dezember 2003**

**Projektleitung: Dr. H. I. Nirenberg**

**Projektbearbeitung: T. Gräfenhan**

# Abschlußbericht

## 1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

### 1.1. Planung und Ablauf des Projektes

Das bearbeitete Forschungsvorhaben verfolgte neue, präventive Strategien für die biologische Kontrolle dreier bedeutsamer Pilzkrankheiten, deren direkte Bekämpfung im ökologischen Weinbau bisher nicht möglich ist. Die Eutypa-, Esca- und Petri-Krankheit sind durch eine komplexe Epidemiologie und starke Ausbreitungstendenzen in Deutschland gekennzeichnet. Schwerpunkte des Projektes waren neue Ansätze eines vorbeugenden Schutzes. Antagonistische Mikroorganismen mit einer dem Pathogen ähnlichen Biologie können hierfür einen effektiven und anhaltenden Schutz bieten. Hyphomyceten der Gattung *Trichoderma* sollen sich systemisch im Holz der Weinrebe etablieren und dort ihre starke antagonistische Wirkung entfalten. Die Erreger werden somit schon zu Infektionsbeginn an einer Besiedlung des Holzgewebes und der Ausbreitung in den Leitungsbahnen gehindert. Aus einer Vielzahl von *Trichoderma*-Isolaten sollte zunächst im Labor eine geeignete Anzahl von Stämmen mit hoher antagonistischer Wirkung selektiert werden. Mittels Infektionsversuchen sollten sie dann auf ihre Wirkung hinsichtlich des Pflanzen- und Pathogenwachstums, sowie ihrer Überlebens- und Verbreitungsfähigkeit im Rebholz getestet werden. Die vegetative Vermehrung der Weinrebe bietet gute Möglichkeiten, den präventiven Pflanzenschutz schnell und einfach in der Praxis einzusetzen. Gesunde Stecklinge oder Reiser können vor dem Veredeln in eine entsprechende Sporensuspension getaucht werden. In der Regel werden diese Arbeiten in Rebschulen ausgeführt und sind damit für den ökologisch-wirtschaftenden Weinbauern relativ kostenneutral.

Das Gesamtziel des abgeschlossenen Projektes beinhaltete die erfolgreiche Besiedlung des Rebholzes durch geeignete Antagonisten. Hyphomyceten der Gattung *Trichoderma* weisen ein hohes antagonistisches Potential gegen viele pilzliche Krankheitserreger auf. Um eine Vielzahl der *Trichoderma*-Arten und Isolate effizient und zielgerichtet zu testen, wurden die Stämme vorab auf Grundlage von physiologischen und biologischen Tests selektiert. Dies führte u. a. zu einer Aufwands- und Versuchszeitreduzierung bei den anschließenden Infektionsversuchen. Die Selektion geeigneter Arten erfolgte zunächst über Plattentests im Labor, bei denen das antagonistische Potential der Stämme auf die entsprechenden Erreger untersucht wurde. Eine stammspezifische Auswahl konnte dann mittels physiologischer Tests getroffen werden.

Die Wirkung der Antagonisten auf das Pflanzen- und Pathogenwachstum, sowie deren Überlebensfähigkeit im Rebholz können nur mittels Infektionsversuche unter standardisierten Bedingungen erforscht werden. Dabei waren zunächst Fragen hinsichtlich der Besiedlungswege und -geschwindigkeiten sowohl der Antagonisten als auch Pathogene zu klären. Deren Verteilung, Ausbreitung und Abwärtstransport nach der Inokulation wie auch die eigentliche Besiedlung des Holzgewebes und der Leitungsbahnen sollten in diesem Projekt untersucht werden. Wachstums- und Habitusvergleiche zwischen inokulierten Pflanzen und Kontrollen sollten evtl. phänologische Auswirkungen auf den Rebstock aufzeigen.

## 1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Nicht nur im ökologischen Weinbau sind die Eutypa-, die Esca- und die Petri-Krankheit besonders gefürchtet. Alle drei Rebkrankheiten werden durch einen oder mehrere Pilze verursacht, deren direkte Bekämpfung bisher nicht möglich ist. Die Eutypa-Krankheit oder Eutypiose wird durch den Ascomyceten *Eutypa lata* (*Ela*) verursacht. Er ist nicht rebenspezifisch und bewirkt auch bei zahlreichen Obstarten und anderen Gehölzen Absterbeerscheinungen. Im Weinbau zeigen vor allem ältere Ertragslagen die typischen Symptome nekrotisierter Blätter und krebsartiger Wunden, gefolgt vom Absterben einzelner Äste. Mit der Zeit stirbt der ganze Rebstock ab.

Die Esca-Krankheit kann ein chronisches und ein akutes Schadbild aufweisen. Letzteres ist als Apoplexie (= Schlagtreffen) bekannt, welches zum Absterben einzelner Äste oder des ganzen Rebstocks führt. Auch diese Krankheit tritt meist nur in älteren Anlagen auf. Esca wird durch einen pilzlichen Erregerkomplex verursacht, zudem heute in Europa zwei Ascomyceten, *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) und *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*), und der Basidiomycet *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) gezählt werden. Dabei spielt *Pch* als Primärbesiedler der gesunden Weinrebe eine entscheidende Rolle, damit *Fmed* und andere Weißfäule-Erreger das Rebholz sekundär befallen können. Besonders in den letzten Jahren häuften sich weltweit Meldungen über *Pch* verursachte Infektionen an jungen Reben. Die sogenannte Petri-Krankheit weist zunächst ein ähnliches Schadbild auf, wie es von der chronischen Form von Esca bekannt ist. Später kann es zum Absterben großer Teile der Ertragslagen kommen. Sowohl die Eutypiose als auch Esca müssen in Deutschland als weit verbreitet angesehen werden. Nachweise aus den Anbaugebieten Baden, Württemberg, Franken, Mosel, Nahe und Rheinhessen sind bereits erbracht, lediglich die östlichen Anbaugebiete Saale-Unstrut und Sächsisches Elbtal sind bisher unzureichend untersucht bzw. erfaßt worden.

Die Biologie der Primärerreger aller drei Rebkrankheiten ist fast identisch. Die Infektion erfolgt in der Regel durch Pilzsporen (Ascosporen und Konidien) über frische Wunden am mehrjährigen Holz, die im Zuge des jährlichen Rebschnittes im Winter, bei der Traubenernte, der Bodenbearbeitung oder durch Hagelschlag und Frosteinwirkung entstehen. Die Keimung der Ascosporen bzw. Konidien ist auch im Winter möglich und kann bereits nach wenigen Stunden erfolgen. Von der Wunde ausgehend, durchwuchern die pilzlichen Pathogene *Ela*, *Pch* und *Pal* mit ihrem Mycel die Leitungsbahnen bzw. das Holzgewebe. Im Falle einer Infektion mit *Ela* wird die Rebe durch die gebildeten Toxine (insbesondere Eutypin) geschädigt. Die Wirkmechanismen von *Pch* und *Pal* sind bis heute nicht bekannt, entsprechende Toxine wurden nicht nachgewiesen. *Pal* konnte bereits aus Böden einiger Ertragslagen isoliert werden, eine externe Infektionsquelle von *Pch* ist aber noch nicht gefunden. Die unterschiedliche Anfälligkeit der Rebsorten ist ein weiteres Phänomen dieser Pilzkrankheiten, so fällt auf, daß z. B. die Sorte Müller-Thurgau besonders empfänglich für Esca-Erreger zu sein scheint.

Im konventionellen Weinbau konnte bislang nur die Symptombildung dieser Reb-Krankheiten durch den Einsatz chemischer Substanzen kontrolliert werden. Zum einen hatten sich Benzimidazole als mehr oder weniger wirksame Verbindungen gegen die Eutypiose erwiesen. Zum anderen kamen zunächst Arsen-Präparate, später Kupferlösungen als Desinfektionsmaßnahme gegen die Esca-

Krankheit zum Einsatz. Eine direkte kurative Bekämpfung der pilzlichen Pathogene ist aber nicht möglich. Im letzten Jahrzehnt wurden u. a. erste Ansätze biologischer Kontrollstrategien mittels antagonistischer Mikroorganismen erfolgreich in die obst- und weinbauliche Praxis umgesetzt. Als vielversprechende Antagonisten im Einsatz gegen pilzliche Pathogene haben sich dabei Arten der Hyphomyceten-Gattung *Trichoderma* erwiesen. Bislang wurden hauptsächlich Präparate, die Konidien und Extrakte von *Trichoderma harzianum* (*Tha*) und *T. viride* (*Tvi*) enthielten, für einen Einsatz zur kurativen Bekämpfung der Erreger entwickelt. Die Firma Agrimm Technologies Ltd. in Neuseeland bietet z. B. konidienhaltige Produkte, wie Trichodowels<sup>®</sup>, Trichobject<sup>®</sup> und Trichoseal<sup>®</sup> gegen Pilzkrankheiten vor allem im Land- und Obstbau an. In Italien und Südafrika zeigten erste Feldversuche mit selektierten Stämmen von *Tha* sehr gute Ergebnisse bei der Kontrolle von *Ela* und *Pch* im Weinbau. Neueste Erkenntnisse aus Südafrika belegen zudem einen positiven Effekt von *Trichoderma* auf das Wachstum des Rebstocks und dessen Wurzeln. Des Weiteren gab es aus Brasilien erste Erkenntnisse über endophytische Vertreter der Gattung *Trichoderma* in Kakao-Pflanzen (*Theobroma cacao*). Diese Isolate sind in der Regel eher langsamwüchsig, können aber aufgrund ihrer angepaßten endophytischen Lebensweise eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der Pathogene spielen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Revitalisierung der Pilzkulturen

Die Fachgruppe Mikrobiologie des Institutes für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit der BBA unterhält die größte und bedeutenste Referenzkultursammlung bodenbürtiger und phytopathogener Pilze in Deutschland, mit ca. 6.300 Stämmen. Sie ist die umfangreichste Sammlung genetischer Ressourcen von Mikroorganismen im Geschäftsbereich des BMVEL und beinhaltet derzeit ca. 350 *Trichoderma*-Stämme. Zusätzlich standen weitere 350 *Trichoderma*-Isolate aus der Kultursammlung des PPDRi in Teheran/Iran für die Selektionsversuche zur Verfügung. Sie wurden auf Grundlage eines wissenschaftlichen Austausches dem Projekt kostenlos bereit gestellt. Die in Erdröhrchen konservierten Pilzisolat wurden zunächst von einer Technischen Assistentin des Institutes auf Synthetischen-Nährstoffarmen-Agar (SNA) wiederbelebt und anschließend in Petrischalen mit Kartoffel-Glukose-Agar (PDA), Kartoffel-Möhren-Agar (PCA) und SNA überführt. Nach Wiedererlangung der ursprünglichen Vitalität begannen die Selektionsversuche.

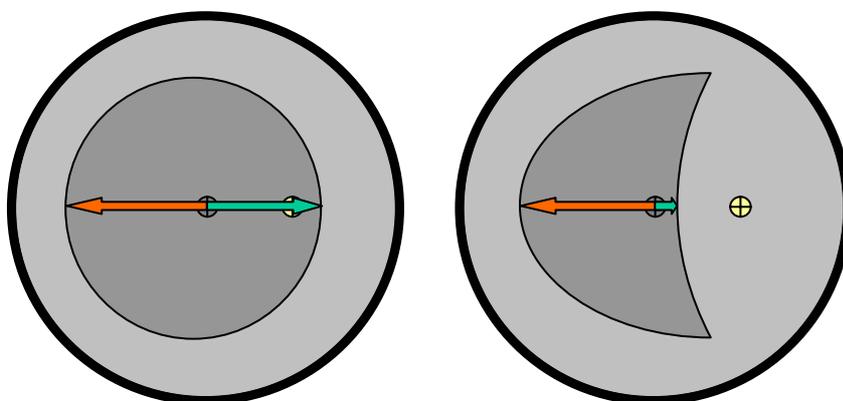
### 2.2. Dual-Kulturen-Versuche

Zwei Wirkmechanismen werden heute als Hauptursache für das antagonistische Potential der Gattung *Trichoderma* vermutet. Zum einen ist der Mykoparasitismus eine weitverbreitete Lebensform bei vielen Vertretern der Gattung. Der parasitische Einfluß der Antagonisten wurde daher zunächst anhand von Dual-Kulturen untersucht, wobei auf einer Petri-Schale mit PDA jeweils ein Agarblock ( $\varnothing$  5 mm) mit dem Pathogen bewachsen dem eines Antagonisten gegenüber gelegt wird. Aufgrund des langsamen Wachstums von *Pch* und *Pal*, konnte dieser Versuch nur mit dem Erreger *Ela* sinnvoll durchgeführt werden. Um das schnelle Wachstum vieler

*Trichoderma*-Stämme zu kompensieren, wuchs das Pathogen bereits 5 Tage vor dem Auslegen des Antagonisten auf der Schale an. Nach weiteren 5 Tagen bei 20° C wurden die Wachstumszonen ausgemessen und der Plattentest ausgewertet. Die Ergebnisse ließen für die Mehrzahl der Isolate allerdings keine eindeutige Auswertung zu, so daß weitere Selektionskriterien herangezogen werden mußten.

