

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2191/91

(22) Anmeldetag: 5.11.1991

(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.1993

(45) Ausgabetag: 25. 7.1994

(51) Int.Cl.⁵ : **C12N 1/14**
A01N 63/04, //(C12N 1/14,
C12R 1:885)

(56) Entgegenhaltungen:

DE-OS3904710 DE-OS3600394 US-PS4713342

(73) Patentinhaber:

LIGNOCELL HOLZ-BIOTECHNOLOGIE GESELLSCHAFT M.B.H.
A-8607 KAPFENBERG, STEIERMARK (AT).

(72) Erfinder:

MESSNER KURT DR.

(54) STÄMME DES PILZES TRICHODERMA, DARAUS HERGESTELLTES FUNGIZID, SOWIE VERFAHREN ZU DESSEN ANWENDUNG

(57) Ziel der Erfindung war die Selektion von Stämmen der Gattung Trichoderma mit Hemmwirkung gegen ein breites Spektrum holz- und pflanzenpathogener Pilze, die Entwicklung eines Fungizids sowie eines Verfahrens zu seiner Anwendung. Mit der Selektion von drei neuen Stämmen von Trichoderma: Trichoderma sp. LC 1, LC 2 und LC 3 wurden Pilze selektioniert, welche die wichtigsten Holzerstörer nach EN 113 vollständig hemmen. Weiters hemmen sie wichtige pflanzenpathogene Pilze. Ein auf dem Einsatz der drei Trichoderma Stämme beruhendes Fungizid wird erfindungsgemäß durch Sprühen, Tauchen oder in immobilisierter Form appliziert. Bei Applikation auf Holz ist eine Bebrütungsphase Teil der Erfindung.

Gegenstand der Erfindung ist jeweils ein Stamm der Pilze *Trichoderma* sp. LC 1-3, ein Fungizid, das sie enthält und als Holzschutzmittel oder Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden kann, sowie ein Verfahren zur Bekämpfung von Pilzen, welche Holz, lebende Bäume oder Pflanzen schädigen.

5 Holz wird, wenn es mehr als 20 % Feuchte enthält, von Pilzen befallen und geschädigt. Schutz vor Pilzbefall ist in der Gefährdungsklasse 2 (bei möglicher vorübergehender Befeuchtung), vor allem aber in den Gefährdungsklassen 3 (der Witterung und Kondensation ausgesetzt, aber nicht im Erdkontakt) und 4 (im dauernden Erdkontakt) erforderlich. Holzschäden können in Form von Fäulnis (Braun-, Weiß-, Moderfäule) oder als Verfärbung (Bläue) auftreten. Die intensivste Schädigung erfolgt durch die Braunfäulepilze (z.B. Hausschwamm).

10 Die Verwendung einiger der wirksamsten chemischen Holzschutzmittel wird derzeit von den Behörden als bedenklich betrachtet und in manchen Ländern verboten. Grund dafür ist ihre geringe Umweltverträglichkeit bei Auswaschung, vor allem aber bei der Entsorgung des Holzes. Ebenso wird der Einsatz einiger Pflanzenschutzmittel wegen ihrer schlechten Abbaubarkeit im Boden und der damit verbundenen Anreicherung in Frage gestellt.

15 Vertreter der Gattung *Trichoderma* kommen zahlreich im Boden vor und sind als natürliche Antagonisten verschiedener Pilzarten bekannt. Der Vorteil eines auf der Verwendung von *Trichoderma* beruhenden Fungizids besteht darin, daß die von *Trichoderma* gebildeten Hemmstoffe biogenen Ursprungs sind und daher bei Auswaschung in den Boden oder bei der Entsorgung von Altholz keine ökologischen Risiken bestehen. Sie sind im Boden biologisch abbaubar. Die chemische Natur der Hemmstoffe läßt den Schluß zu, daß bei Verbrennung keine toxischen Emissionen entstehen.

20 Von keinem der bisher in der Literatur beschriebenen oder patentierten und in Holzschutzmitteln verwendeten Stämme einer Art von *Trichoderma* wurde nachgewiesen, daß er imstande ist, alle in der Europäischen Norm EN 113 "Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit gegenüber holzerstörenden Basidiomyceten, die auf Agar wachsen" angeführten Teststämme vollständig zu hemmen. Weiters ist die Hemmwirkung dieser Stämme meist auf spezifische Pilze oder Pilzgruppen beschränkt (DE-OS 3904710, DE-OS 3600394). Der toxikologische Status dieser Pilze wurde außerdem nie definiert.

