

## Einfluss von antagonistisch wirkenden *Trichoderma*-Isolaten auf den bodenbürtigen Erreger *Rhizoctonia solani*

### Effect of antagonistic active *Trichoderma*-Isolates on the soil-borne pathogen *Rhizoctonia solani*

RITA GROSCH<sup>1</sup>, JANA LOTTMANN<sup>2</sup> UND GABRIELE BERG<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Theodor Echtermeyer Weg 1, D-14979 Großbeeren

<sup>2</sup> Universität Rostock, Mikrobiologie, Albert-Einstein Str. 3, D-18051 Rostock

<sup>3</sup> Graz Technical University, Institut für Umweltbiotechnologie, Petersgasse 12, A-8010 Graz

E-Mail: grosch@igzev.de

#### Abstract

The antifungal activity of 390 as antagonists characterised fungal isolates were evaluated especially against the soil-borne pathogen *Rhizoctonia solani* using *in vitro* and *in vivo* assays. In a first step only antagonists with a mycoparasitic activity were selected in a dual culture assay. The *in vitro* characterisation of fungal antagonists included the ability of mycoparasitic activity of *Rhizoctonia* mycelium at different temperatures, the effect on germination of artificial produced *Rhizoctonia* sclerotia and on tuber borne sclerotia and finally the determination of cell wall degrading enzymes. Six potential fungal antagonists were selected as result of *in vitro* assays. All selected isolates were characterised as *Trichoderma reesei* and *T. viride* by partial 18S rDNA sequencing. Further the disease suppression effect of these isolates was tested on potato and on lettuce infected with *R. solani* in pot experiments. All *Trichoderma* isolates were able to suppress significantly the *Rhizoctonia* diseases on both crops under growth chamber conditions. Based on all results, three *Trichoderma* strains originally isolated from *Rhizoctonia* sclerotia were selected as promising candidates for biological control of *R. solani*.

*Keywords: Biocontrol, fungal antagonists, Rhizoctonia solani, Trichoderma spp.*

#### Zusammenfassung

Die antifungale Aktivität von insgesamt 390 bereits als Antagonisten charakterisierten Pilzisolaten wurde speziell gegen den bodenbürtigen Erreger *Rhizoctonia solani* *in vitro* und *in vivo* getestet. In Dualkultur wurden zunächst nur Antagonisten mit mykoparasitischer Aktivität selektiert. Von diesen pilzlichen Antagonisten wurde des weiteren die Effektivität der mykoparasitischen Aktivität von *Rhizoctonia*-Myzel bei verschiedener Temperatur, der Einfluss auf die Keimung von künstlich produzierten *Rhizoctonia*-Sklerotien und natürlich an Kartoffelknollen gebildeten Sklerotien sowie die Fähigkeit der Bildung von zellwandabbauenden Enzymen bestimmt. Im Ergebnis der *in vitro* Untersuchungen wurden sechs potentielle pilzliche Antagonisten selektiert. Basierend auf der partiellen 18S rDNA Sequenz wurden diese Isolate als *Trichoderma reesei* und *T. viride* charakterisiert. Die Untersuchung der krankheitsunterdrückenden Wirkung erfolgte sowohl an Kartoffeln als auch an Salat, infiziert mit *R. solani*, in Gefäßversuchen. Alle geprüften *Trichoderma* Isolate waren

in der Lage, die durch *Rhizoctonia* verursachte Krankheit an beiden Kulturen unter kontrollierten Bedingungen signifikant zu reduzieren. Im Ergebnis der Untersuchungen konnten drei *Trichoderma* Isolate, isoliert von *Rhizoctonia*-Sklerotien, als aussichtsreiche Kandidaten zur biologischen Bekämpfung von *R. solani* selektiert werden.

*Schlüsselwörter:* Biologische Bekämpfung, pilzliche Antagonisten, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma* spp.