### 2.3. Tests zu antimikrobiellen Metaboliten der Antagonisten

Ein zweiter bekannter Wirkmechanismus von Antagonisten ist die Antibiose. Dabei sind extrazelluläre Substanzen aus dem Stoffwechsel des Pilzes wirksam, die eine antimikrobielle Wirkung besitzen. Flüchtige Metabolite, wie z. B. 6-Pentyl- $\alpha$ -Pyrone (PAP) und Massoialacton spielen wohl neben kleinen Eiweißmolekülen, sogenannten Peptaibolen, eine bedeutende Rolle. Daher wurden Vorversuche mit Massoialacton (0,005–0,04 % v/v) zur Hemmung des Pathogenwachstums auf PDA durchgeführt. Die positiven Resultate dieser Vorversuche führten zur Entwicklung eines Tests, der das antagonistische Potential aufgrund der Bildung antimikrobieller Metabolite bewerten sollte. Die Isolate wurden in flüssigem Kartoffel-Dextrose- bzw. Malz-Extrakt-Medium bei 20° C angezogen und nach 6 Tagen abfiltriert. Das Myzel wurde zur Massebestimmung bei 105° C getrocknet und ausgewogen. Unpolare organische Verbindungen wurden aus dem Filtrat durch Ausschütteln mit Ethylacetat extrahiert und im Rotationsverdampfer bei 35° C aufkonzentriert. Der Rückstand wurde dann entsprechend des Myzeltrockengewichts in Ethylacetat wieder aufgenommen. Insgesamt wurden Rohextrakte von ca. 400 *Trichoderma*-Isolaten gewonnen. In einem Plattentest wurde anschließend ein mit 20  $\mu$ l Konzentrat getränktes Filterpapier ( $\varnothing$  5 mm) neben einen Agarblock ( $\varnothing$  5 mm) mit dem Pathogen auf PDA gelegt und dessen Wachstum über 10 Tage beidseitig gemessen. Wegen des langsamen Wachstums der Pathogene *Pch* und *Pal* sowie der Flüchtigkeit der Wirkstoffe, konnten die Konzentrate nur auf ihre Wirksamkeit gegen *Ela* getestet werden. Zur besseren Auswertung wurde ein Wirkungs-Quotient aus dem Myzelwachstum auf der Filterpapier-abgewandten und dem der -zugewandten Seite berechnet. Der Wirkungsquotient wurde für die jeweiligen Wachstumswerte am 7. und 10. Tag gemittelt.



$$\text{Wirkungsquotient} = \frac{\text{Wachstum auf abgewandter Seite (cm)}}{\text{Wachstum auf zugewandter Seite (cm)}}$$



⊕ Filterpapier getränkt mit Rohextrakt  
⊕ Agarblock mit Erreger-Kultur



● Wachstumszone des Erregers nach 7- bzw. 10-tägiger Inkubation

## 2.4. Chemische Analyse bioaktiver Substanzen

Der Nachweis einer wachstumshemmenden Wirkung aus dem Plattentest sollte mit der Bildung von leicht flüchtigen Metaboliten korreliert werden. Zu diesem Zweck wurden die Rohextrakte mittels Dünnschicht-Chromatographie auf ihre Zusammensetzung überprüft. Jeweils 10 µl von 9 Proben und einem Standard (0.001 % v/v 6-Pentyl- $\alpha$ -Pyrone) wurden auf DC-Kieselgel-Platten mit Fluoreszenzindikator (254 nm, Fluka Chemie AG Buch/CH) aufgetragen und in einem Dichlormethan-Methanol-Gemisch (97:3 v/v) entwickelt. Nach dem Trocknen der DC-Platten konnte die gesuchte Verbindung unter kurzwelligem UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm) anhand des Standards entsprechend nachgewiesen werden ( $R_f \approx 0,51$ ). Vertreter der Sektion *Trichoderma* sind zudem als Produzenten von Mykotoxinen (u. a. Trichothecene) bekannt. Um den Einfluß dieser toxischen Substanzen auf die Rebe und Pathogene untersuchen zu können, wurden die *Trichoderma*-Isolate auf das Potential zur Trichothecenbildung untersucht. Die entwickelten DC-Platten wurden hierfür zunächst mit einem Aluminiumchlorid-Reagenz (20 %  $\text{AlCl}_3$  in Ethanol) besprüht und für 10 min bei 130° C getrocknet (Kamimura *et al.* 1979). Unter langwelligem UV-Licht ( $\lambda = 365$  nm) sind u. a. Trichothecene vom Typ B als blau-fluoreszierende Zonen zu erkennen. Anschließend wurden die gleichen DC-Platten mit einem Schwefelsäure-Reagenz (20 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in Ethanol) besprüht und wiederum für 10 min bei 130° C getrocknet. Typ A Trichothecene zeigen dann unter langwelligem UV-Licht ebenfalls eine blaue Fluoreszenz. Nach jedem Arbeitsschritt wurden die Ergebnisse in Form von Polaroid-Fotos festgehalten und dokumentiert.

## 2.5. Inokulation der Rebstecklinge mit selektierten Antagonisten

Das für die Versuche benötigte Stecklingsmaterial wurde im Januar von der Vermehrungsanlage des Sächsischen Staatsweingutes „Schloss Wackerbarth“ zur Verfügung gestellt. Die Vermehrungsanlage in Radebeul gewährleistet in der Regel die Bereitstellung gesunder Edelreiser für das Pfropfen von Unterlagsreben. Die Mutterstöcke werden aus diesem Grund regelmäßig auf Krankheitssymptome bonitiert. Da für 2003 eine Veredlung mit der weißen Rebe Goldriesling und der blauen Sorte Dornfelder nicht geplant war, konnten jeweils ca. 6.000 Augen dem Projekt überlassen werden. Sie wurden bei 3° C und 70 % Luftfeuchte in Dunkelheit bis zur Inokulation gelagert. Die einjährigen Triebe wurden stichprobenartig auf einen Befall durch *Ela*, *Pch* bzw. *Pal* kontrolliert. Anschließend wurden die Gewächshäuser für die Infektionsversuche vorbereitet. Es wurden ca. 2.000 l Einheitserde Typ P zur Sterilisation gedämpft und in ca. 2.500 Pflanztöpfe ( $\varnothing$  10 cm) gefüllt.

Anhand der vorangegangenen Labortests wurden repräsentative *Trichoderma*-Isolate für die Infektionsversuche an den Rebstecklingen ausgewählt. Die Kulturen wurden zunächst in 1 l-Kolben für 3–4 Wochen bei 25° C auf PDA angezogen. Bei genügender Sporulation wurde anschließend eine wäßrige Konidien suspension (700 ml mit Konzentration  $10^6$ – $10^7$  Konidien/ml) hergestellt. Die Inokulation der Zwei-Augen-Stecklinge mit den *Trichoderma*-Isolaten erfolgte über mehrere Wochen, da der arbeitstechnische Aufwand recht umfangreich war. Es wurde versucht, die Arbeitsschritte möglichst nahe am praxisüblichen Verfahren der Rebschulen zu orientieren. Die übliche Behandlung der Stecklinge mit Chinosol gegen Pilz- (insbesondere *Botrytis cinerea*) und Bakterienkrankheiten wurde aber nicht durchgeführt. Zunächst wurden die frisch geschnittenen Stecklingshölzer 17–18 h

gewässert und anschließend für 2–3 h abtrocknen lassen. Je Rebsorte wurden dann 60–70 Stecklinge mit dem basalen Ende für 60 min in die Konidien suspension getaucht. Im Folgenden wurden verschiedene Methoden für eine erfolgreiche Besiedlung des Rebholzes mit dem Antagonisten ausgetestet. Für das Vortreiben werden die Stecklinge in der Praxis in feuchte Sägespäne oder Torf gebettet und anschließend bei 26–30° C gelagert. Diese Methode schien für das Vorhaben weniger geeignet, da beide Materialien als reicher Nährboden für die Antagonisten und andere Pilze dienen können. Um lediglich die erfolgreiche Besiedlung des Stecklingsholzes zu fördern, wurde zur Einschlagung feuchter Blähton (Körnung 4–8 mm bzw. 8–16 mm) getestet. Dieses Material wird bei der Herstellung gebrannt und ist daher nahezu steril, enthält aber keine organischen Nährstoffe. Zum zweiten wurde auf die Einbettung ganz verzichtet und die Stecklinge nur auf Filterpapier gelegt. Da die Enden der Steckhölzer nicht paraffiniert wurden, fand das Vortreiben abgedeckt bei 27° C und 100 % Luftfeuchte statt. Von den vorgetriebenen Hölzern wurden jeweils die 40 stärksten ausgewählt und einzeln in Pflanztöpfe im Gewächshaus gesteckt. Inklusive Kontrollen sind je Rebsorte 1.250 Stecklinge angezogen worden. Eine erste Kontrolle des Inokulationserfolges konnte mit den verbliebenen Stecklingen durchgeführt werden. Dazu wurden die Hölzer oberflächensterilisiert und längs gespalten. Dem Holz wurden kleine Proben entnommen und in Petri-Schalen auf PDA ausgelegt. Die heranwachsenden Kolonien konnten so mikroskopisch bestimmt und mit den ursprünglich inokulierten Stämmen morphologisch verglichen werden.

Das Wachstum der Jungreben wurde regelmäßig auf äußere Entwicklungsmerkmale und Änderungen der morphologischen Charakteristika bonitiert. Für den direkten Nachweis des Antagonisten im Rebholz wurden exemplarische einige Pflanzen aufgespaltet und mit einer Calcofluor- bzw. sauren Fuchsin-Lösung angefärbt. Unter dem Epi-Fluoreszenzmikroskop sollte so das aktive Wachstum der Pilzhyphe im Holzgewebe veranschaulicht werden.

## 2.6. Infektion der Jungreben mit den Pathogenen

Im Juli wurden ~ 780 erfolgreich angewachsene Jungreben aus dem Gewächshaus ins Freiland umgesetzt. Zur Inokulation der Pflanzen mit den Pathogenen *Ela*, *Pch* und *Pal* wurden Zahnstocher aus Holz verwendet. Diese wurden zunächst sterilisiert und anschließend zusammen mit dem jeweiligen Pathogen in Petri-Schalen auf PDA ausgelegt. Die Pilzkulturen konnten so das Holz bei 20° C erfolgreich besiedeln. Jeweils ein kurzer Abschnitt der inokulierten Zahnstocher wurde dann in das angebohrte Rebholz ( $\varnothing$  2 mm) gesteckt und die Wunde mit Isolierband verschlossen. Für eine erneute Kontrolle des Inokulationserfolges mit den Antagonisten wurden die Bohrspäne des Rebholzes unter möglichst sauberen Bedingungen auf PDA-Platten ausgelegt und bei 20° C für 14 Tage inkubiert. Die ausgewachsenen Pilzkulturen wurden dann mikroskopisch bestimmt und mit den entsprechenden *Trichoderma*-Isolaten morphologisch verglichen.

Das Wachstum der Reben wurde weiterhin erfaßt. Die Schutzwirkung der Antagonisten *ad planta* kann aber erst in den folgenden Jahren anhand äußerer Symptome der Blätter und Triebe nachgewiesen werden. Von dem Ausschulen der Jungreben zwecks Kontrolle von inneren Krankheitssymptomen wird vorerst abgesehen, damit die Entwicklung der Pflanzen auch nach Abschluß des

Forschungsprojektes über mehrere Jahre untersucht werden kann. Die Wachstums- und Überlebensrate der Antagonisten in den einjährigen Trieben soll zudem im Anschluß an den Winter 2003/2004 festgestellt werden.

## 2.7. Bonitur Rebholzerkrankter Ertragslagen

Parallel zu den o. g. Teilaufgaben sollte in Zusammenarbeit mit dem Weinbauberater des AfLuG in Coswig erstmals eine systematische Erfassung der Verbreitung von Eutypa-, Esca- und Petri-Krankheit im Anbaugebiet Sächsisches Elbtal vorgenommen werden. Im Sommer 2002 bzw. Frühjahr und Sommer 2003 wurde eine ausgewählte Ertragslage umfassend auf die Expression äußerer Symptome latenter Rebholzkrankheiten bonitiert. Die Rebstöcke wurden nach Intensität der Krankheits-symptome in verschiedene Befallsstufen eingeteilt. Für eine genaue Diagnose wurden Pilzkulturen aus erkrankten Pflanzenteilen isoliert und mikroskopisch bestimmt. Der sichere Nachweis von *Ela* ist jedoch sehr schwierig, da die Kulturen keine morphologisch charakteristischen Merkmale ausbilden. Daher wurden art-spezifische Primer und PCR-Techniken für eine genaue Bestimmung des Pathogens eingesetzt.