30 Ziel der Erfindung war es, wirksamere Stämme von *Trichoderma* sp. zu selektionieren, die außerdem gegen ein breites Spektrum von Schadpilzen anwendbar sind. Weiteres Ziel der Erfindung war es, Stämme zu selektionieren, die keine akute Toxizität aufweisen. Dieses Ziel wird erfindungsgemäß mit den Stämmen *Trichoderma* sp. LC 1, *Trichoderma* sp. LC 2 und *Trichoderma* sp. LC 3 erreicht (Beispiel 1). Sie wurden nach einer Kombination von Methoden, welche dem Stand der Technik entsprechen, selektioniert. Die Stämme *Trichoderma* LC 2 und *Trichoderma* LC 3 sind Biovarianten des Stammes *Trichoderma* sp. LC 1.

35 Die Stämme *Trichoderma* sp. LC 1, LC 2 und LC 3 wurden von der Anmelderin beim Centraalbureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, 3742 SK Baarn, Holland, gemäß dem Budapester Vertrag unter den Nummern CBS 595.91 = *Trichoderma* sp. LC 1, CBS 596.91 = *Trichoderma* sp. LC 2, CBS 597.91 = *Trichoderma* sp. LC 3 hinterlegt. Hinterlegungsdatum ist der 4. November 1991. Die erfindungsgemäßen Stämme wurden hinsichtlich ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften charakterisiert und gegen andere Stämme von *Trichoderma* abgegrenzt (Beispiel 9).

40 Die hinterlegten Stämme haben sich in normgerechten Tests als nicht akut toxisch erwiesen (Beispiel 2). Vertreter der Gattung *Trichoderma* werden vom NIH als nicht pathogen für Mensch und Tier gewertet.

45 Die hinterlegten Stämme üben im Normtest EN 113 eine vollständige Hemmung auf die Testpilze aus (Beispiel 3). Darüber hinaus hemmen die beiden Stämme andere, phytopathologische Pilze wie *Heterobasidion annosum* und *Armillaria mellea*, welche lebende Bäume über die Wurzeln befallen, Obstbaumschädlinge wie z.B. *Libertella blepharis*, ebenso weitere pflanzenpathogene Pilze wie z.B. *Ophiostoma ulmi*, *Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora* Arten und *Fusarium* Arten (Beispiel 1).

50 Aus der großen Anzahl gehemmter Schadpilze geht hervor, daß die Stämme *Trichoderma* sp. LC 1, LC 2 und LC 3 aufgrund ihrer starken Hemmwirkung gegen ein breites Spektrum von Pilzen und in vielen Anwendungsbereichen einsetzbar sind. Die Produktion eines einzigen Pilzstammes für mehrere Anwendungsbereiche führt, im Vergleich mit den bisher beschriebenen, nur spezifisch auf einzelne Pilze oder Pilzgruppen wirkenden Vertretern von *Trichoderma*, zu einem wesentlichen wirtschaftlichen Vorteil.

55 Das Fungizid enthält erfindungsgemäß koloniebildende Einheiten eines oder einer Kombination der Pilze *Trichoderma* sp. LC 1-3 in für die Hemmung ausreichender Konzentration. Als koloniebildende Einheiten werden vorzugsweise Sporen in Suspension mit einer Keimzahl von 10^4 - 10^8 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter eingesetzt. Mycelstücke können aber ebenfalls als koloniebildende Einheiten eingesetzt werden.

Mischungen des erfindungsgemäßen Fungizids mit anderen fungiziden oder nicht fungiziden Wirkstoffen wie z.B. Nährmedien, Puffer, Haftsubstanzen, Farben, UV-Schutzmitteln, Insektiziden, Akariziden, Herbiziden, Bakteriziden, Düngemitteln, Wachstumsregulatoren sind gegebenenfalls möglich. Die Kombina-

tion des erfindungsgemäßen Fungizids mit anderen Fungiziden in einer das Wachstum der erfindungsgemäßen Trichoderma Stämme nicht hemmenden Konzentration ist zur Erzielung einer synergistischen Wirkung prinzipiell möglich. Erfindungsgemäß können der fungizide Pilz und die Zusatzstoffe auch getrennt voneinander in mehreren Schritten appliziert werden.

- 5 Die möglichen Darreichungsformen des erfindungsgemäßen Fungizids können sein: Suspension, versprühbare Suspension, versprühbare Emulsion, Spritzpulver, emulgierbares Konzentrat, Granulat oder Mikrogranulat, Paste, Gel oder an Trägern wie Holz Agar- oder Alginat-Pellets immobilisiert.