## 1 Einleitung

Pilze der Gattung *Trichoderma* sind ubiquitär und weltweit in nahezu allen Böden zu finden, in dem sie zu den am häufigsten auftretenden und leicht kultivierbaren Pilzen zählen. Eine der bedeutendsten Eigenschaften von Pilzen der Gattung *Trichoderma* ist die Fähigkeit andere Pilze einschließlich Pflanzenpathogene wie *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp. oder *Fusarium* spp. zu parasitieren (Baek et al. 1999, Howell 1982, Wells et al. 1972, Zhang et al. 1996). Bereits 1932 berichtete Weindling über diese Eigenschaften der *Trichoderma* spp. sowie deren mögliche Nutzung im Biologischen Pflanzenschutz zur Bekämpfung von bodenbürtigen Schaderregern. Da *Trichoderma* Isolate sich in ihren antifungalen Eigenschaften enorm unterscheiden können, sind zur Pathogenkontrolle kompetente *Trichoderma* Stämme zu selektieren. Diese Stämme sollten zudem eine hohe Rhizosphärenkompetenz aufweisen, d.h. sich in der Rhizosphäre etablieren, die Wurzeloberfläche besiedeln und auf der entwickelnden Wurzel wachsen können. Verschiedene kompetente *Trichoderma* Arten wurden bereits zu kommerziellen Produkten entwickelt, die das Wachstum von landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Kulturen verbessern und einen Schutz vor Pathogenen gewährleisten (Yedidia et al. 1999, Chet 1987, Harman 2000). Die Mechanismen von *Trichoderma* spp. bei der Pathogenabwehr können sein: Mykoparasitismus, Antibiose, Konkurrenz um Nährstoffe oder Raum, Erhöhung der Stresstoleranz der Pflanze, Auslösen einer induzierten Resistenz oder Inaktivierung von Erregerenzymen. Hemmende Effekte von *Trichoderma* spp. gegen *R. solani* sind in der Literatur vielfach beschrieben (Elad et al. 1980, Baek et al. 1999, Howell 2003, Howell et al. 2000, Weindling 1934, Woo et al. 1999). In den letzten Jahren ist ein zunehmendes Auftreten von Krankheiten, verursacht durch *R. solani* nicht nur in Europa zu beobachten (Wolf & Verreet 1999, Rodrigues et al. 2003). Der Erreger *R. solani* ist, aufgrund seines breiten Wirtspflanzenkreis (mehr als 500 Pflanzenarten), seiner langen Überdauerungszeit im Boden, der hohen Resistenz der Überdauerungsorgane (Sklerotien) gegenüber diversen Umwelteinflüssen sowie des Mangels an resistenten Kulturen schwer zu bekämpfen (Li et al. 1995) und Fungizide sind ebenfalls nur eingeschränkt verfügbar. Ziel der Arbeit war es daher, pilzliche Antagonisten speziell zur Bekämpfung von Krankheiten, verursacht durch *R. solani*, zu selektieren. Die Antagonisten sollten zur Unterdrückung des Erregers an verschiedenen landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Kulturen einsetzbar sein. Da Pilze im Gegensatz zu Bakterien eine geringere Wirtsspezifität aufweisen, wurde sich in dieser Arbeit auf die Selektion von pilzlichen Antagonisten konzentriert (Berg et al. 2005). Insgesamt 390 antagonistisch wirkende pilzliche Antagonisten, isoliert aus verschiedenen Habitaten, wie Boden, Rhizosphäre von *Rhizoctonia* Wirtspflanzen oder von *Rhizoctonia*-Sklerotien (Berg et al. 2005), wurden hinsichtlich ihrer antifungalen Wirkung gegen verschiedene *R. solani* Isolate *in vitro* und *in vivo* getestet. In Dualkultur wurden zunächst Isolate mit einer hohen mykoparasitischen Aktivität ausgewählt und in weiteren Untersuchungen deren Fähigkeit Exoenzyme zu bilden, die Sklerotienkeimung von *R. solani* zu hemmen sowie *R. solani* an Salat und Kartoffel zu unterdrücken, geprüft.

## 2 Material und Methoden

### *Einfluss pilzlicher Antagonisten auf die Überlebensfähigkeit von R. solani Myzel*

Dualkultur: Von insgesamt 390 pilzlichen Antagonisten wurde die Fähigkeit *R. solani*-Myzel zu parasitieren geprüft. Dazu wurden Kartoffel-Dextrose-Agar Platten (PDA, Merck 1.10130) im Abstand von 7 cm mit Antagonist und Pathogen beimpft (3 Wiederholungen je Pathogen-Antagonist Interaktion) und bei 20°C und 12°C für 7 Tage inkubiert. Nachfolgend wurden die Isolate, die keine oder eine hemmende Wirkung gegenüber dem Myzel von *R. solani* zeigten, von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die Einschätzung der mykoparasitischen Aktivität erfolgte zunächst mikroskopisch (100x). Zur Beurteilung der Effektivität der mykoparasitischen Aktivität der zu testenden Antagonisten wurden aus der Überlappungszone nach fünftägiger Interaktion mit dem Pathogen Agarscheiben (Ø 5 mm) ausgeschnitten und auf Wasseragar ausgelegt und der Auswuchs von *R. solani*-Myzel nach 1-2 Tagen mikroskopisch beobachtet.