## 2.8. Molekular-biologische Identifikation der Pathogene

Die Kulturen wurden in flüssigen Malz-Extrakt-Medium bei 20° C angezogen und nach 7 Tagen abfiltriert. Kleine Mengen des Myzels wurden anschließend zusammen mit 250 µl Glasperlen in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 750 µl einer SDS/EDTA Lösung versetzt. Der Zellaufschluß wurde für 30 min mittels einer Kugelmühle durchgeführt. Zur Proteinfällung wurde der Aufschluß anschließend mit 100 mg NaCl versetzt und für 30 min im Eisbad geschüttelt. Feste Bestandteile und Proteine wurde mittels Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4° C getrennt. Der Überstand wurde in 130 mg Polyethylenglykol 6000 aufgenommen und 60 min im Eisbad langsam geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4° C wurde der Überstand verworfen und das Pellet vollständig in 250 µl einer TE/LiCl-Lösung gelöst. Anschließend wurde die DNA mit 1 ml eisgekühltem Isopropanol gefällt und nach nochmaligen Zentrifugieren in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach abschließender Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet über nacht luftgetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA in 100 µl sterilem Bidest-Wasser aufgenommen und bei - 20° C eingefroren. Der molekular-biologische Nachweis des Erregers wurde mit Hilfe der artspezifischen PCR-Primer Lata 1 und Lata 2-2 (Lecomte *et al.* 2000) erbracht. Die Primer sind von DNA-Sequenzen der ITS1 bzw. ITS2 Region abgeleitet und amplifizieren ein 385 bp langes Fragment der 5.8 S rDNA. Vor der Amplifikation wurden jeweils 5 µl der DNA-Lösung mit 29,8 µl Bidest-Wasser, 5 µl PCR-Puffer, 3 µl Magnesiumacetat-Lösung, 3 µl dNTP, 0,2 µl Taq-Polymerase (PerkinElmer) und jeweils 2 µl Primer (0,2 µM) versetzt. In einem BioRad Thermo-Cycler wurde das Gemisch in 37 Zyklen mit 30 s Denaturierung, 30 s Annealing bei 65° C und 1 min Extensionszeit bei 72° C amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend in 1 % Agarose-Gel aufgetragen und nach Elektrophorese bei 200 V in 0,5× Tris-Borat-EDTA-Puffer mit Ethidium-Bromid (0,8 µg/l) angefärbt. Positive Amplifikationen konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Über 380 *Trichoderma*-Isolate wurden vor allem aus der institutseigenen Referenzkultursammlung in Berlin und der Stammsammlung des PPDRI in Teheran in die Untersuchungen einbezogen. Zusätzlich wurden potentiell interessante Referenzstämme vom CBS in den Niederlanden und dem ARS/USDA in den USA dem Screening zur Verfügung gestellt. Das *in vitro* Selektionsverfahren umfaßte Dual-Kulturen-Tests, das physiologische Screening extrazellulärer Metabolite und die chemische Charakterisierung der bioaktiven Inhaltsstoffe.

##### 3.1.1. Dual-Kulturen-Versuche

In 180 Dual-Kultur-Versuchen sind die direkten Wirkungen einzelner *Trichoderma*-Isolate getestet worden. Die Ergebnisse konnten allerdings nicht wie gewünscht verwertet werden, da differenzierbare Kriterien des Wachstumseinflusses auf das Pathogen *Ela* nur selten zu deutlich erkennen waren. Generell wurde von keinem untersuchten Isolat ein Hemmhof gebildet. In der Mehrzahl der Versuche wurde aber eine Art der Barriere zwischen den beiden aufeinander zuwachsenden Myzelien beobachtet. Nach 10 Tagen Wachstum fand dann eine teilweise Durchmischung der Myzelzonen statt, die in der Regel aber keinen Einfluß auf das weitere Wachstum des Pathogens hatte. Vor allem zwei Stämme (D110 und CBS111258) zeigten in den Plattentests dennoch eine deutlich destruktive Wirkung. Schon nach 5 Tagen wurde dabei eine Braunfärbung des Erregermyzels sichtbar, die sich in den darauffolgenden Tagen weiter intensivierte. Aufgrund der schwierigen Auswertung wurden die Dual-Kultur-Versuche vorzeitig abgebrochen, um weitere Selektionskriterien untersuchen zu können.

##### 3.1.2. Tests zu antifungalen Metaboliten

Die Untersuchungen zur antifungalen Wirkung extrazellulärer Metabolite aus ca. 400 *Trichoderma*-Isolaten führten zu deutlich differenzier- und auswertbaren Ergebnissen. Die Werte der ermittelten Wirkungsquotienten lagen zwischen 1 und 2,31, wobei ein höherer Wert die bessere antifungale Wirkung widerspiegelt. Bei der Auswertung fiel auf, daß bekannte bioaktive *Trichoderma*-Arten wie *Tvi*, *T. koningii* (*Tko*) oder *T. atroviride* (*Tat*) durchschnittlich einen relativ niedrigen Wirkungsquotienten aufwiesen. In Diagramm 1 des Anhangs sind die durchschnittlichen Werte nach Artzugehörigkeit aufgetragen. Eine noch unbeschriebene neue Art aus der Sektion *Trichoderma* zeigt hier den höchsten Quotient von 1,87. Auch zeigten sich die Rohextrakte der Arten *T. virens* und *Tha* wirksam gegen den Erreger *Ela*. Die genauen Wirkungsquotienten aller untersuchten *Trichoderma*-Isolate sind der Tabelle 1 des Anhangs zu entnehmen.

##### 3.1.3. Chemische Analyse der wirksamen Metabolite

Die Rohextrakte von 210 *Trichoderma*-Isolaten wurden mit Hilfe von Dünnschicht-Chromatographie chemisch analysiert. Dabei sollte ein Zusammenhang zwischen den o. g. Plattentests auf antifungale Metabolite und den enthaltenen Substanzen untersucht werden. Besonderes Augenmerk galt dabei den flüchtigen  $\delta$ -Lactonen, die bereits als hochwirksame Sekundärmetabolite einiger *Trichoderma*-Arten bekannt

sind. In den Analysen wiesen vor allem die Arten *T. pubescens*, *T. strigosum*, *T. paceramosum*, *T. asperellum*, *Tvi*, *Tat* und einige Isolate von *Tko* ein hohes Potential zur Bildung von  $\delta$ -Lactonen auf. Für Stämme der Arten *Tha* oder *T. sp. nov.*, die einen hohen Wirkungsquotienten bei den Plattentests aufwiesen, konnte allerdings kein Potential zur Bildung von PAP oder Massoialacton nachgewiesen werden. Dies läßt vermuten, daß die antagonistische Wirkung gegen *Ela* nicht direkt mit einer erhöhten Produktion von  $\delta$ -Lactonen in Zusammenhang steht.

Zusätzlich wurde daher das Potential zur Bildung von Mykotoxinen in die chemische Analyse einbezogen. Trichothecene vor allem vom Typ B sind vielfach wegen ihrer toxischen Wirkung auf tierische Organismen untersucht worden. Um deren evtl. Einfluß auf das Wachstum des Pathogens *Ela* und der jungen Reben nachzuweisen, wurden die Rohextrakte anschließend auf deren Trichothecengehalt überprüft. Im Ergebnis konnte nur für wenige Isolate das Potential zur Mykotoxinproduktion aufgezeigt werden. In den Rohextrakten der Stämme BBA68463 (*Tko*), BBA70259 (*T. hamatum*), BBA70691 (*T. sp.*), CBS100945 (*T. spirale*) und BBA70740, CBS473.94 (*Tha*) wurde jeweils ein Trichothecen vom Typ B nachgewiesen. Bei der Untersuchung zur Bildung von Trichothecenen Typ A fielen die einheitlich positiven Signale der Vertreter der noch unbeschriebenen Art aus der Sektion *Trichoderma* auf. Die hohe wachstumshemmende Wirkung der Isolate könnte auf die Bildung dieser unbekannt Substanz zurückzuführen sein, da die Rohextrakte aller anderen Stämme kein ähnliches Signal zeigten. Im Rahmen des Forschungsvorhabens war die genaue Charakterisierung der wirksamen Substanzen nicht geplant und möglich. Hierzu bedarf es weiterer Untersuchungen, die fundierte Aussagen zu den vorliegenden Ergebnissen ermöglichen.

Kopien fotografierter DC-Platten sind am Ende des Anhangs angefügt.

#### 3.1.4. Inokulation der Rebstecklinge

Anhand der Ergebnisse aus den Tests wurden 30 repräsentative *Trichoderma*-Isolate selektiert. Wichtige Auswahlkriterien waren der Wirkungsquotient, die Ergebnisse der chemischen Analyse (Bildung von  $\delta$ -Lactonen, Trichothecenen) sowie die Herkunft des Isolats (*Theobroma*-Endophyt, Originalsubstrat, kältere bzw. wärmere Klimate etc.). Zudem sollte ein breites Artenspektrum in die Inokulationsversuche einbezogen werden, um mögliche Abwehrreaktionen der Reben auf einzelne Vertreter spezifizieren zu können. Um die Wirkung bereits zugelassener Pflanzenstärkungs- und -schutzmittel zu überprüfen, wurden auch die Isolate BBA70923, BBA70903, BBA70721 und CBS244.93 in die Auswahl aufgenommen. Die entsprechenden Präparate sind allerdings nicht speziell für den Weinbau entwickelt und vertrieben worden. Die ausgewählten Stämme sind zusammenfassend im Anhang in Tabelle 2 aufgeführt.

Die Inokulation der Zwei-Augen-Stecklinge wurde parallel an zwei Rebsorten vorgenommen. Es wurden die Sorten Dornfelder und Goldriesling für die Versuche ausgewählt. Jeweils 60–70 Stecklinge wurden zunächst mit den selektierten Antagonisten inokuliert und für 2–3 Wochen vorgetrieben. Im Laufe des Versuchs erwies sich das Einbetten der Hölzer in gebrannten Blähton als Methode der Wahl. Nach dem Vortreiben wurden jeweils die 40 am besten entwickelten Hölzer für das Gewächshaus ausgewählt. Dabei spielten Kriterien wie z. B. kurze kräftige Triebe oder starke Kallusbildung an den Schnittflächen eine wichtige Rolle. Im Vergleich zu

den unbehandelten Kontrollen waren kaum Unterschiede zu verzeichnen. Bei einigen inokulierten Stecklingen der Sorte Dornfelder schien eine verstärkte Kallusbildung eingesetzt zu haben. Auch nach drei Wochen Vortrieb konnten die Stecklinge des Goldrieslings noch nicht anhand der genannten Kriterien beurteilt werden, da weder bei den Kontrollen noch inokulierten Stecklingshölzern die entsprechende Entwicklung zu beobachten war. Insgesamt sind je Rebsorte 1.250 Stecklinge (sowohl Kontrollen als auch inokuliert) ins Gewächshaus überführt worden. Trotz Wiederholung der Inokulation und veränderter Vortriebsbedingungen konnten die Hölzer der Sorte Goldriesling nicht angezogen werden. Nach Rücksprache mit der Vermehrungsanlage wurde mitgeteilt, daß die bereitgestellten Triebe auch nicht erfroren waren. Generell wird aber die Rebsorte für die Vermehrung als schwierig angesehen, so daß auch in der Praxis beim Veredeln eine hohe Ausfallquote zu verzeichnen ist. Die weiteren Untersuchungen konnten folglich nur an den Reben der Sorte Dornfelder durchgeführt werden. Im Vergleich zu den Kontrollen trieben die inokulierten Stecklinge im Gewächshaus allgemein etwas verzögert aus. In den ersten Wochen nach dem Austrieb waren vereinzelt ein langsames Wachstum und leichte Pflanzenschäden an Blättern und Trieben zu erkennen. Vor allem Stecklinge, die mit den Isolaten D110, CBS111258 und BBA70761 inokuliert wurden, bildeten häufiger kurze Triebe mit nekrotisierten Blättern aus. Nach zwei Monaten waren diese Schäden allerdings nicht mehr zu erkennen und die entsprechenden Pflanzen zeigten ein normales Wachstum. Später im Sommer nach Übersiedlung ins Freiland schienen die Jungreben, die mit den Stämmen D110 und CBS111258 inokuliert wurden, sogar ein im Vergleich zur Kontrolle schnelleres Wachstum aufzuweisen. Diese pflanzenstärkende Wirkung der Antagonisten würde ähnliche Beobachtungen internationaler Forschergruppen bestätigen.