- Enthält ein Fungizid erfindungsgemäß koloniebildende Einheiten des Pilzes Trichoderma sp. LC 3 in hemmender Konzentration, so kann aufgrund der nicht grünen, sondern weißen Sporen von Trichoderma
10 sp. LC 3 im Falle der Neubildung von Sporen an der Oberfläche von Holz keine grüne Verfärbung eintreten (Beispiel 4). Dies ist speziell bei Behandlung von Bläue auf Schnittholz, welches später weiterverarbeitet wird, von Bedeutung.

- Das Verfahren zur Bekämpfung von Pilzen in Holz ist dadurch gekennzeichnet, daß das erfindungsgemäße Fungizid durch Tauchen, Streichen oder Sprühen appliziert wird. Die Applikation kann auch in
15 Kombination mit anderen, zur Einbringung von Holzschutzmitteln gängigen Verfahren, wie z.B. dem Impfstichverfahren oder dem Vakuum-Druckverfahren, erfolgen. Bei Applikation des Fungizids auf Holz ist eine anschließende Bebrütung des behandelten Holzes bei Optimaltemperatur und hoher Luftfeuchte in einem Bebrütungsraum ein weiterer Teil des erfindungsgemäßen Verfahrens, um die Keimung der Sporen und das Einwachsen der Pilzhyphen in das Holz zu fördern (Beispiel 5).

- 20 Die Applikation des erfindungsgemäßen Fungizids kann weiters in einer der Darreichungsformen gegen Schadpilze in lebenden Bäumen erfolgen. An Stellen, die im Zuge einer holzpathologischen Diagnose ermittelt wurden, können Löcher gebohrt werden, durch die das Fungizid in das Stamminnere eingeführt wird (Beispiel 6).

- Das erfindungsgemäße Fungizid kann weiters an den Wurzeln von Bäumen oder im Wurzelraum von
25 Bäumen jeglichen Alters zu deren Sanierung appliziert werden (Beispiel 7).

- Weiters können zur Bekämpfung von Schadpilzen die Samen von Pflanzen mit dem erfindungsgemäßen Fungizid behandelt werden, oder dieses in hemmender Konzentration in die Erde eingebracht werden. Auf Stengeln oder Blättern wachsende Schadpilze wie Botrytis cinerea können durch Sprühen mit dem erfindungsgemäßen Fungizid bekämpft werden (Beispiel 8).

30 Biologische Beispiele

Herstellung der Sporensuspensionen:

- 35 2%iger Malzagar wurde zu 15 ml in sterile Petrischalen abgefüllt und mit Sporen oder Mycel der Pilze Trichoderma LC 1, LC 2 bzw LC 3 beimpft. Nach 2 Wochen Bebrütung bei 25 °C wurden die Sporen gewonnen, suspendiert und auf eine Keimzahl von 10^8 Sporen/ml verdünnt. Damit wurden sterilisierte, gequollene Gerstenkörner in 1 l Erlenmeyerkolben beimpft. Nach 2 Wochen wurden die neu auf den Getreidekörnern gebildeten Sporen suspendiert und Suspensionen mit einer Keimzahl von 10^4 , 10^6 bzw
40 10^8 Sporen/ml hergestellt.

Herstellung eines Fungizids aus dem sporenlosen Kolonietyp von Trichoderma LC 1:

- Ein 1 l Erlenmeyer Kolben wurde mit 350 ml Malzbouillon gefüllt, sterilisiert und mit 1 ml einer
45 Hyphensuspension des Pilzes beimpft. Nach einwöchiger Bebrütungsdauer (25 °C) am Schüttler wurde das Mycel steril abfiltriert, in sterilem Wasser aufgenommen und mit einem sterilen Labormixer zerkleinert. Die Suspension enthielt 10^6 koloniebildende Einheiten und diente als Fungizid.

Beispiel 1:

- 50 Laborprüfung auf gesteigerte Hemmwirkung der Trichoderma Stämme:

a) Untersuchung auf flüchtige Hemmstoffe im Doppelplattentest:

- 55 Testpilz: Sterile Petrischalen wurden mit je 15 ml Malzagar gefüllt und in der Mitte des Agars ein von einer lebenden Kultur von *Lentinus lepideus*, ein in Telegraphenmasten häufig vorkommender Schädling, ausgestochenes Agarplättchen mit 0.5 cm Durchmesser aufgelegt.
Trichoderma: In sterile Petrischalen wurden je 15 ml feuchtes Holzmehl eingefüllt und eben gestrichen.