### *Bildung von Exoenzymen durch die pilzlichen Antagonisten*

Chitinasen: Der Nachweis chitinolytischer Aktivität erfolgte auf einem Mineralsalzagar, dem 1 % kolloidales Chitin zugesetzt war. Die zu testenden Pilzisolat wurden in der Mitte der Agarplatte aufgebracht. Ein Abbau des Chitins ist durch die Klärung des Agars im Umkreis der Kolonien infolge des Abbaus der Chitinpartikel erkennbar.

β-1,3-Gucanasen: Der Nachweis glucanolytischer Aktivität erfolgte ebenfalls auf einem Mineralsalzagar, dem 1 % Glucan (AZCL-Barley β-Glucan [Megazyme, Ireland]) zugesetzt wurde. Beim Abbau von Glucan wird der Farbstoff gelöst und diffundiert in den Agar.

Proteasen: Der Nachweis proteolytischer Aktivität erfolgte auf einem Medium, dem 0,4 % Gelatine zugesetzt waren. Nach Inkubation für 5-7 Tage bei 20°C klärt sich der sonst opake Agar infolge des Abbaus der Gelatine um die Kolonie herum auf.

### *Einfluss der pilzlichen Antagonisten auf die Keimung von R. solani Sklerotien*

Die Untersuchung des Einflusses auf die Keimung von *in vitro* auf PDA gebildeten Sklerotien von *R. solani* erfolgte nach Mukherjee et al. (1999). Dazu wurden *R. solani* Sklerotien auf 6 Tage alten mit dem zu testenden Antagonisten bewachsenen PDA Kulturen platziert, bei 20°C inkubiert und nach 14, 28 und 35 Tagen entnommen und auf Wasseragar transferiert, um mikroskopisch (100x) den Auswuchs von *R. solani* Myzel zu beobachten. Je Isolat wurden drei Wiederholungen mit je 8 *R. solani*-Sklerotien untersucht.

Zur Prüfung des Einflusses der Antagonisten auf die Keimung von auf Kartoffelknollen gebildeten Sklerotien wurden diese mit einer Konidien suspension ( $10^8$  Konidien /ml, 25 ml Suspension für 25 Knollen) behandelt und bei 20°C in Plastiktüten gelagert. In der Kontrollvariante wurden die Knollen entsprechend mit Leitungswasser benetzt. Nach einer Inkubationszeit von 42 Tagen wurden die Sklerotien von den Knollen entnommen und auf Wasseragar platziert, um ebenfalls mikroskopisch (100x) das Auskeimen von *R. solani*-Myzel zu beobachten.

### *Krankheitsunterdrückende Wirkung in vivo*

Salat: Die Anzucht der Salatjungpflanzen 'Daguan' erfolgte bis zum 2-3 Blattstadium in Pikierpaletten bei 20/15°C (Tag/Nacht). Im 3 Blattstadium wurden die Jungpflanzen in Töpfe (10x10x10 cm, eine Pflanze je Topf), gefüllt mit 'Fruhsdorfer Einheitserde' Typ P [chemische Analyse (mg/100g) N = 75; P = 75; K = 125; pH 5,9] gepflanzt. Jede Variante umfasste sechs Wiederholungen mit jeweils vier Pflanzen, die in der Klimakabine (16 h Licht 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 20/15°C, 60/80 % rel. Luftfeuchtigkeit Tag/Nacht) randomisiert aufgestellt wurden.

Zum Zeitpunkt der Pflanzung erfolgte die Inokulation der Jungpflanzen mit *R. solani* (Isolat 7/3) in Form von bewachsenen Getreidekörnern (5 Körner je Pflanze). Während der Kultur wurde wöchentlich die Anzahl infizierter Pflanzen ermittelt und nach einer Kulturdauer von vier Wochen die Trockenmasse (TM) der Salatpflanzen.

Behandlung mit den pilzlichen Antagonisten: Sieben Tage vor der Pflanzung wurden die Salatkeimlinge im 2 Blattstadium mit 5 ml Konidiensuspension ( $10^3$  Konidien/ml) der entsprechenden pilzlichen Antagonisten behandelt. Das Substrat ('Fruhsdorfer Einheitserde') wurde ebenfalls mit den Antagonisten vor der Pflanzung behandelt. Dazu wurden die zuvor in einem Substratgemisch kultivierten Antagonisten jeweils im Verhältnis (1:10, Antagonist: Substrat) in die 'Fruhsdorfer Erde' eingemischt.

Herstellung der Konidiensuspensionen: Die pilzlichen Antagonisten wurden 3 Wochen bei Raumtemperatur auf PDA kultiviert. Während dieser Zeit war eine ausreichende Sporulation der Pilz-Kulturen gegeben. Zur Herstellung der Konidiensuspensionen wurden die Konidien mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,3 %) von der Agaroberfläche abgeschwemmt. Die Bestimmung der Konidienzahl erfolgte mikroskopisch durch Auszählen mittels Thomakammer.