Der Erfolg der Inokulation mit den Antagonisten und deren Etablierung im Rebholz wurden zu zwei Zeitpunkten festgestellt. Nach dem Vortreiben wurden zunächst von jedem *Trichoderma*-Isolat 3–5 Stecklinge je Rebsorte aufgespaltet und kleine Holzproben daraus entnommen. Nach Anzucht der Kulturen aus dem Material wurden die Pilze morphologisch bestimmt und mit den ursprünglichen *Trichodermen* verglichen. Nur bei zwei Hölzern der Kontrolle wurden dabei Fremdinfectionen gefunden, die während des Vortreibens die Stecklinge besiedelt haben könnten. Mit der Erregerinokulation im Juli/August 2003 wurde der Besiedlungserfolg der Antagonisten-Stämme ein zweites Mal umfassend untersucht. Vier Monate nach der Inokulation konnten dabei 519 der 780 ausgepflanzten Jungreben auf das Vorhandensein der jeweiligen *Trichoderma*-Isolate getestet werden. Für die Mehrzahl der Stämme blieb die Reisolationshäufigkeit unter 50 %. Zwei der *Tha*-Isolate fielen aber durch eine überdurchschnittlich hohe Rate von ca. 92 bzw. 95 % auf. Es handelte sich dabei um die beiden Stämme, die schon in den Dual-Kulturen-Tests positiv verwertbare Ergebnisse lieferten. Des weiteren wies das Isolat BBA68479 (*T. cf. koningii*) ebenfalls eine gute Reisolationsrate von ~ 76 % auf. Die Versuche machen aber bereits deutlich, daß die gewünschten antagonistischen Eigenschaften *ad planta* nicht art-, sondern stammspezifische Selektionskriterien unterworfen sind. Die Reisolationsraten anderer *Tha*-Isolate blieben weit hinter den beiden genannten zurück. Auch scheinen bestimmte bioaktive Metabolite wie Trichothecene keine direkt negative Wirkung auf das Rebwachstum zu haben. Die Stecklinge des *Trichoderma*-Isolats BBA70691 zeigten ein normale Austriebquote (77,5 %) und eine

überdurchschnittliche Reisolationsrate (59 %). Die Isolate aus den vier bereits zugelassenen Präparaten konnten bei der Reisolation nicht überzeugen. Die jeweilige Erfolgsquote der Anzucht inokulierter Stecklinge und Kontrollen sowie die entsprechenden Reisolationsraten sind zusammenfassend in Tabelle 3 des Anhangs dargestellt.

Der Nachweis aktiven Wachstums der Antagonisten-Isolate im Rebholz sollte mit Hilfe spezifischer Fluoreszenzfärbung der Pilzhyphen erbracht werden. Die durchgeführten Färbemethoden erwiesen sich allerdings als zu unspezifisch, um klare Aussagen bezüglich der Ausbreitung im Holzgewebe und Mark machen zu können. Die Beobachtungen unter dem Epi-Fluoreszenz-Mikroskop wurden durch eine Hintergrundfärbung stark beeinträchtigt, dennoch wurden vereinzelt hyphen-ähnliche Strukturen erkannt. Auch eine Kombination verschiedener Färbungen und der chemische Aufschluß störender Substanzen führte nicht zu besseren Ergebnissen. Vermehrungs- und Verbreitungsorgane der antagonistischen Pilze konnten im Rebholz daher nicht beobachtet werden.

### 3.1.5. Infektionsversuche

Im Juli/August 2003 wurden 780 erfolgreich angezogene Rebstecklinge der Sorte Dornfelder vom Gewächshaus ins Freiland überführt. Gleichzeitig wurde an 509 Jungreben eine Holzinfection mit den Pathogenen *Ela*, *Pch* und *Pal* durchgeführt. Rund ein Viertel der angezogenen Jungreben eines jeden Antagonisten wurde mit den entsprechenden Pathogen stamminokuliert. In der verbliebenen Vegetationsperiode konnte zunächst keine erkennbare Schädigung der Reben beobachtet werden. Aufgrund der Epidemiologie der Krankheiten ist eine sinnvolle Auswertung anhand äußerer und innerer Symptome frühestens ab 2004 möglich. Dann erst kann die Schutzwirkung einzelner Antagonistenstämme gegen die Krankheitserreger *ad planta* evaluiert werden. Entsprechend sollen die Versuche daher am Institut fortgeführt werden.

### 3.1.6. Erfassung von Rebholzkrankheiten

Die Erfassung der Eutypa-, Esca- und Petri-erkrankten Ertragslagen im Anbaugebiet Sächsisches Elbtal wurde in Kooperation mit dem Weinbauberater des AfLuG in Coswig im Sommer 2002 bzw. Frühjahr und Sommer 2003 durchgeführt. An mehreren Tagen wurden vorab ausgewählte Ertragslagen auf äußerer Krankheits-symptome untersucht. Da alle betriebswirtschaftlich produzierenden Winzer im Anbaugebiet zentral durch den Weinbauberater koordiniert werden, ist die Meldung von Krankheitssymptomen flächendeckend gewährleistet. Bisher gab es nur zwei kontrolliert umweltschonend produzierende Ertragslagen, die die für Eutypiose, Esca- und Petri-Krankheit typischen Symptome meldeten. Zum einen ist es das Weingut „Schloss Proschwitz“ in Zadel bei Meißen, wo der Erreger *Ela* an einigen 7-jährigen Rebstöcken der Sorte Dornfelder in Form von welkenden Triebspitzen nachgewiesen werden konnte. Der zweite, ernstere Fall von Eutypiose wurde über zwei Jahre im Gut Pesterwitz umfassend bonitiert und dokumentiert. Nach Intensität der Befalls-symptome wurden die Rebstöcke in verschiedene Schadstufen eingeteilt. Im Jahr 2002 betrug die Befallshäufigkeit ca. 20 %, wobei viele der erkrankten Rebstöcke bereits abgestorben oder entfernt worden waren. Als Ursache für die hohe Ausfallquote wird der strenge Winter 1997 vermutet. Es wird angenommen, daß

dieser zusätzliche Umweltstreß mit einem massiven Symptomausbruch der latenten *Eutypa*-Infektion in Zusammenhang steht. Eine signifikante Differenz in der Empfänglichkeit einzelner Rebsorten (Weißburgunder, Bacchus und Blauer Spätburgunder) für die Krankheiten konnte nicht gefunden werden (siehe Tabelle 4, Diagramm 2 und 3 im Anhang). Der tatsächliche Befall ist vermutlich um einiges höher, da nicht alle infizierten Rebstöcke zur selben Zeit wenn überhaupt äußere Krankheits-symptome zeigen. Im Vergleich zum vorangegangenen Jahr nahm 2003 die Befallshäufigkeit erkrankter Rebstöcke im Gut Pesterwitz um ca. 1 % bei allen bonitierten Rebsorten zu. Über diesen relativ kurzen Zeitraum läßt sich allerdings nicht nachweisen, ob die Zunahme aufgrund der weiteren Verbreitung des Erregers oder durch klimatische Umstände bedingt war.

Für die Diagnose wurden Pilzkulturen aus erkrankten Pflanzenteilen herangezogen und mikroskopisch bestimmt. Da *Ela* in Kultur keine Konidien oder andere differenzierte Merkmale ausbildet, wurden artspezifische Primer und PCR-Techniken für eine genaue Bestimmung des Pathogens eingesetzt. Somit konnte das Pathogen *Ela* für beide o. g. Ertragslagen gesichert nachgewiesen werden.

Das derzeitige Fehlen von Symptomen der Esca- und Petri-Krankheit bedeutet aber nicht, daß die Erreger *Pch* und *Pal* nicht schon im Anbaugebiet Sächsisches Elbtal verbreitet sind. Wie auch bei der Eutypiose vergehen zwischen Infektion und Symptomausbruch mehrere Jahre. Da die meisten Ertragslagen erst nach 1990 wieder- bzw. Neubepflanzt werden konnten, ist die Alterstruktur der Reben im Anbaugebiet relativ einheitlich und jung. Nur wenige Winzer, wie z. B. das Gut Pesterwitz haben Rebstöcke älter als 15 Jahre in ihrem Bestand. Auch aufgrund der vermuteten Verbreitung durch infiziertes Pflanzgut wird in den folgenden Jahren mit einer Zunahme von Esca- und Petri-erkrankten Ertragslagen gerechnet.

Die Boniturfafeln sind dem Anhang beigefügt.

### 3.1.7. Tagungsreisen, Vorträge

Gleich zu Projektbeginn im Sommer 2002 fand ein Arbeitstreffen mit Dr. Kassemeyer und Dr. Fischer vom Staatlichen Weinbauinstitut in Freiburg/Br. statt. Es wurde der aktuelle Stand der laufenden Forschung in Freiburg und neueste Ergebnisse ausgetauscht, die in die Planung der Infektionsversuche in Berlin eingeflossen sind. Die Rolle der einzelnen Erreger und theoretische Ansätze ihrer Bekämpfung wurden erörtert. Methoden zur Isolation und Kultivierung der Pathogene konnten abgestimmt und übernommen werden. Probleme und Ursachen der Ausbreitung der Esca-Krankheit in SW-Deutschland sowie die generelle Epidemiologie der Erreger konnte an Beispielen besprochen und diskutiert werden.

Im Februar 2003 nahm der Projektmitarbeiter T. Gräfenhan an dem zweitägigen „3. International Workshop for Grapevine Trunk Diseases“ in Lincoln/Neuseeland teil. Über 80 Wissenschaftler aus aller Welt tauschten neueste Forschungsergebnisse und aktuelle Verbreitungsangaben zur *Eutypa*-, Esca- und Petri-Krankheit des Weines aus. Das Treffen setzte Schwerpunkte auf die Epidemiologie, Taxonomie und Kontrolle der Erreger. Dabei wurden die Probleme mit diesen „systemischen“ Pathogenen deutlich, da ungeklärte Fragen zur Taxonomie sowohl Diagnose als auch Kontrolle erschweren. Das Wissen über die Biodiversität der Erreger nimmt mit dem Einsatz von DNA-Sequenzierung und anderer molekularer Methoden stetig zu. Die Entwicklung neuer Diagnose-Techniken und -Hilfsmittel führt zu eindeutigen Be-

stimmungen steriler Pathogene. Die Infektionsquellen werden schrittweise eingegrenzt und systematisch bestimmt. Dennoch konnte bisher die Frage der Bodenbürtigkeit von z. B. *Pch* oder *Pal* nicht endgültig beantwortet werden. Fragen zur Pathogenität und Rolle von *Pal* und *Fmed* im Krankheitsverlauf können derzeit noch nicht schlüssig beantwortet werden. Sowohl *Ela* als auch *Pch* sind aber als Primärinfektionen anerkannt und müssen folglich verstärkt bekämpft werden. Der Erreger *Pch* wird wohl hauptsächlich durch infizierte Mutterstöcke verbreitet und kann vor allem im basalen Teil der Triebe diagnostiziert werden. Derzeit arbeiten weltweit nur wenige Arbeitsgruppen an Bekämpfungsstrategien gegen diese Pilzkrankheiten. Neue Versuche zum Einsatz chemisch-synthetischer Pflanzenschutzmittel (PSM) belegen die schwache Wirkung, von sowohl systemischen als auch Oberflächen-Präparaten. Die Spanische Firma Agrometodos stellte ein neues Präparat auf Pflanzenextraktbasis namens „Brotomax“ vor, das teilweise die Ausbildung der Krankheitssymptome abschwächt und bereits geschädigte Pflanzen stabilisieren soll. Allerdings begegnen die Extrakte nicht der Ursache für diese Erkrankungen, die pilzlichen Erreger werden nicht bekämpft. Die biologische Kontrolle der Erreger scheint nach wie vor das Mittel der Wahl zu sein. Neue Ergebnisse zum Einsatz von *Trichoderma*-Isolaten beim Pfropfen der Rebe zeigten u. a. eine verstärkte Kallusringbildung und schnelleres Wachstum der Stecklinge. Langjährige Feldversuche in Australien scheinen zudem zu belegen, daß der Antagonist über mehrere Jahre im Rebholz überdauern und aktiv sein kann. Bei der Vermehrung der Rebe hat sich ein neues Verfahren der Heiß-Wasser-Behandlung (HWT) bewährt, wobei die Stecklinge und Jungpflanzen für 30 min bei 50 °C gewässert werden. Eine 100 prozentige Bekämpfung ist auch damit nicht möglich, der Befall mit *Pch* und *Pal* konnte aber im Durchschnitt auf 7 % gesenkt werden. Als Nachteil dieser Methode wurde aber ein verspäteter Austrieb des Weins genannt.

Auf dem im Anschluß in Christchurch stattfindenden "8. Internationalen Kongress der Pflanzenpathologie" wurden allgemeine Aspekte des biologischen Pflanzenschutzes und der ökologischen Landwirtschaft erörtert. Zwei Beispiele für die erfolgreiche Bekämpfung bodenbürtiger Krankheitserreger mit Hilfe antagonistischer *Trichoderma*-Stämme wurden dort in Vorträgen präsentiert. Der Einsatz schnellwüchsiger Mykoparasiten wurde unter Wettbewerbsbedingungen getestet und beispielhaft zu marktreifen Produkten weiterentwickelt. Die Vorträge gaben positive Ausblicke auf den Vertrieb solcher „alternativen PSM“, wenn diese als Ergänzung zur Produktpalette der chemischen Industrie verstanden werden.

Im November 2003 fand am Staatlichen Weinbauinstitut in Freiburg/Br. das Seminar "Esca und andere Absterbeerscheinungen der Weinrebe" statt. Unter Leitung von Dr. Kassemeyer und Dr. Fischer kamen Wissenschaftler, Berater und Praktiker aus mehreren europäischen Ländern zusammen, um jeweils einen Überblick über den Stand des Wissens und der Praxis zu geben. Der Austausch zwischen laufenden Forschungsprojekten, Praxisberatern und Winzern stand dabei im Vordergrund. Verschiedene Ansätze der Bekämpfung der Erreger wurden vorgestellt und diskutiert, wobei deutlich wurde, daß keine der bisher zur Verfügung stehenden Methoden einen umfassenden Schutz bieten kann. Die Ergebnisse aus den epidemiologischen Untersuchungen führen noch nicht zu hinreichend wirksamen Kontrollstrategien der Pathogene. Weitere Versuche auch in ganzheitlicher Hinsicht sind notwendig, um die Ausbreitung der Rebholzkrankheiten einzudämmen. Vor

allein die Einflüsse des jahreszeitlichen Klimas und die Auswirkungen verschiedener Wirtschaftsformen auf die Ausprägung äußerer Symptome sind weitestgehend unbekannt. Auch werden weitere Untersuchungen zur Infektionsquelle notwendig sein, um die weitere Verbreitung der Erreger (z. B. durch infiziertes Pflanzmaterial, Hygiene in den Ertragslagen etc.) verhindern zu können.