Dieses wurde mit je 1 ml Sporensuspension der zu untersuchenden Stämme von *Trichoderma* beimpft. Testanordnung: Über den unteren Teil der *Trichoderma* Petrischalen wurde eine gasdurchlässige, sterile Folie gespannt, der untere Teil der Malzagar Petrischale mit dem Testpilz verkehrt auf die gespannte *Trichoderma* Petrischale gelegt und verklebt. Die von *Trichoderma* gebildeten gasförmigen Hemmstoffe diffundierten durch die Folie und hemmten den Testpilz *Lentinus lepideus*. Der nach 12 Tagen erreichte Koloniedurchmesser von *Lentinus lepideus* gibt die Hemmwirkung des untersuchten *Trichoderma* Stammes an.

	Hemmpilze	Durchmesser der Testpilzkolonie
Ergebnisse:	<i>Trichoderma harzianum</i> LC F34	9 cm
	<i>Trichoderma</i> sp. LC 1	5 cm
	<i>Trichoderma</i> sp. LC 2	0 cm
	<i>Trichoderma</i> sp. LC 3	4,5 cm

b) Laboruntersuchung auf antagonistische Hemmwirkung auf verschiedene Schadpilze:

2 %iger Malzagar wurde in einer Petrischale am Rand an 2 gegenüberliegenden Punkten mit je 0,5 cm großen Kolonieplättchen des Hemmpilzes bzw. des Testpilzes beimpft und 2 Wochen bebrütet. Die beiden Kolonien wuchsen aufeinander zu. Erfolgte keine antagonistische Wirkung, so kam das Wachstum der beiden Kolonien bei Berührung zum Stillstand (a). Bei schwacher Hemmwirkung wurde das Mycel des Testpilzes von *Trichoderma* überwachsen, sein Wachstum aber nicht abgebrochen (b). Bei starker Hemmwirkung wurde das Mycel des Testpilzes von *Trichoderma* überwachsen, das Mycel kollabierte, und an der Unterseite erfolgte häufig dunkle Pigmentierung (c). Als Vergleichspilz wurde ein Stamm der Art *Trichoderma harzianum*, die als antagonistisch gilt, herangezogen.

	T.h. LC F34	T.sp. LC 1	T.sp. LC 2	T.sp. LC 3
<i>Lentinus lepideus</i>	b	c	c	c
<i>Coniophora puteana</i>	a	c	c	c
<i>Serpula lacrimans</i>	a	c	c	c
<i>Armillaria mellea</i>	b	c	c	c
<i>Heterobasidion annosum</i>	a	c	c	c
<i>Ophiostoma ulmi</i>	b	c	c	c
<i>Libertella blepharis</i>	a	b	c	b
<i>Botrytis cinerea</i>	a	b	c	b
<i>Fusarium oxysporum</i>	b	c	c	c
<i>Phytophthora cactorum</i>	b	c	c	c

c) Laboruntersuchung auf antagonistische Hemmwirkung auf pflanzenpathogene Pilze:

Dieser Test drückt die Fähigkeit eines Pilzes aus, sich gegen einen Pflanzenschädling in direkter Gegenüberstellung der Mycelien durchzusetzen. Das Maß für diese Fähigkeit wird in % des in der Bebrütungszeit überwachsenen Koloniedurchmessers angegeben.

Durchführung:

Im Gegensatz zu Versuch 1b wurde ein für Pflanzenschädlinge günstiges Nährmedium, nämlich Haferflockenagar (30 g Haferflocken, 15 g Agar-Agar, 1 l Wasser), gewählt und zu je 15 ml in Petrischalen gegossen. Je ein Pflanzenschädling und ein *Trichoderma* Stamm wurden als Antagonisten an 2 gegenüberliegenden Punkten am Rande der Petrischale aufgeimpft. Schnell wachsende Schadpilze (*Athelia rolfsii*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*) wurden gleichzeitig mit *Trichoderma* aufgeimpft, während den übrigen, langsamer wachsenden Pilzen *Trichoderma* erst dann gegenübergestellt wurde, wenn das Mycel nahezu die Plattenmitte erreicht hatte. Die Platten wurden 1 Woche bei 25 ° C bebrütet. Danach wurde

AT 397 811 B

gemessen, wie weit Trichoderma den Schadpilz überwachsen hatte und der Wert in % des gesamten Koloniedurchmessers angegeben. Überwuchs Trichoderma den Schadpilz, so sind die Werte mit dem Vorzeichen "+" angegeben, in Fällen, wo der Schadpilz Trichoderma überwuchs, erfolgten die Angaben mit dem Vorzeichen "-". Die Hemmungsaktivität der Testpilze wurde als Mittelwert der Hemmwirkungen

5 gegen die 11 untersuchten Pflanzenschädlinge angegeben.