Anzucht der Antagonisten im Substratgemisch: Die Anzucht der pilzlichen Antagonisten erfolgte in einem Gemisch aus Maismehl und Einheitserde (MEG, 1:1). Das MEG (260 ml) wurde mit 26 ml Konidiensuspension ( $10^6$  Konidien/ml) der entsprechenden Antagonisten beimpft und 2 Wochen bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Kartoffel: Die Untersuchung der krankheitsunterdrückenden Wirkung der pilzlichen Antagonisten gegen *R. solani* an der Kartoffel erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Carling und Leiner (1990). In zwei Versuchen wurde die Wirkung zum einen nach Bodenapplikation mit den pilzlichen Antagonisten und künstlicher Inokulation der Knollen mit *R. solani* (Versuch I) und zum anderen nach Boden- und Knollenapplikation mit den pilzlichen Antagonisten an natürlich mit Sklerotien befallenen Kartoffelknollen (Befallsstärke 10 %) (Versuch II) geprüft. In beiden Versuchen wurde das Bodengemisch ('Fruhsdorfer Erde' und Quarzsand, 1:1 v/v) eine Woche vor dem Pflanzen der Knollen in die Töpfe mit einer Konidiensuspension (10 ml/l Bodengemisch,  $10^7$  Konidien/ml) der entsprechenden pilzlichen Antagonisten beimpft und bei Raumtemperatur inkubiert. Die natürlich mit Sklerotien befallenen Kartoffelknollen wurden vor der Pflanzung mit einer Konidiensuspension ( $10^7$  Konidien/ml) der Antagonisten benetzt. Im Versuch I dienten mit *R. solani* bewachsene Getreidekörner als Inokulum, die über den mit Boden bedeckten Kartoffelknollen platziert wurden.

Nach einer Kulturdauer von 3 Wochen im Dunkeln wurde die Befallsstärke wie folgt bonitiert: 1 = keine Symptome, 2 = einzelne bzw. geringe Anzahl an Läsionen, < 5 mm, 3 = mittlere Schädigung, Läsionen > 5 mm und um gesamten Keimstängel, 4 = starke Schädigung, meisten Keimstängel abgestorben, 5 = alle Keimstängel abgestorben.

### Molekulare Charakterisierung der Antagonisten

Pilzliche DNA wurde aus Myzel von 7 Tage alten Kulturen, gewachsen auf PDA, extrahiert (Berg et al. 2005). Zur Amplifikation der 18S rRNA wurden in einer PCR die für Pilze spezifischen Primer NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') und FR1 (5'-AIC CAT TCA ATC GGT AIT-3') genutzt (Vainio & Hantula 2000). Die mit QIAquick Gel Extraktionskit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigten PCR-Produkte wurden durch GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert (Grosch et al. 2006).

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Von den 390 pilzlichen Antagonisten zeigten letztlich 18 Isolate eine mykoparasitische Aktivität gegenüber den getesteten *R. solani* Isolaten (RS3/3 and RSW4) (Tabelle 1). Innerhalb von 5 Tagen waren lediglich acht Antagonisten in der Lage durch Parasitierung das Myzel von *R. solani* bei 20°C vollständig zu unterdrücken und nur vier Isolate zeigten diese Wirkung auch bei 12°C. Alle acht Isolate bildeten Glucanase und Protease *in vitro*, während Chitinase nur von den Isolaten P4 und P8 produziert wurde. Aufgrund der geringen Parasitierungsrate bei 12°C, als relevante Bodentemperatur, wurden die Isolate P7 und P8 nicht in die weiteren Versuche einbezogen. Die geringe Zahl von Antagonisten mit einer effektiven Wirkung gegen *R. solani* könnte Ausdruck von isolatpezifischen Mechanismen in der Pathogen-Antagonist Interaktion sein.

Tabelle 1: Überlebensfähigkeit von *Rhizoctonia solani* (R.s.)-Myzel (Isolate RS3/3 and RSW4) auf Wasseragar nach fünftägiger Interaktion mit einem pilzlichen Antagonisten sowie die Fähigkeit der Bildung lytischer Enzyme