### **3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse, Möglichkeiten der Umsetzung oder Anwendung**

Die nachhaltige Bekämpfung latenter Rebholzkrankheiten mittels präventiver Pflanzenschutzmaßnahmen stellt eine vielversprechende Neuerung im ökologischen Weinbau dar. Der Einsatz kurativer Präparate bleibt auf Krankheitsepidemien beschränkt, was nicht nur zu mehr Wirtschaftlichkeit und einer Kostenreduzierung beiträgt. Die Forschungsergebnisse und entwickelten Methoden zeigen, daß eine relativ kostenneutrale Kontrolle von Rebholzkrankheiten mittels pilzlicher Antagonisten präventiv möglich zu sein scheint. Die auf 1 1/2 Jahre begrenzte Projektdauer läßt aber keine abschließenden Aussagen zur Wirksamkeit der selektierten Antagonisten im Praxisbetrieb zu. In Dauerkulturen wie dem Obst- oder Weinbau sind mehrjährige Untersuchungen notwendig, um biologische Präparate entwickeln und austesten zu können. In einem begrenzten Rahmen sollen daher die Versuche am Institut weitergeführt werden. Dazu können die bereits inokulierten Reben evtl. in Praxisbetrieben ausgepflanzt und unter betriebswirtschaftlichen Bedingungen weiter untersucht werden. Weingüter im Anbaugebiet Sächsisches Elbtal bekundeten bereits Interesse, im Rahmen von Freilandversuchen das inokulierte Pflanzgut auf ökologischen Anbauflächen zu testen. Generell ist die praktische Umsetzung der Forschungsergebnisse aber an die Mitwirkung biologischer Pflanzenschutzunternehmen geknüpft, die Versuche zur Anzucht und Vermehrung der Antagonisten im größeren Maßstab fördern. Die bestehenden Richtlinien zur Zulassung biologischer PSM stehen zudem einer kurzfristigen Anwendung erfolgversprechender Antagonisten in der Praxis entgegen.

Ohne neue Erkenntnisse zur komplexen Epidemiologie und natürlichen Infektionsquelle der Erreger werden Bekämpfungsmaßnahmen auch weiterhin unzureichend sein. Die Ausbreitung der Rebholzkrankheiten kann neben aktiven Bekämpfungsmaßnahmen womöglich durch eine verbesserte Hygiene in den Ertragslagen und die umfassende Kontrolle des Pflanzgutes eingedämmt werden. Weitere Untersuchungen zur Empfänglichkeit bestimmter Rebsorten wären zudem wünschenswert, auch wenn die Ergebnisse des Forschungsvorhabens keine signifikanten Unterschiede bei den Rebsorten Bacchus, Weißburgunder und Blauer Spätburgunder zeigten. Die Rolle und der Einfluß verschiedener Erziehungsarten des Weins sowie unterschiedlicher Wirtschaftsweisen auf die Empfänglichkeit und Krankheitsausprägung ist weitestgehend unbekannt. Kurzfristig sind schnelle und wirkungsvolle Ansätze zur Kontrolle der Erreger aber auch hier nicht zu erwarten.

## **4. Zusammenfassung**

Ziel der ersten Phase des Forschungsvorhabens war die Selektion geeigneter *Trichoderma*-Isolate mit hoher antagonistischer Wirkung gegen die Erreger der Eutypa-, Esca- und Petri-Krankheit der Weinrebe. Im Labor wurden zunächst über 400 Stämme, hauptsächlich aus der Sektion *Trichoderma* und dem *T. harzianum*-

Komplex, unterschiedlichen Tests unterzogen. 30 Isolate aus ca. 15 *Trichoderma*-Arten wurden anhand von Dual-Kulturen, der Bildung von antifungalen Metaboliten sowie der chemischen Analyse bioaktiver Substanzen auf ihre Wirksamkeit gegen die Erreger *Eutypa lata*, *Phaeomoniella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum* selektiert.

Im zweiten Teil des Projektes wurden Stecklinge zweier Rebsorten jeweils mit einer Konidien suspension der selektierten Antagonisten inokuliert. Insgesamt wurden 2.500 vorgetriebene Hölzer im Gewächshaus angezogen. Getrennt nach Rebsorte und *Trichoderma*-Isolat wurden Anzucht- und Reisolationserfolge ermittelt und ausgewertet. Zwei Stämme zeigten ein besonders hohes Potential für den Einsatz in der Praxis. Sowohl ein aktives Myzelwachstum als auch die Bildung neuer Vermehrungseinheiten sollten für die Antagonisten im Rebholz nachgewiesen werden. Nach dem Umsetzen von 780 Jungreben ins Freiland wurde jeweils ein Viertel der Pflanzen mit einem der Pathogene inokuliert, um die Schutzwirkung der Antagonisten *ad planta* feststellen zu können. Aufgrund der Epidemiologie der Erreger ist eine abschließende Auswertung dieser Versuche erst in den kommenden Jahren möglich.

Das Anbaugebiet Sächsisches Elbtal wurde auf ein Vorkommen der Eutypa-, Esca- und Petri-Krankheit untersucht. In zwei Ertragslagen konnten äußere Symptome der Eutypiose an 7 bzw. 15-jährigen Rebstöcken beobachtet werden. Das Pathogen wurde aus erkranktem Pflanzenmaterial isoliert und in Kultur gebracht. Mit Hilfe von artspezifischen PCR-Primern gelang der gesicherte Nachweis von *Eutypa lata*. Teile der Ertragslagen des Gutes Pesterwitz wurde daraufhin umfassend auf die Ausprägung von Krankheitssymptomen bonitiert. Die Befallshäufigkeit lag 2002 bei ca. 20 % und erhöhte sich im darauffolgenden Jahr um ~ 1 %. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede in der Empfänglichkeit der Rebsorten Bacchus, Weißburgunder und Blauer Spätburgunder nachgewiesen werden.

## **5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen**

Der Projektverlauf stimmte in allen wesentlichen Punkten mit dem des Arbeits-, Zeit- und Finanzierungsplanes für den Berichtszeitraum überein. Alle Meilensteine wurden erfolgreich umgesetzt.

Der Arbeitsplan mußte nur in wenigen Punkten hinsichtlich neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse angepaßt bzw. erweitert werden. Der Projektbeginn verzögerte sich aus organisatorischen Gründen um einen Monat, so daß die praktischen Arbeiten erst im Juli 2002 aufgenommen werden konnten. Der um einen Monat verspätete Projektbeginn wirkte sich nicht negativ auf den Arbeits- und Zeitplan des Forschungsvorhabens aus. Allerdings erreichten die zur Verfügung gestellten *Trichoderma*-Isolate zahlenmäßig nicht den Umfang, der ursprünglich im Arbeitsplan vorgesehen war. Im Juni 2002 schied die für die Referenzkultursammlung des Institutes verantwortliche Technische Assistentin aus dem Dienst aus. Für den Unterhalt und die Versorgung der Kultursammlung wurde danach lediglich halbtags eine Lösung gefunden. Die anstehenden Arbeiten konnten daher nur teilweise weitergeführt werden, so auch die geplante Revitalisierung der konservierten *Trichoderma*-Stämme. Der Arbeitsplan für die erste Phase des Projekts

mußte dahingehend geändert werden, daß eine Vorauswahl potentiell vielversprechender Isolate getroffen wurde. Aus der Literatur und eigenen Versuchen bekannte, wirksame *Trichoderma*-Arten (z. B. *Tha*, *Tvi*, *Tat*, *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. virens* und verwandten Taxa aus den Sektionen *Trichoderma* und *Pachybasium*) wurden vorzugsweise revitalisiert. Insgesamt konnten von den ursprünglich 700 geplanten Isolaten dennoch ca. 400 in das Screening einbezogen werden. Erste Versuche mit Dual-Kulturen ergaben nicht die erwünschten Ergebnisse, so daß neue Methoden zur Wirksamkeitsbestimmung von Antagonisten in Betracht gezogen werden mußten. Die Entwicklung eines Screenings auf Basis flüchtiger, extrazellulärer Metabolite ermöglichte detailliertere Aussagen über das antagonistische Potential der Isolate. Zudem wurde die chemische Analyse der bioaktiven Substanzen in das Projekt aufgenommen. Die Wachstums- und Clearing-Tests wurden aufgrund des Artenspektrums und mündlicher Mitteilungen über neue endophytische *Trichoderma*-Arten aus Kakaopflanzen überflüssig. Die Ergebnisse aus den Labor-Tests wie auch entsprechende Angaben über Herkunftsort und Originalsubstrat führten zur Selektion von 30 potentiell geeigneten *Trichoderma*-Stämmen. Die Erweiterung der ursprünglich im Arbeitsplan vorgesehenen Anzahl von 10–15 Isolaten wird damit begründet, daß die beiden wirksamsten Vertreter von möglichst vielen Arten und bereits zugelassener Präparate in die Inokulationsversuche aufgenommen werden sollten.

Da die Ressourcen für die Gewächshausversuche begrenzt waren, ist die Anzahl der inokulierten Stecklinge je Stamm und Rebsorte auf 40 reduziert worden (insgesamt 2.500 Stecklinge). Um dennoch eine sinnvolle Auswertung der Infektionsversuche zu ermöglichen, war in der nächsten Projektphase die Reduzierung der zu testenden Pathogenkombinationen nötig. 510 Jungreben wurden entweder mit den Erregern *Ela*, *Pch* oder *Pal* inokuliert. Auf eine Kombination verschiedener Erreger wurde verzichtet. Um die Infektion mit den Pathogenen sicherzustellen, wurde der üblichen Wundinfektion mit Konidien eine aufwendige Stamminokulation mit bewachsenen Hölzchen vorgezogen. Anstatt die angezogenen Jungreben in größere Pflanzcontainer umzutopfen, wurde auch im Hinblick auf eine geplante Fortführung des Projektes entschieden, die Pflanzen ins Freiland umzusetzen. Auf dem Versuchsfeld der BBA in Berlin wurde dazu eine Fläche inkl. Pflanzfolie und Tropfenbewässerung für 780 Reben vorbereitet. Nach Rücksprache mit externen Wissenschaftlern wurde deutlich, daß eine Auswertung der antagonistischen Schutzwirkung *ad planta* für 2003 noch nicht sinnvoll schien. Das langsame Wachstum der Pathogene und die verzögerte Ausbildung der Krankheitssymptome wird erst in den folgenden Jahren eine fundierte Analyse der Versuche zulassen. Die einjährigen Triebe der Jungreben sollen daher erst im Winter 2003/2004 auf die Ausbreitung der Antagonisten untersucht werden. Zudem ist eine umfassende Bonitur auf äußere Krankheitssymptome für Frühjahr/Sommer 2004 geplant. Danach ist angedacht, die Reben in einem ökologischen Winzerbetrieb anzupflanzen und unter praxisnahen Bedingungen zu beobachten.