Testpilze: Trichoderma harzianum LC 1 (Lignocell)
Trichoderma harzianum LC 2 (Lignocell)
Trichoderma harzianum T-315 (Yissum)

Ergebnisse in % Überwachsen des Durchmessers einer

10 Pilzkolonie durch den gegenüberliegenden Pilz.

+) Trichoderma überwächst Pflanzenschädling.

-) Pflanzenschädling überwächst Trichoderma.

15

	LC 1	LC 2	T-315 Yissum
Phythium aphanidermatum	+100	+100	-7
Phythium ultimum var. ultimum	+100	+100	-45
Phytophthora cactorum	----	+100	+100
Fusarium oxysporum	+70	+58	0
20 Fusarium moniliforme	+50	+100	+38
Fusarium solani	+57	+55	0
Microdochium nivale	+100	+100	+54
Botrytis fabae	+100	+100	+100
Athelia rolfsii	+100	+7	+90
25 Phaeosphaeria nodorum	+100	+100	+17
Phomopsis sclerotoides	+100	+100	0
durchschnittliche Hemmwirkung	88%	84%	31%

30

Beispiel 2:

Toxizität einer Sporensuspension von Trichoderma sp. LC 1 mit 10^8 - 10^{10} Sporen/ml: (Durchgeführt vom Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Hamburg, BRD)

35 Akute orale Toxizitätsstudie an Ratten: keine Unverträglichkeitsreaktion
Akute dermale Toxizitätsstudie an Ratten: keine Unverträglichkeitsreaktion
Akute Hautverträglichkeitsprüfung an Kaninchen: keine irritierenden Eigenschaften
Akute Augenirritationsstudie an Kaninchen: keine irritierenden Eigenschaften
Hautsensibilisierungstest am Meerschweinchen: keine sensibilisierenden Eigenschaften
40 Ames-Test: keine mutagene Wirkung

Beispiel 3:

45 EN 113: Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit von Trichoderma sp. LC 1 gegenüber holzerstörenden Basidiomyceten, die auf Agar gezüchtet werden: (in % Hemmwirkung)

Die Testholzklotzchen wurden mit Sporensuspensionen von Trichoderma sp. LC 1 getränkt, bebrütet und normgemäß auf die vorkultivierten Testpilze aufgebracht.

50

	10^4 Sporen/ml	10^6 Sporen/ml	10^8 Sporen/ml
Lentinus lepideus	100 %	100 %	100 %
Serpula lacrimans	100 %	100 %	100 %
Gloeophyllum trabeum	100 %	100 %	100 %
Poria placenta	100 %	100 %	100 %
55 Coniophora puteana	100 %	100 %	100 %

Beispiel 4:

Einsatz von *Trichoderma* sp. LC 3 zur Bläuebekämpfung:

- 5 Von *Trichoderma* sp. LC 3 wurde wie oben beschrieben eine Sporensuspension in einer Konzentration von 10^8 Sporen/ml hergestellt und diese mit Nährmedium versetzt. Kiefernurniere aus Splintholz von 4x4 cm wurden in die fungizide Lösung getaucht und in sterilen Petrischalen bei 25 °C bebrütet. Nach 2 Wochen war *Trichoderma* sp. LC 3 intensiv angewachsen, aber mit dem freien Auge nicht erkennbar, da die Sporen dieses Pilzes weiß und nicht grün, wie die der anderen *Trichoderma* Stämme sind.
- 10 Die bewachsenen Furniere wurden mit einer Sporensuspension von *Aureobasidium pullulans*, einem Bläuepilz, beimpft.

Ergebnis:

- 15 Behandelte Furniere zeigten keine Färbung durch *Trichoderma* und nur leichte Färbung durch *Aureobasidium*. Unbehandelte Furniere wiesen deutliche Blaufärbung auf.