Isolat	Spezies	Auswuchs von <i>R. s.</i> Myzel [%]				Bildung lytischer Enzyme <sup>1</sup>		
		20°C		12°C		Chitinase	Glucanase	Protease
		RS3/3	RSW4	RS3/3	RSW4			
P2	<i>Trichoderma reesei</i>	0	0	0	0	-	+	+
P3	<i>T. viride</i>	0	0	0	0	-	+	+
P4	<i>T. viride</i>	0	0	2.3	33.3	+	+	+
P7	<i>T. reesei</i>	0	0	100	88.9	-	+	+
P8	<i>T. viride</i>	0	0	88.9	88.9	+	+	+
P9	<i>T. reesei</i>	0	0	0	0	-	+	+
P10	<i>T. viride</i>	0	0	0	33.3	-	+	+
P11	<i>T. viride</i>	0	0	0	0	-	+	+

<sup>1</sup> + Bildung des Enzyms, - keine Enzymbildung

Überraschend ist, dass die selektierten pilzlichen Antagonisten mit mykoparasitischer Aktivität gegen *R. solani* zur Gattung *Trichoderma* gehören, obwohl eine Vielzahl an natürlich vorkommenden pilzlichen Antagonisten, z.B. der Gattung *Monographella*, *Paecilomyces* und *Penicillium*, in die Untersuchungen einbezogen wurden (Berg et al. 2005).

Die selektierten Isolate wurden als *Trichoderma viride* und *T. reesei* charakterisiert (Grosch et al. 2006). Die Ergebnisse der Untersuchungen unterstützen, dass *Trichoderma* spp. isolatspezifische Mechanismen in der Interaktion mit Pathogenen aufweisen, die jedoch bisher nicht vollständig verstanden sind (Harman et al. 2004).

Die Versuche zum Einfluss der Antagonisten auf die Sklerotienkeimung von *R. solani* zeigten, dass die geprüften sechs Isolate sowohl nach Interaktion mit Sklerotien auf PDA als auch auf Kartoffelknollen nach 14 Tagen bzw. 42 Tagen die Keimung signifikant reduzierten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Wirkung pilzlicher Antagonisten auf die Keimung von *R. solani* (*R.s.*)-Sklerotien auf PDA-Medium nach 14 Tagen und auf Kartoffelknollen nach 42 Tagen bei 20°C

Isolat	Keimung von <i>R. s.</i> -Sklerotien nach Inkubation auf	
	Auf PDA nach 14 d [%]	Auf Kartoffelknollen nach 42 d [%]
Kontrolle	100	94,2
P2	8,3*	45,8*
P3	41,6*	50,0*
P4	41,7*	45,8*
P9	0*	33,3*
P10	41,7*	29,2*
P11	45,8*	29,2*

\*Signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle nach dem LSD-Test ( $P = 0,05$ ).

Der Erreger *R. solani* überdauert als Sklerotien über viele Jahre im Boden, die aufgrund der vollständigen Melanisierung gegenüber diversen Umweltbedingungen sehr resistent sind. Eine Hemmung der Sklerotienkeimung im Boden würde der Erregerentwicklung entgegenwirken und könnte die Infektionsrate und langfristig das Erregerinokulum im Boden reduzieren.

Zu prüfen ist, ob durch die Behandlung von Kartoffelknollen mit entsprechend effektiven Antagonisten das Erregerwachstum während der Lagerhaltung deutlich eingeschränkt werden kann. Untersuchungen zeigen, dass die Anzahl der Sklerotien auf den Knollen während der Lagerung zunimmt (Chand & Logan 1984). Eine prophylaktische Behandlung der Knollen während der Lagerung mit einem Mykoparasiten als Teil einer Pflanzenschutzstrategie kann sowohl der Verbreitung des Erregers als auch die von der Knolle ausgehende Primärinfektion reduzieren oder verhindern. Dazu sind jedoch entsprechende Lagerversuche mit anschließenden Feldversuchen notwendig.

Die Inokulation von Salat mit *R. solani* führte zu einer signifikanten Wachstumshemmung innerhalb von 4 Wochen (Abb. 1). Durch die Behandlung mit den pilzlichen Antagonisten konnte der Einfluss von *R. solani* auf die Trockenmasse von Salat komplett kompensiert werden. In allen Varianten mit pilzlichen Antagonisten waren keine signifikanten Unterschiede in der Trockenmasse von Salat im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Eine Infektion der Salatpflanzen mit *R. solani* konnte nicht verhindert werden. Die Befallshäufigkeit war jedoch in den Varianten, behandelt mit pilzlichen Antagonisten, 2 Wochen nach Inokulation von *R. solani* deutlich reduziert, während in der Pathogenkontrolle (*R.s.*) alle Pflanzen infiziert waren (Abb. 2). Im Vergleich zur Pathogenkontrolle war die Befallshäufigkeit nach Behandlung mit den Antagonisten P4, P10 und P11 signifikant vermindert.