Bei der systematischen Erfassung von Verbreitung und Ausmaß der Eutypa-, Esca- und Petri-Krankheit im Anbaugebiet Sächsisches Elbtal wurden zusätzlich molekulare Methoden der Pathogendiagnose eingesetzt. Die Bestimmung des Erregers *Ela* ist in Kultur unter dem Lichtmikroskop nicht zweifelsfrei möglich. Das Fehlen von morphologischen Merkmalen und das sterile Wachstum machten eine

Charakterisierung mit Hilfe artspezifischer PCR-Primer notwendig. Die aus den betroffenen Ertragslagen isolierten Pilzkulturen gaben alle ein positives PCR-Signal und müssen daher dem Erreger der Eutypiose zugeordnet werden. Des weiteren ist davon auszugehen, daß die junge Altersstruktur des Sächsischen Anbaugebietes genaue Angaben zur Befallshäufigkeit mit den Esca-Erregern erst in einigen Jahren zulassen wird. Infiziertes Pflanzgut ist eine der Hauptursachen für die weite Verbreitung dieser Krankheit, besonders wenn die Vermehrung des Weins zentral in wenigen Rebschulen betrieben wird. Die Sächsischen Winzer beziehen die jungen Reben hauptsächlich aus S/SW-Deutschland, wo Esca bereits weit verbreitet ist.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Kamimura H., Nishijima M., Saito K. Yasuda K., Ibe H., Nagayama T., Ushiyama H. und Naoi Y. (1979). J. Food Hyg. Soc. Japan 20: 352
- Lecomte P., Péros J.-P., Blancard D., Bastien N. und Délye C. (2000). Appl. Env. Microb. 66: 4475–4480

Wirkungs-Quotient	StammNr.	Artname	Medium
2,20	D 12	sp. nov.	1/2 PDB
2,17	D 122	harzianum ?	1/2 PDB
1,98	D 11	sp. nov.	1/2 PDB
1,97	D 6	sp. nov.	1/2 PDB
1,95	D 14	sp. nov.	1/2 PDB
1,92	D 10	sp. nov.	1/2 PDB
1,92	D 15	sp. nov.	1/2 PDB
1,91	D 13	sp. nov.	1/2 PDB
1,90	D 8	sp. nov.	1/2 PDB
1,89	T 175 B	harzianum	1/2 PDB
1,88	T 93	harzianum	PDB
1,88	D 7	sp. nov.	1/2 PDB
1,86	T 179 B	harzianum	1/2 PDB
1,86	D 3	asperellum	1/2 PDB
1,80	T 97	harzianum	PDB
1,79	D 110	harzianum ?	1/2 PDB
1,79	T 381 B	harzianum	1/2 PDB
1,74	D 9	sp. nov.	1/2 PDB
1,74	T 179	harzianum	1/2 PDB
1,73	T 96 C	harzianum	PDB
1,69	T 389 B	harzianum	1/2 PDB
1,67	T 96 A	harzianum	PDB
1,63	T 433	harzianum	1/2 PDB
1,62	T 389	spirale	1/2 PDB
1,59	D 3	asperellum	MYP
1,59	BBA 65538	inhamatum	1/2 PDB
1,58	T 292	harzianum	1/2 PDB
1,53	T 437	harzianum	1/2 PDB
1,53	T 480	harzianum	1/2 PDB
1,46	T 430	harzianum	1/2 PDB
1,45	T 96 B	harzianum	PDB
1,41	BBA 70303	hamatum ?	1/2 PDB
1,40	T 67 A	harzianum	1/2 PDB
1,37	BBA 68479	koningii	1/2 PDB
1,37	BBA 65451	hamatum	1/2 PDB
1,37	T 287	virens ?	1/2 PDB
1,36	T 306	harzianum	1/2 PDB
1,33	T 341	harzianum	1/2 PDB
1,33	D 124	harzianum ?	1/2 PDB
1,32	T 179 A	harzianum	1/2 PDB
1,31	D 8	inhamatum ?	MYP
1,31	T 309	harzianum	1/2 PDB
1,31	T 427	harzianum	1/2 PDB
1,31	GJS 95-93	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,30	D 113	harzianum ?	1/2 PDB
1,30	T 369	harzianum	1/2 PDB
1,30	T 31	atroviride ?	1/2 PDB
1,30	T 3	atroviride ?	1/2 PDB
1,30	D 123	harzianum ?	1/2 PDB
1,30	T 314	harzianum	1/2 PDB
1,29	T 417 A	harzianum	1/2 PDB
Wirkungs-Quotient	StammNr.	Artname	Medium

1,28	BBA 70259	hamatum ?	1/2 PDB
1,28	BBA 70694	sp.	1/2 PDB
1,28	T 283 A	virens ?	1/2 PDB
1,27	BBA 70691	sp.	1/2 PDB
1,27	BBA 70903	pacerosum	1/2 PDB
1,27	BBA 70740	harzianum ?	1/2 PDB
1,27	D 119	harzianum ?	1/2 PDB
1,27	T 432	harzianum	1/2 PDB
1,26	T 408 A	harzianum	1/2 PDB
1,26	DZ 57	harzianum	1/2 PDB
1,26	T 350	harzianum	1/2 PDB
1,25	GJS 90-86	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,24	GJS 94-115	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,24	T 409	harzianum	1/2 PDB
1,24	D 125	harzianum ?	1/2 PDB
1,24	BBA 66076	viride	1/2 PDB
1,23	T 317	harzianum	1/2 PDB
1,23	T 93	harzianum	MYP
1,23	BBA 71325	pacerosum	1/2 PDB
1,23	BBA 70685	asperellum	1/2 PDB
1,23	D 12	inhamatum ?	MYP
1,23	DZ 56	agressivum	1/2 PDB
1,23	BBA 70923	asperellum	1/2 PDB
1,23	T 341	harzianum	PDB
1,23	T 314	harzianum	MYP
1,22	BBA 68654	hamatum	1/2 PDB
1,22	T 25 A	harzianum	1/2 PDB
1,22	T 426	harzianum	1/2 PDB
1,22	T 431 A	harzianum	1/2 PDB
1,22	BBA 70721	virens	1/2 PDB
1,22	T 75	harzianum	1/2 PDB
1,22	T 303	harzianum	1/2 PDB
1,21	BBA 70229	hamatum	1/2 PDB
1,21	BBA 70473	hamatum	1/2 PDB
1,21	BBA 64919	hamatum	1/2 PDB
1,21	CBS 473.94	harzianum	1/2 PDB
1,21	T 64 A	harzianum	1/2 PDB
1,21	D 104	harzianum ?	1/2 PDB
1,21	BBA 65304	hamatum	1/2 PDB
1,21	BBA 67726	hamatum	1/2 PDB
1,21	T 37	atroviride ?	1/2 PDB
1,21	GJS 96-47	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,21	T 88 A	harzianum	PDB
1,21	T 401	harzianum	1/2 PDB
1,21	T 48	harzianum	1/2 PDB
1,20	D 117	harzianum ?	1/2 PDB
1,20	BBA 70383	sp. nov.	1/2 PDB
1,20	T 286 A	inhamatum ?	1/2 PDB
1,20	T 62	harzianum	1/2 PDB
1,20	T 290 B	harzianum	1/2 PDB
1,20	T 413	harzianum	1/2 PDB
Wirkungs-Quotient	StammNr.	Artname	Medium
1,20	T 41	harzianum	1/2 PDB

1,20	BBA 70689	atroviride	1/2 PDB
1,20	T 427 B	harzianum	1/2 PDB
1,20	T 286 B	atroviride ?	1/2 PDB
1,19	CBS 111258	harzianum	1/2 PDB
1,19	T 457	harzianum	1/2 PDB
1,19	T 418 A	harzianum	1/2 PDB
1,19	BBA 70261	viride	1/2 PDB
1,19	T 362	harzianum	1/2 PDB
1,19	BBA 66989	pubescens	1/2 PDB
1,19	T 13	harzianum	1/2 PDB
1,19	BBA 70919	viride	1/2 PDB
1,19	T 408 B	harzianum	1/2 PDB
1,19	T 416	harzianum	1/2 PDB
1,18	T 331 A	harzianum	1/2 PDB
1,18	BBA 63064	viride	1/2 PDB
1,18	D 106	harzianum ?	1/2 PDB
1,18	D 127	harzianum ?	1/2 PDB
1,18	BBA 70967	pacerosum	1/2 PDB
1,18	T 342	sp. nov.	1/2 PDB
1,18	D 126	harzianum ?	1/2 PDB
1,18	T 334 A	harzianum	1/2 PDB
1,18	BBA 70684	asperellum	1/2 PDB
1,18	T 405 A	harzianum	1/2 PDB
1,18	T 360 A	harzianum	1/2 PDB
1,17	D 103	harzianum ?	1/2 PDB
1,17	D 105	harzianum ?	1/2 PDB
1,17	T 308 B	harzianum	1/2 PDB
1,17	T 326 B	harzianum	1/2 PDB
1,17	T 353	harzianum	1/2 PDB
1,17	T 331 A 1	harzianum	1/2 PDB
1,17	CBS 227.95	harzianum	1/2 PDB
1,17	GJS 99-97	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,17	D 108	harzianum ?	1/2 PDB
1,17	BBA 65294	inhamatum	1/2 PDB
1,16	BBA 70688	reesei	1/2 PDB
1,16	T 1	harzianum	1/2 PDB
1,16	T 10	harzianum	1/2 PDB
1,16	T 38	harzianum	1/2 PDB
1,16	T 261 A	harzianum	1/2 PDB
1,16	BBA 69109	koningii	1/2 PDB
1,16	T 453	harzianum	1/2 PDB
1,16	T 73 B	harzianum	1/2 PDB
1,16	T 262 C	harzianum	1/2 PDB
1,16	T 428	harzianum	1/2 PDB
1,15	GJS 98-43	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,15	BBA 70262	asperellum	1/2 PDB
1,15	D 17	koningii	1/2 PDB
1,15	BBA 63065	viride	1/2 PDB
1,15	T 410 B	harzianum	1/2 PDB
1,15	GJS 91-99	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
<b>Wirkungs- Quotient</b>	<b>StammNr.</b>	<b>Artname</b>	<b>Medium</b>
1,15	BBA 66008	viride	1/2 PDB
1,15	BBA 70690	pacerosum	1/2 PDB
1,15	D 102	harzianum ?	1/2 PDB
1,15	BBA 70238	viride	1/2 PDB
1,15	T 316	harzianum	1/2 PDB
1,15	T 405 B	harzianum	1/2 PDB
1,15	BBA 66347	hamatum	1/2 PDB
1,15	BBA 69577	strigosum	1/2 PDB
1,14	BBA 70636	sp. nov	1/2 PDB
1,14	D 121	harzianum ?	1/2 PDB
1,14	T 305	harzianum	1/2 PDB
1,14	T 340	harzianum	PDB
1,14	BBA 70862	hamatum	1/2 PDB
1,14	BBA 70681	viride	1/2 PDB
1,14	GJS 99-202	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,14	T 85	harzianum	PDB
1,14	T 362 A	harzianum	1/2 PDB
1,14	BBA 70110	pacerosum	1/2 PDB
1,14	D 107	harzianum ?	1/2 PDB
1,14	T 285 C	harzianum	1/2 PDB
1,13	T 356	harzianum	1/2 PDB
1,13	T 116 A	harzianum	1/2 PDB
1,13	CBS 348.93	strigosum	1/2 PDB
1,13	T 435 A	harzianum	1/2 PDB
1,13	T 288 B	harzianum	1/2 PDB
1,13	BBA 63057	hamatum	1/2 PDB
1,13	T 176 B	harzianum	1/2 PDB
1,13	BBA 68601	atroviride	1/2 PDB
1,13	D 1	asperellum	1/2 PDB
1,13	D 118	harzianum ?	1/2 PDB
1,13	BBA 70687	asperellum	1/2 PDB
1,13	D 114	harzianum ?	1/2 PDB
1,13	D 101	harzianum ?	1/2 PDB
1,13	T 112 B	harzianum	1/2 PDB
1,13	T 98 A	harzianum	PDB
1,13	T 339	harzianum	1/2 PDB
1,13	T 14	harzianum	1/2 PDB
1,13	BBA 65292	atroviride ?	1/2 PDB
1,13	D 21	koningii	1/2 PDB
1,13	T 425	harzianum	1/2 PDB
1,13	T 66 C	harzianum	1/2 PDB
1,12	T 8	atroviride	1/2 PDB
1,12	BBA 65348	pacerosum ?	1/2 PDB
1,12	BBA 70614	hamatum	1/2 PDB
1,12	BBA 69116	koningii	1/2 PDB
1,12	T 288	harzianum	1/2 PDB
1,12	GJS 93-20	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,12	T 175 B	harzianum	MYP
1,12	GJS 97-271	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,12	BBA 70637	sp. nov	1/2 PDB
1,12	T 355	harzianum	1/2 PDB
<b>Wirkungs- Quotient</b>	<b>StammNr.</b>	<b>Artname</b>	<b>Medium</b>
1,12	BBA 70639	koningii	1/2 PDB
1,12	DZ 60	atroviride	1/2 PDB
1,12	T 424	harzianum	1/2 PDB