Beispiel 5:

- 20 a) Behandlung von Holzstämmen mit einer Sporensuspension von *Trichoderma* sp. LC 1 durch Tauchen:

- Stämme aus Kiefernholz von 1 m Länge und ca 20 cm Durchmesser wurden erfindungsgemäß mit einer Suspension, bestehend aus 10^8 Sporen/ml und zugesetzten Nährstoffen getaucht, danach 3 Wochen bei einer Temperatur von 25 °C und einer relativen Luftfeuchte von 90 % bebrütet. 5 Stämme wurden bei
- 25 Raumklima gelagert und weitere 5 Stämme wurden im Garten gemeinsam mit 5 unbehandelten Stämmen von Frühjahr bis Herbst 8 Monate am Boden liegend der Witterung exponiert. Nach 8 Monaten wurden die Stämme optisch beurteilt, mikroskopisch untersucht und Pilze aus dem Holz mikrobiologisch isoliert und nachgewiesen.

- 30 b) Behandlung von Holzstämmen mit einer Sporensuspension von *Trichoderma* sp. LC 1 bzw. einer Mycelsuspension des sporenlosen Kolonietyps von LC 1 durch Vakuum-Druckimprägnierung:

- Stämme aus Kiefernholz von 1 m Länge und ca 20 cm Durchmesser wurden erfindungsgemäß mit einer Suspension bestehend aus 10^8 Sporen/ml bzw. einer Hyphensuspension mit 10^6 koloniebildenden
- 35 Einheiten ohne Zusatz von Nährstoffen in einer Imprägnieranlage nach dem Stand des Wissens einer Vakuum-Druckimprägnierung ausgesetzt. Danach wurden die Stämme bei 25 °C 2 Wochen lang einem Bebrütungsschema mit wechselnden Luftfeuchten ausgesetzt. Die weitere Vorgangsweise erfolgte wie unter a).

- 40 Ergebnis:

Trichoderma sp. LC 1 behandelt, bei Raumklima gelagert:

- Leichte Verblauung an der Oberfläche, sonst keine optischen Veränderungen. Mikroskopie: Pilzhyphen
- 45 in Splint und Kern zu beobachten. Mikrobiologische Isolation: *Trichoderma* sp. LC 1 in Splint- und Kernholz nachweisbar.

Trichoderma sp. LC 1 behandelt, im Freien gelagert:

- 50 Mittlere Verblauung an der Oberfläche, sonst keine optischen Veränderungen. Mikroskopie: Pilzhyphen in Splint und Kern zu beobachten. Mikrobiologische Isolation: *Trichoderma* sp. LC 1 in Splint- und Kernholz nachweisbar, wenige andere Schimmelpilze.

Unbehandelt, im Freien gelagert:

- 55 Starke Verblauung an der Oberfläche, bräunliche Verfärbungen an der Stirnfläche, im Inneren Anzeichen beginnender Braunfäule. Mikroskopie: Verschiedene Pilzhyphen in Splint und Kern zu beobachten, ebenso Schnallenmycelien von Basidiomyceten. Mikrobiologische Isolation: Besonders im Bereich der

Stirnseite zahlreiche Schimmelpilze, darunter Bläuepilze. 5 verschiedene Arten von holzerstörenden Basidiomyceten, darunter mittels Bavendam Test 3 Braunfäulepilze identifiziert.

Beispiel 6:

5

Behandlung von Apfelbäumen der Sorte McIntosh mit einem Fungizid, welches *Trichoderma* sp. LC 1 und LC 2 enthielt.

Je 500 ml Sporensuspension des Stammes LC 1 und LC 2 wurden zu 1 l Suspension mit einer Konzentration von 10^8 Sporen/ml vereinigt. Darin wurden sterile Birkenholzstäbe, die zuvor mit Malzbouillon als Nährmedium getränkt wurden und einen Durchmesser von 5 mm aufwiesen, getaucht. Diese wurden anschließend bei 25 °C und 90 % RH 2 Wochen bebrütet.

Zur Bekämpfung des als Schädling identifizierten Pilzes, *Libertella blepharis*, wurde die Oberfläche von Ästen an 5 Stellen, wo elliptische Verfärbungszonen - das typische Erscheinungsbild dieser Pilzerkrankung - an der Borke auftraten, mit Alkohol sterilisiert. Danach wurden um die Verfärbungsränder radial zum Stamm 6 Löcher mit 5 mm Durchmesser gebohrt. Die bewachsenen Holzstäbe wurden vor der Applikation in 1,5 %igen Malzagar getaucht und in die Bohrungen inseriert. Die Oberfläche der Bohrung wurde mit Silikonmasse verstrichen. Die 5 behandelten Äste wurden mit 5 nicht behandelten Schadstellen verglichen. Der Beobachtungszeitraum betrug eine Vegetationsperiode.