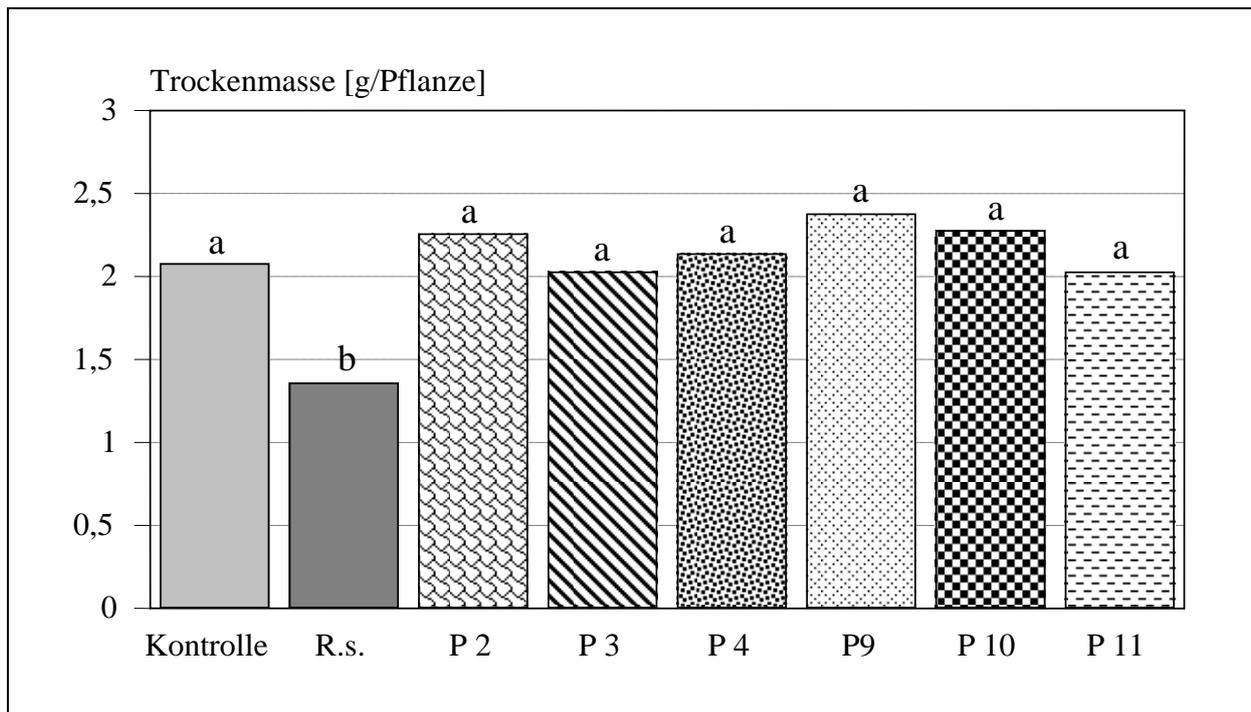


Abbildung 1: Einfluss pilzlicher Antagonisten auf die Trockenmasse von Salat 'Daguan' 4 Wochen nach Inokulation mit *R. solani* (R.s., Isolat 7/3) unter kontrollierten Bedingungen (20/15°C, Tag /Nacht). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P = 0,05$ ).