1,12	T 168 A	harzianum	1/2 PDB
1,12	T 304	harzianum	1/2 PDB
1,12	CBS 189.79	viride	1/2 PDB
1,12	T 341 B	harzianum	PDB
1,11	T 180 A	harzianum	1/2 PDB
1,11	BBA 70271	hamatum	1/2 PDB
1,11	T 320	harzianum	1/2 PDB
1,11	T 20	harzianum	1/2 PDB
1,11	CBS 246.93	harzianum	1/2 PDB
1,11	T 136	harzianum	1/2 PDB
1,11	T 476	atroviride ?	1/2 PDB
1,11	D 23	asperellum	1/2 PDB
1,10	T 351 B	harzianum	1/2 PDB
1,10	BBA 66439	koningii	1/2 PDB
1,10	DZ 72	atroviride	1/2 PDB
1,10	GJS 99-194	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,10	BBA 66009	hamatum	1/2 PDB
1,10	BBA 69835	hamatum	1/2 PDB
1,10	T 16 C	harzianum	1/2 PDB
1,10	T 261 B	harzianum	1/2 PDB
1,10	BBA 66000	hamatum	1/2 PDB
1,10	T 417	harzianum	1/2 PDB
1,10	T 420 B	harzianum	1/2 PDB
1,10	T 59 A	harzianum	PDB
1,10	BBA 69608	hamatum	1/2 PDB
1,10	T 321	harzianum	1/2 PDB
1,10	T 155	harzianum	1/2 PDB
1,10	D 16	koningii	1/2 PDB
1,09	BBA 65352	viride	1/2 PDB
1,09	BBA 68600	atroviride	1/2 PDB
1,09	CBS 693.94	atroviride	1/2 PDB
1,09	BBA 66010	pseudokoningii	MYP
1,09	BBA 67728	pseudokoningii	MYP
1,09	BBA 71419	hamatum	1/2 PDB
1,09	BBA 70227	atroviride	1/2 PDB
1,09	T 415	harzianum	1/2 PDB
1,09	T 349 B	harzianum	PDB
1,09	T 200	harzianum	1/2 PDB
1,09	BBA 70643	paceramosum	1/2 PDB
1,09	D 100	harzianum ?	1/2 PDB
1,09	BBA 71509	paceramosum	1/2 PDB
1,09	DZ 58	harzianum	1/2 PDB
1,09	D 128	harzianum ?	1/2 PDB
1,09	T 312	harzianum	1/2 PDB
1,09	GJS 01-07	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,09	T 88 B	harzianum	PDB
1,08	CBS 102160	hamatum	1/2 PDB
1,08	BBA 69810	pseudokoningii	MYP
<b>Wirkungs- Quotient</b>	<b>StammNr.</b>	<b>Artname</b>	<b>Medium</b>
1,08	D 109	harzianum ?	1/2 PDB
1,08	T 7	harzianum	1/2 PDB
1,08	CBS 457.96	koningii	1/2 PDB
1,08	BBA 65450	viride	1/2 PDB
1,08	T 420 C	harzianum	1/2 PDB
1,08	T 405 C	harzianum	1/2 PDB
1,08	BBA 70692	sp.	1/2 PDB
1,08	T 345 1	harzianum	PDB
1,08	T 394 B 1	harzianum	1/2 PDB
1,08	BBA 70680	viride	1/2 PDB
1,08	D 116	harzianum ?	1/2 PDB
1,08	T 2	harzianum	1/2 PDB
1,08	T 354	harzianum	1/2 PDB
1,08	BBA 70616	viride	1/2 PDB
1,08	T 199 B	harzianum	1/2 PDB
1,07	T 196 B	atroviride ?	1/2 PDB
1,07	GJS 99-48	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,07	BBA 63059	viride	1/2 PDB
1,07	T 25 B	harzianum	1/2 PDB
1,07	T 397	harzianum	1/2 PDB
1,07	BBA 66467	koningii	1/2 PDB
1,07	T 65 A	harzianum	1/2 PDB
1,07	T 168 C	harzianum	1/2 PDB
1,07	D 112	harzianum ?	1/2 PDB
1,07	BBA 70253	harzianum ?	1/2 PDB
1,07	T 196 A	atroviride ?	1/2 PDB
1,07	T 290 A	harzianum	1/2 PDB
1,06	T 343 A	harzianum	PDB
1,06	CBS 100528	agressivum	1/2 PDB
1,06	D 110	harzianum ?	MYP
1,06	CBS 416.96	harzianum	1/2 PDB
1,06	CBS 433.97	asperellum	1/2 PDB
1,06	T 288 B	harzianum	MYP
1,06	T 79 B	harzianum	1/2 PDB
1,06	BBA 70252	cf.gelatinosa	1/2 PDB
1,06	T 349 C	harzianum	PDB
1,06	BBA 68646	asperellum	1/2 PDB
1,06	T 403	harzianum	1/2 PDB
1,06	BBA 65440	koningii	1/2 PDB
1,06	CBS 244.93	harzianum	1/2 PDB
1,06	CBS 273.78	inhamatum	1/2 PDB
1,06	T 99	harzianum	1/2 PDB
1,06	D 19	koningii	1/2 PDB
1,06	BBA 68463	koningii	1/2 PDB
1,06	BBA 70613	viride	1/2 PDB
1,06	BBA 70239	viride	1/2 PDB
1,06	T 362 A	harzianum	MYP
1,06	T 261 C	harzianum	1/2 PDB
1,05	T 435 B	harzianum	1/2 PDB
1,05	T 386	harzianum	1/2 PDB
1,05	BBA 70859	asperellum	1/2 PDB
<b>Wirkungs- Quotient</b>	<b>StammNr.</b>	<b>Artname</b>	<b>Medium</b>
1,05	BBA 70638	sp. nov	1/2 PDB
1,05	BBA 66069	viride	1/2 PDB
1,05	CBS 100526	agressivum	1/2 PDB
1,05	T 86	harzianum	PDB
1,05	T 349	harzianum	PDB

1,05	GJS 99-105	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,05	T 179 C	harzianum	1/2 PDB
1,05	T 199	harzianum	1/2 PDB
1,05	T 382	harzianum	1/2 PDB
1,05	T 401	harzianum	MYP
1,05	T 99	harzianum	PDB
1,05	BBA 70472	atroviride	1/2 PDB
1,05	T 28	harzianum	1/2 PDB
1,05	D 120	harzianum ?	1/2 PDB
1,05	BBA 70640	asperellum	1/2 PDB
1,05	T 342	sp. nov.	PDB
1,04	GJS 01-174 (2)	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,04	T 18	atroviride ?	1/2 PDB
1,04	BBA 68600	atroviride	MYP
1,04	D 22	asperellum	1/2 PDB
1,04	T 4	harzianum	1/2 PDB
1,04	T 39	harzianum	1/2 PDB
1,04	D 111	harzianum ?	1/2 PDB
1,04	T 71 B	harzianum	1/2 PDB
1,04	DZ 59	harzianum	1/2 PDB
1,04	T 381 B	harzianum	MYP
1,04	BBA 70269	viride	1/2 PDB
1,04	GJS 01-176 (1)	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,04	T 402	harzianum	1/2 PDB
1,03	BBA 66817	koningii	1/2 PDB
1,03	T 409	harzianum	MYP
1,03	T 288	harzianum	MYP
1,03	BBA 69111	strigosum	1/2 PDB
1,03	T 345 2	harzianum	PDB
1,03	T 334 A	harzianum	MYP
1,03	BBA 65411	koningii	1/2 PDB
1,03	BBA 68603	pseudokoningii	MYP
1,03	D 18	koningii	1/2 PDB
1,03	BBA 70683	viride	1/2 PDB
1,03	CBS 436.95	harzianum	1/2 PDB
1,03	GJS 92-18	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,03	BBA 70682	viride	1/2 PDB
1,02	BBA 68652	viride	1/2 PDB
1,02	BBA 70635	sp. nov	1/2 PDB
1,02	BBA 70228	atroviride	1/2 PDB
1,02	BBA 70686	asperellum	1/2 PDB
1,02	BBA 70146	hamatum	1/2 PDB
1,02	BBA 66345	marseniae	MYP
1,02	BBA 66069	viride	MYP
<b>Wirkungs- Quotient</b>	<b>StammNr.</b>	<b>Artname</b>	<b>Medium</b>
1,02	D 5	asperellum	1/2 PDB
1,02	BBA 65299	koningii	1/2 PDB
1,02	BBA 68768	atroviride	1/2 PDB
1,02	BBA 65351	viride	1/2 PDB
1,01	BBA 70471	viride	1/2 PDB
1,01	BBA 70739	harzianum	1/2 PDB
1,01	BBA 65410	koningii	1/2 PDB
1,01	BBA 70302	inhamatum ?	1/2 PDB
1,01	BBA 68601	atroviride	MYP
1,01	GJS 96-117	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,01	BBA 70488	atroviride	1/2 PDB
1,01	BBA 68543	asperellum	1/2 PDB
1,00	BBA 71426	asperellum	1/2 PDB
1,00	BBA 71375	viride	1/2 PDB
1,00	BBA 63055	hamatum	1/2 PDB
1,00	CBS 345.93	pubescens	1/2 PDB
1,00	GJS 96-118	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,00	GJS 96-119	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
1,00	BBA 65231	koningii	1/2 PDB
1,00	D 2	asperellum	1/2 PDB
1,00	CBS 688.94	harzianum	1/2 PDB
1,00	T 96 D	harzianum	PDB
1,00	BBA 66050	viride	MYP
1,00	D 122	harzianum ?	MYP
1,00	D 115	harzianum ?	1/2 PDB
1,00	T 312	harzianum	MYP
1,00	T 339	harzianum	MYP
1,00	T 343	harzianum	PDB
1,00	T 386	harzianum	MYP
1,00	BBA 68432	viride	1/2 PDB
0,99	D 4	asperellum	1/2 PDB
0,99	GJS 99-203	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
0,98	T 99	harzianum	MYP
0,98	BBA 66050	viride	1/2 PDB
0,98	GJS 96-120	sect. Trichoderma ?	1/2 PDB
0,98	D 20	koningii	1/2 PDB
0,98	T 345 A	harzianum	PDB
0,97	BBA 70612	viride	1/2 PDB
0,96	BBA 70617	paceramosum	1/2 PDB
0,96	BBA 70470	viride	1/2 PDB
0,95	BBA 70474	atroviride	1/2 PDB
0,93	BBA 70875	viride	1/2 PDB

Tabelle 1: Ergebnis des Metaboliten-Screenings von 384 *Trichoderma*-Isolaten nach gemitteltem Wirkungs-Quotient sortiert.

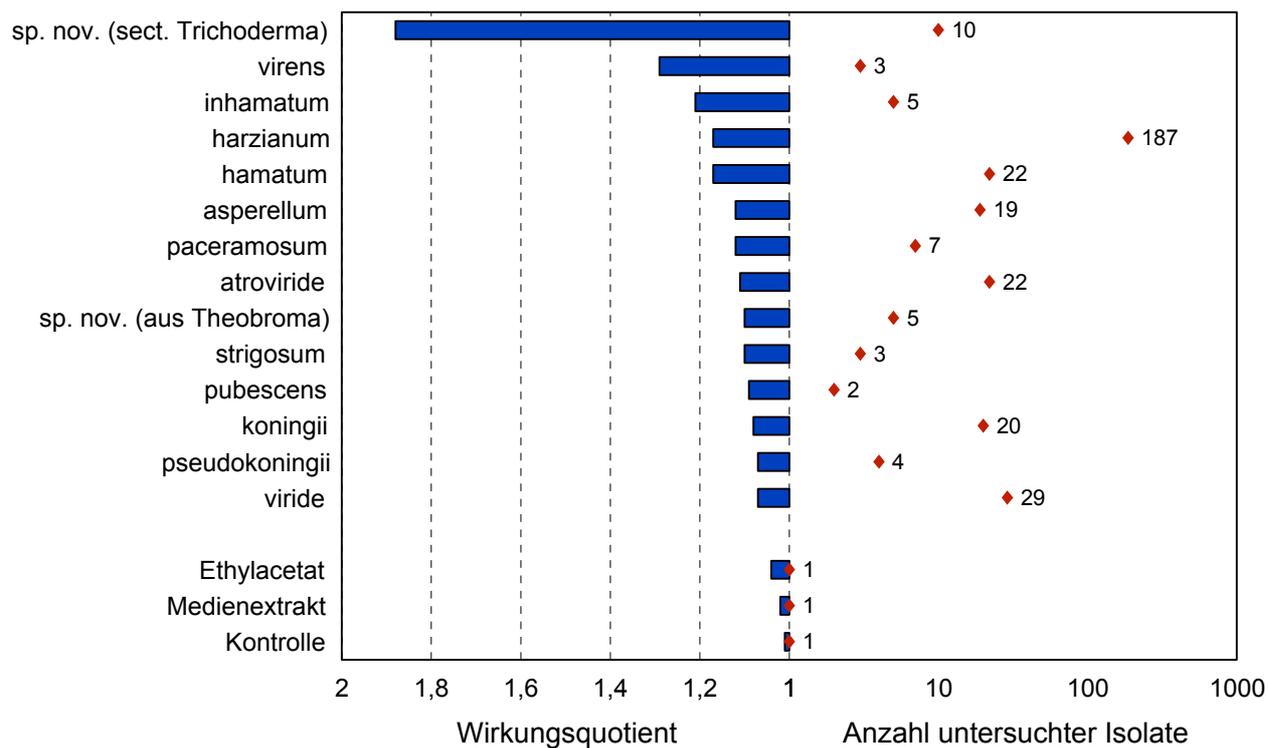


Diagramm 1: Durchschnittlicher Wirkungsquotient aus dem Meatbolitenscreening nach *Trichoderma*-Arten aufgegliedert