20 Ergebnis:

Fortschreiten der Verfärbungsränder pro Vegetationsperiode:

25

Unbehandelte Äste	$6,4 \pm 1,5$ cm
Behandelte Äste	$1,9 \pm 0,4$ cm

Damit konnte das Fortschreiten der Krankheit in der ersten untersuchten Vegetationsperiode um 70 % reduziert werden.

Beispiel 7:

Bekämpfung des Wurzelschwammes *Heterobasidion annosum* im Wurzelraum mit einem Fungizid, welches *Trichoderma* sp. LC 2 und LC 2 enthielt.

Der Basidiomycet *Heterobasidion annosum* wurde auf Petrischalen mit 15 ml Malzagar kultiviert. Nach 3 Wochen wurden die Kolonien von 40 Petrischalen gemeinsam mit dem Agar im Sterilmixer zerkleinert und mit 10 Liter Leitungswasser verdünnt. In 10 Gefäßen wurden je 30 l Erde mit 1 Liter Mycelsuspension beimpft. Die Erde von 5 Gefäßen wurde weiters mit je 1 Liter Sporensuspension von *Trichoderma* sp. LC 2 in einer Konzentration von 10^8 Sporen/ml beimpft, während 5 Gefäße unbeimpft blieben. In jedes Gefäß wurde eine Fichte mit etwa 50 cm Höhe nach guter Durchmischung des Wurzelballens mit der Erde gesetzt. Nach 8 Monaten wurden die Bäumchen aus der Erde genommen und die Wurzeln mikroskopisch und durch Kultivation auf Manifestierung von *Heterobasidion annosum* an den Wurzeln untersucht.

45 Ergebnis:

Unbehandelte Erde:

An den Wurzeln aller Bäumchen war *Heterobasidion* nachzuweisen.

50

Mit Fungizid behandelte Erde:

Die Wurzeln von 3 Bäumchen waren frei von *Heterobasidion*, bei den übrigen war bei mikrobiologischen Isolationsversuchen die Häufigkeit des Auftretens um 60 % reduziert.

55

Beispiel 8:

Behandlung von Tomatenpflanzen mit einem Fungizid, welches *Trichoderma* sp. LC 1 enthält, gegen den Stammfäuleerreger *Botrytis cinerea*.

- 5 Ein Fungizid, erfindungsgemäß eine Sporensuspension von *Trichoderma* sp. LC 1 in einer Konzentration von 10^8 Sporen/ml enthaltend, wurde in einem Glashaus mit kontrollierten Klimabedingungen auf Tomatenpflanzen gesprüht. Es wurden 50 behandelte Pflanzen mit 50 nicht behandelten Pflanzen verglichen.

10 Ergebnis:

Unter den nicht behandelten Pflanzen wiesen 8 Pflanzen Stammfäule durch *Botrytis cinerea* auf. Die Infektionsrate unter den mit dem erfindungsgemäßen Fungizid behandelten Pflanzen war deutlich geringer und betrug 2 infizierte Pflanzen.

15

Beispiel 9:

Charakterisierung der Patentstämme:

- 20 Die Stämme LC 1 und LC 2 wurden vom Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holand, als *Trichoderma harzianum* und der Stamm LC 3 als *Hypocrea pilulifera* bestimmt. *Hypocrea pilulifera* und *Trichoderma harzianum* sind derselbe Organismus, *Hypocrea pilulifera* ist nur die Bezeichnung für die sexuelle Vermehrungsform.

- 25 *Trichoderma* sp. LC 1 ist außer den in der systematischen Literatur für *Trichoderma harzianum* beschriebenen morphologischen Eigenschaften, morphologisch zusätzlich dadurch charakterisiert, daß der Stamm bei langer Bebrütungsdauer, bei 25 °C auf Malzagarplatten, in zwei zusätzliche Kolonietypen aufspaltet. Es handelt sich dabei um eine sehr langsamwüchsige, bräunlich gefärbte und eine weiße, sporenlose Kolonie, deren Wachstumsgeschwindigkeit gleich ist wie die von LC 1.