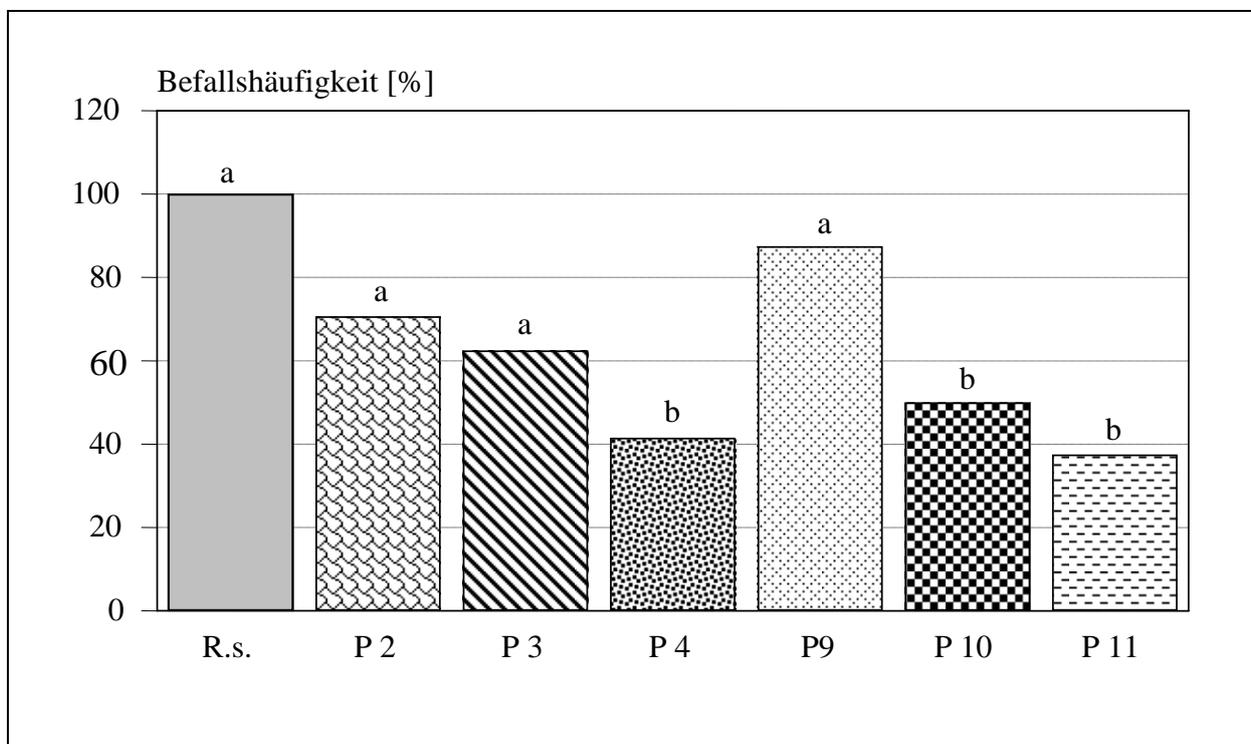


Abbildung 2: Wirkung pilzlicher Antagonisten auf die Befallshäufigkeit von Salat 'Daguan' mit *R. solani* (R.s., Isolat 7/3) 2 Wochen nach der Inokulation unter kontrollierten Bedingungen (20/15°C, Tag/Nacht). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P = 0,05$ ).

Auch an der Kartoffel war der Befall an den Keimen mit *R. solani* nach Behandlung mit pilzlichen Antagonisten signifikant reduziert (Abb. 3). Nach einer Kulturdauer von 3 Wochen war in beiden Versuchen ein mittlerer Befall zu beobachten. Im Versuch I wurde eine Befallsstärke mit *R. solani* von 2,7 und im Versuch II von 2,3 an den Keimen ermittelt. Nach künstlicher Inokulation von *R. solani* und Applikation der pilzlichen Antagonisten in den Boden (Versuch I) war eine im Durchschnitt stärkere Befallsreduktion (35,3 %) im Vergleich zum Versuch II (28,5 %) mit natürlich infizierte Kartoffelknollen zu beobachten. Im Versuch II erfolgte sowohl eine Boden- als auch Knollenapplikation mit den pilzlichen Antagonisten, während der Erreger im Versuch I als Myzel inokuliert wurde. Vermutlich wurde das Myzel durch die Antagonisten effektiver parasitiert im Gegensatz zu den Sklerotien.