Stamm-Nr.	Artname	Produkt	Mykotoxin	Land	Ort	Substrat	Isolation	Sammlung
BBA 70685	Trichoderma asperellum		-	Vietnam			Jan-90	GJS 90-14
BBA 70923	Trichoderma asperellum	Ecofit	-	Germany			Feb-99	
BBA 70689	Trichoderma atroviride		-	Japan		Quercus with Lentinus edodes	Jan-97	GJS 97-26
CBS 693.94	Trichoderma atroviride		-	UK, Northern Ireland		mushroom compost		IMI 359825
BBA 70903	Trichoderma cf. atroviride	BINAB	-	Germany			Nov-98	
BBA 70252	Trichoderma cf. gelatinosa		-	USA, Illinois		decorticated wood of Vitis	Jan-96	GJS 96-214
BBA 70303	Trichoderma cf. hamatum		-	USA	Mississippi	soil (with soybean)	Jan-90	GJS 90-4
BBA 68479	Trichoderma cf. koningii		-	China		bark	Jan-93	GJS 93-44
BBA 66989	Trichoderma cf. pubescens		-	Poland	Rakownia near Posen	soil under pines (nursery)	May-92	
BBA 70688	Trichoderma cf. reesei		-	Brazil			Jan-97	GJS 97-178
BBA 69577	Trichoderma cf. strigosum		-	Germany	Berlin	compost	Jun-95	
BBA 65304	Trichoderma hamatum		-					
BBA 65451	Trichoderma hamatum		-	Germany, Brandenburg	Müncheberg	soil, arable	Sep-90	
CBS 111258	Trichoderma harzianum		-	USA				
CBS 244.93	Trichoderma harzianum	Trichodex	-	Israel				T-39
D 110	Trichoderma harzianum		?	Iran	Ahavaz	soil	Jan-00	
D 122	Trichoderma harzianum		-	Iran	Orumiye	mushroom compost	Jan-00	
T 25 A	Trichoderma harzianum		-	Iran	Malayer	grapes	Jan-00	
BBA 69109	Trichoderma koningii		-	Japan, Honshu	Ibaraki, Tsukuba	Oryza sativa	Mar-94	RC 10-1
BBA 70691	Trichoderma sp.		+					Hy 3
GJS 01-174	Trichoderma sp.		-				Jan-01	
BBA 70636	Trichoderma sp. nov.		-	Brazil		Theobroma cacao	Dec-97	
BBA 70638	Trichoderma sp. nov.		-	Brazil		Theobroma cacao	Dec-97	
BBA 70383	Trichoderma sp. nov.		-	Brazil		Theobroma cacao	Mar-97	GJS 97-4
D 12	Trichoderma sp. nov.		+	Iran	Aligoodarz	soil	Jan-00	T 27 A
D 8	Trichoderma sp. nov.		+	Iran	Doroud	soil	Jan-00	
BBA 70721	Trichoderma virens	Soilgard	-	Germany		soil	Apr-98	
T 287	Trichoderma virens		-	Iran		soil	Jan-00	
BBA 63064	Trichoderma viride		-	Germany		culture contaminant from soil	Jan-56	
BBA 70261	Trichoderma viride		-					Tr 8

Tabelle 2: Auflistung der 30 *Trichoderma*-Isolate, die für die Inokulationsversuche ausgewählt wurden. Angaben zur Herkunft konnten nur soweit gegeben werden, wie Informationen vorlagen.

Tab

Stamm-Nr.	Art	Gesamtanzahl	Anzahl Kontrolle	Anzahl Ela	Anzahl Pch	Anzahl Pal	Anzahl Reisolationen	Reisolationshäufigkeit
BBA 70685	<i>Trichoderma asperellum</i>	3	3	0	0	0	3	33,3%
BBA 70923	<i>Trichoderma asperellum</i>	36	9	9	9	9	30	23,2%
BBA 70689	<i>Trichoderma atroviride</i>	34	9	9	8	8	28	4,2%
CBS 693.94	<i>Trichoderma atroviride</i>	10	5	5	0	0	8	25,0%
BBA 70903	<i>Trichoderma cf. atroviride</i>	22	6	6	5	5	19	21,1%
BBA 70252	<i>Trichoderma cf. gelatinosa</i>	35	9	9	9	8	29	13,8%
BBA 70303	<i>Trichoderma cf. hamatum</i>	24	8	6	5	5	19	5,3%
BBA 68479	<i>Trichoderma cf. koningii</i>	25	7	6	6	6	21	76,2%
BBA 66989	<i>Trichoderma cf. pubescens</i>	28	7	7	7	7	24	50,0%
BBA 70688	<i>Trichoderma cf. reesei</i>	18	10	4	4	0	11	0,0%
BBA 69577	<i>Trichoderma cf. strigosum</i>	26	7	7	6	6	22	18,2%
BBA 65304	<i>Trichoderma hamatum</i>	15	5	5	5	0	13	0,0%
BBA 65451	<i>Trichoderma hamatum</i>	28	8	7	7	6	23	17,4%
CBS 111258	<i>Trichoderma harzianum</i>	32	11	7	7	7	24	91,7%
CBS 244.93	<i>Trichoderma harzianum</i>	22	6	6	5	5	19	31,6%
D 110	<i>Trichoderma harzianum</i>	31	12	7	6	6	22	95,5%
D 122	<i>Trichoderma harzianum</i>	22	9	5	4	4	16	18,8%
T 25 A	<i>Trichoderma harzianum</i>	10	5	5	0	0	8	12,5%
BBA 69109	<i>Trichoderma koningii</i>	37	10	9	9	9	30	6,7%
BBA 70691	<i>Trichoderma sp.</i>	31	12	7	6	6	22	59,1%
GJS 01-174	<i>Trichoderma sp.</i>	22	6	6	5	5	19	15,8%
BBA 70636	<i>Trichoderma sp. nov.</i>	23	8	5	5	5	18	11,1%
BBA 70638	<i>Trichoderma sp. nov.</i>	9	5	4	0	0	7	28,6%
BBA 70383	<i>Trichoderma sp. nov.</i>	24	7	6	6	5	20	5,0%
D 12 d	<i>Trichoderma sp. nov.</i>	38	11	9	9	9	30	63,3%
D 8 e	<i>Trichoderma sp. nov.</i>	32	9	8	8	7	26	7,7%
BBA 70721	<i>Trichoderma virens</i>	9	5	4	0	0	7	28,6%
T 287	<i>Trichoderma virens</i>	31	11	7	7	6	23	30,4%
BBA 65064	<i>Trichoderma viride</i>	10	5	5	0	0	8	62,5%
BBA 70261	<i>Trichoderma viride</i>	23	6	6	6	5	20	10,0%
Kontrolle		52	22	10	10	10	46	4,4%

cklingsanzucht und Reisolationsraten der selektierten *Trichoderma*-Isolate

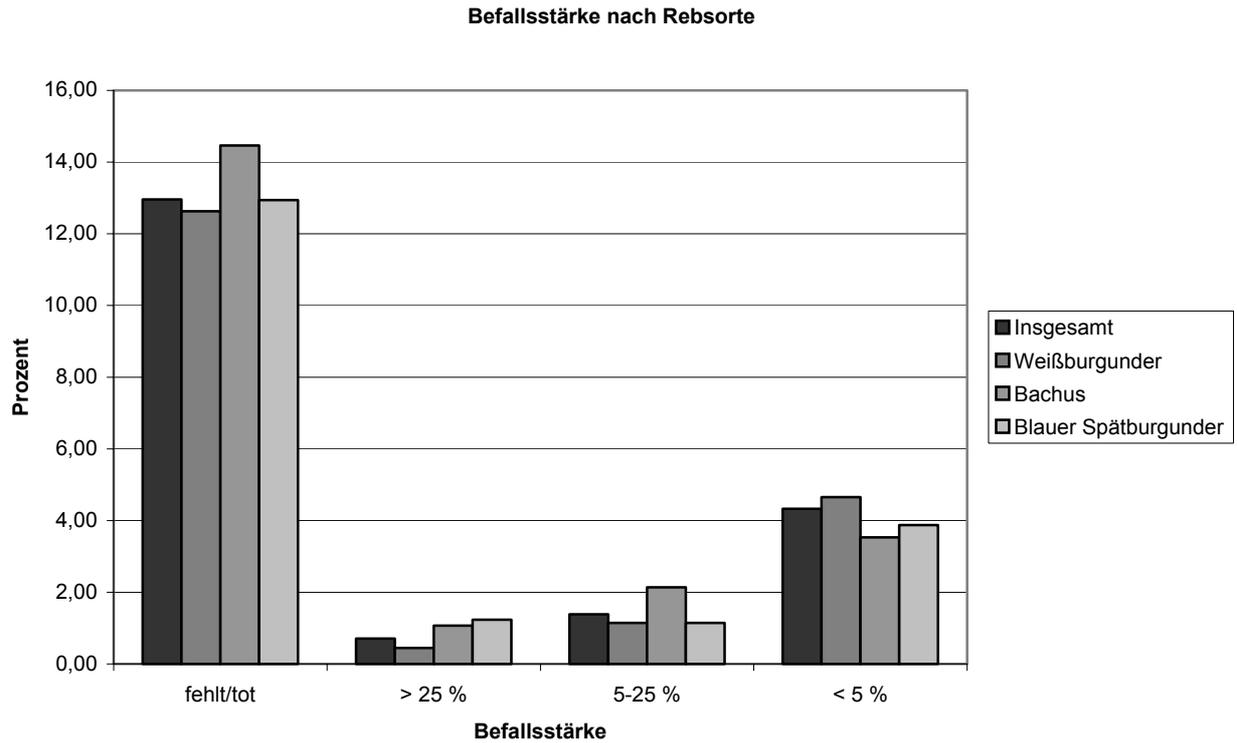


Diagramm 2: Prozentuale Verteilung der Befallsstärken von Eutypiose je Rebsorte

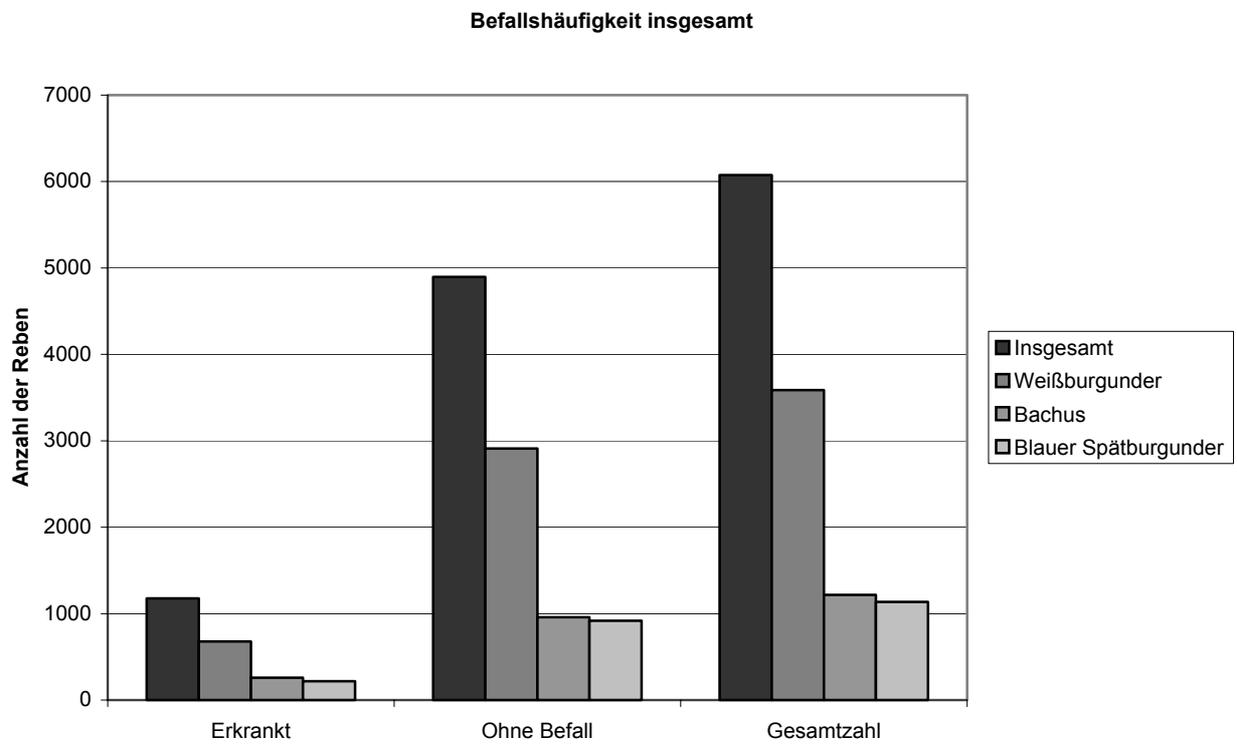


Diagramm 3: Anzahl der an Eutypiose-erkrankten Rebstöcke

<b>Befallsstärke Eutypiose</b>	<b>Insgesamt</b>		<b>Weißburg.</b>		<b>Spätburg.</b>		<b>Bachus</b>	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<b>fehlt/tot</b>	787	<b>12,96</b>	453	<b>12,63</b>	147	<b>12,94</b>	176	<b>14,46</b>
<b>&gt; 25 %</b>	43	<b>0,71</b>	16	<b>0,45</b>	14	<b>1,23</b>	13	<b>1,07</b>
<b>5–25 %</b>	84	<b>1,38</b>	41	<b>1,14</b>	13	<b>1,14</b>	26	<b>2,14</b>
<b>&lt; 5 %</b>	263	<b>4,33</b>	167	<b>4,66</b>	44	<b>3,87</b>	43	<b>3,53</b>
<b>Erkrankt</b>	1177	<b>19,38</b>	677	<b>18,87</b>	218	<b>19,19</b>	258	<b>21,20</b>
<b>Ohne Befall</b>	4897	<b>80,62</b>	2910	<b>81,13</b>	918	<b>80,81</b>	959	<b>78,80</b>
<b>Gesamtzahl</b>	6074		3587		1136		1217	

Tabelle 4: Bonitur-Ergebnis 2002 vom dem Gut Pesterwitz mit einer Darstellung der Befallsstärke für die drei Rebsorten Weißburgunder, Blauer Spätburgunder und Bachus