- 30 Die sporenlose Kolonie übt auf Holz die gleiche Hemmwirkung gegen holzerstörende Pilze aus wie die grüne Ausgangskolonie. Sie revertiert bei weiteren Überimpfungen nicht mehr zum grünen Ausgangsstamm. Bei Verwendung dieses weißen, sporenlosen Kolonietyps zum Schutz von Holz ergibt sich der Vorteil, daß eine eventuelle grüne Schimmelbildung an der Holzoberfläche, wie sie bei sporenbildenden Stämmen unter besonderen Umständen eventuell auftreten kann, ausgeschlossen ist. Diese Eigenschaft unterscheidet *Trichoderma* sp. LC 1 von allen bisher beschriebenen Stämmen.

- 35 Daß es sich bei den 3 Kolonietypen von *Trichoderma harzianum* LC 1 nicht um eine Mischkultur handelt, wurde dadurch bewiesen, daß sie im anschließend beschriebenen DNA-Fingerprinting die gleichen Bandenmuster aufwiesen.

- 40 Die morphologischen und physiologischen Unterschiede zwischen Stämmen derselben Art sind meist sehr gering und eine Unterscheidung und Charakterisierung verschiedener Stämme dadurch nur schwer möglich. Um eine klare Abgrenzung der Lignocell Stämme von anderen Stämmen durchführen zu können, wurde eine moderne genetische Methode, das "DNA-Fingerprinting" angewandt.

Das Prinzip dieser Methode ist wie folgt:

- 45 DNA der Teststämme wird isoliert, mit einem Endonuclease-Enzym an spezifischen Stellen in Fragmente unterschiedlicher Längen geschnitten, diese auf einem Gel nach Größe aufgetrennt und mit markierten Oligonucleotiden hybridisiert. Identische Stämme ergeben ein identisches Bandenmuster, unterschiedliche Stämme unterscheiden sich in einer oder in mehreren Banden.

- 50 *Trichoderma* LC 1 wurde mit *Trichoderma harzianum* T-315 (=ATCC 20671) und 2 anderen Stämmen der Art *Trichoderma harzianum* verglichen. Alle Stämme sind reproduzierbar im Bandenmuster voneinander zu unterscheiden (Siehe Fig. 1).

Durch Verwendung verschiedener Endonuclease / Oligonucleotid Kombinationen können auch die durch die Strahlungsbehandlung veränderten Genome der Biovarianten LC 1, LC 2 und LC 3 voneinander unterschieden werden, nicht aber die aufgespalteten Kolonietypen von LC 1.

55

Fig. 1 zeigt ein PCR-Fingerprint von verschiedenen *Trichoderma* Stämmen:

Als Primer wurden die Oligonucleotide (GTG)₅ und M13 verwendet.

Untersuchte Stämme:

Trichoderma sp. LC 1 (Lignocell)
Trichoderma harzianum T-315 (Yissum)
5 Trichoderma viride ATCC 20476
Trichoderma harzianum ATCC 38042

Ergebnis:

- 10 Alle untersuchten Stämme unterscheiden sich klar in ihren Bandenmustern. Sowohl mit (GTG)5 als auch mit M13 als Primer ist der Stamm Trichoderma sp. LC 1 (Lignocell) vom Stamm Trichoderma harzianum T-315 (Yissum) zu unterscheiden.

Patentansprüche

15

1. Pilz Trichoderma sp. LC 1, CBS 595.91

2. Pilz Trichoderma sp. LC 2, CBS 596.91

20

3. Pilz Trichoderma sp. LC 3, CBS 597.91

4. Fungizid, enthaltend eine fungizide Menge eines der oder einer Kombination der Pilze des Stammes Trichoderma nach den Ansprüchen 1 bis 3.

25

5. Verfahren zur Bekämpfung von Pilzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine fungizid wirksame Menge der Pilze des Stammes Trichoderma nach den Ansprüchen 1 bis 3, einzeln oder in Kombination, auf die vor Pilzbefall zu schützenden Hölzer oder Pflanzen vorbeugend oder zur Behandlung eines bereits erfolgten Befalles einwirken läßt.

30

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß vor Pilzbefall zu schützende Hölzer nach Behandlung mit dem Fungizid bebrütet werden.

35

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Trichoderma sp. LC 1, LC 2 und/oder LC 3 in einer Konzentration von 10^4 - 10^{10} koloniebildenden Einheiten je ml Sporensuspension anwendet.

Hiezu 1 Blatt Zeichnungen

40

45

50

55

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Patentschrift Nr. AT 397 811 B

Ausgegeben

25. 7.1994

Int. Cl.⁵: C12N 1/14

A01N 63/04, //(C12N

Blatt 1

1/14,

C12R 1:885)

Fig. 1