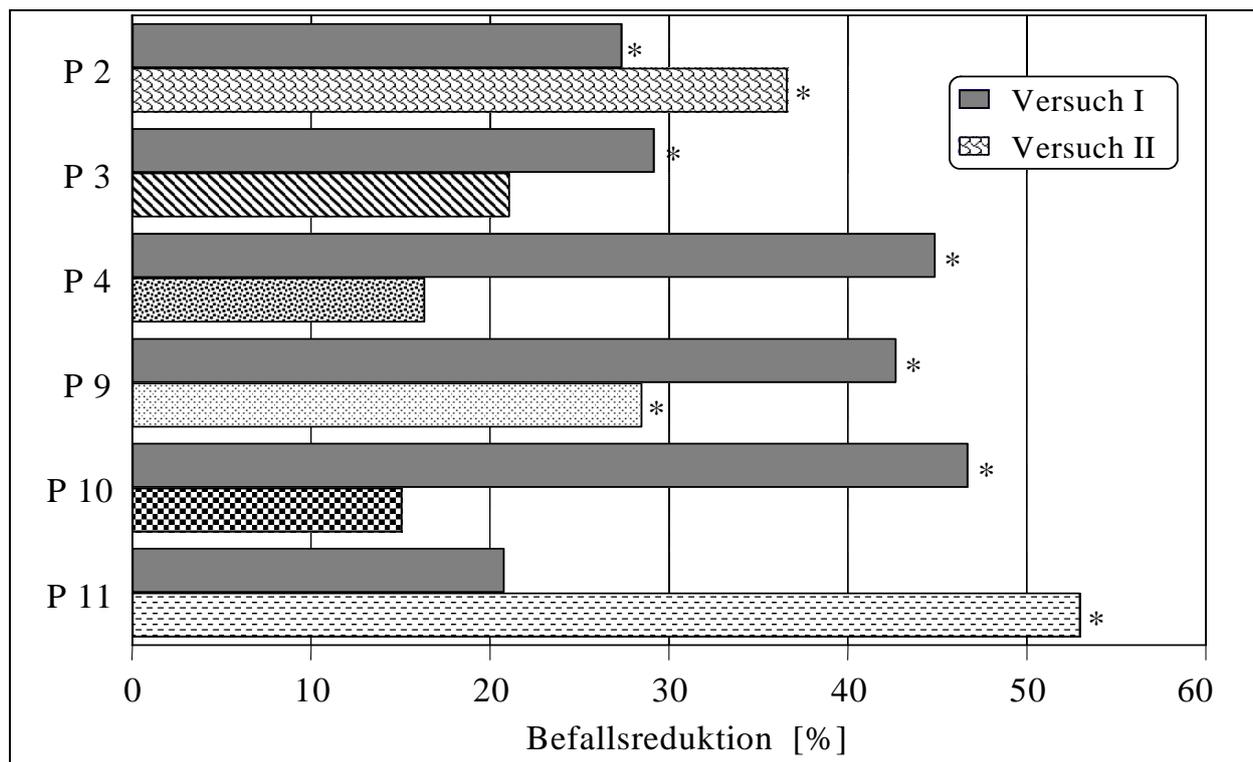


Abbildung 3. Reduktion des Befalls von Kartoffelkeimen mit *R. solani* nach Behandlung mit pilzlichen Antagonisten als Bodenapplikation und künstlicher Inokulation mit *R. solani* (Ben3) (Versuch I) und Boden- und Knollenapplikation von natürlich mit Sklerotien befallenen Knollen (Versuch II), 21 Tage nach der Inokulation. \*Signifikanz im Vergleich zur Pathogenkontrolle, Kruskal-Wallis Test ( $P < 0,05$ ).

Im Ergebnis aller *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigten die Isolate P9, P10 und P11 die besten antifungalen Effekte gegen *R. solani*. Diese Isolate wurden von *R. solani*-Sklerotien auf Kartoffelknollen isoliert. Das Potential von ökologischen Nischen als Quelle von Antagonisten wurde ausführlich von Opelt und Berg (2004) diskutiert. Insgesamt sind weitere Versuche sowohl an Salat als auch an Kartoffeln notwendig, in denen die krankheitsunterdrückende Wirkung der Antagonisten in Abhängigkeit von der applizierten Keimzahl, des Applikationszeitpunktes und der Applikationshäufigkeit untersucht wird. Durch eine geeignete Formulierung kann die Effektivität der Antagonisten entscheidend beeinflusst werden.

#### 4 Literatur

- Baek J.M., Howell C.R., Kenerley C.M. 1999. The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* 35, 41-50.
- Berg G., Zachow C., Lottmann J., Götz M., Smalla K. 2005. Impact of soil type and plant species on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4203-13.
- Carling D.E., Leiner R.H. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathology* 80, 930-934.
- Chand T., Logan C. 1984. Post-harvest development of *Rhizoctonia solani* its penetration of potato tubers in North Ireland. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 82, 615-619.
- Elad Y., Chet I., Katan J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119-121
- Grosch R., Scherwinski K., Lottmann J., Berg G. 2006. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycol. Res.* 110, 1464-1474.
- Harman G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84, 377-393.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* 2, 43-56.
- Howell C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87, 4-10.
- Li Z., Pinson S.R.M., Marchetti M.A., Stansel J.W., Park W.D. 1995. Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Theor. Appl. Genet.* 91, 382-388.
- Mukherjee P.K., Mukhopadhyay A.N., Sarmah D.K., Shrestha S.M. 1999. Comparative antagonistic properties of *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* - its relevance to understanding the mechanisms of biocontrol. *J. of Phytopathol.* 143, 275-279.
- Opelt K., Berg G. 2004. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient – poor habitats of the Baltic Sea coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6569-6579.
- Vainio E.J., Hantula J. 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 104, 927-936.
- Weindling R., 1932. *Trichoderma linorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22, 837-845.

- Wolf P.F.J., Verreet J.-A. 1999. Untersuchungen zur Epidemiologie und Schadrelevanz der *Rhizoctonia*-Rübenfäule (*Rhizoctonia solani* Kühn). Gesunde Pflanzen 51 (5): 133-140.
- Woo S.L., Donzelli B., Scala F., Mach R., Barman G.E., Kubicek C.P., Del Sorbo G., Lorito M. 1999. Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. Mol. Plant-Microbe Interact. 12, 419-429.
- Yedida I., Benhamou N., Chet I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1061-1070.