

Molekulare Identifizierung der Fäulepilze im Holz von Stadtbäumen

Molecular identification of rot fungi in the wood of urban trees

von Olaf Schmidt, Oliver Gaiser und Dirk Dujesiefken

Zusammenfassung

Stadtbäume sind wichtig für die Bevölkerung und das Stadtklima, sie sind jedoch auch anfällig für Fäulepilze. Für die Abschätzung des Fäulnisverlaufes und für eine Risikobewertung ist ein sicheres und rasches Erkennen des Schaderregers nötig, auch wenn keine Pilzfruchtkörper vorhanden sind. Um im befallenen Holz einen Pilz bestimmen zu können, wurden zunächst Fruchtkörper gesammelt, mit herkömmlichen Methoden 36 Pilze bestimmt, ihre DNS extrahiert, der rDNS-ITS-Bereich mit der PCR vermehrt und sequenziert. Zur Diagnose eines Pilzes im Bauminneren wurde aus befallenen Bereichen die gesamte DNS (Baum und Pilz) extrahiert, mittels PCR selektiv der pilzliche ITS vermehrt und ebenfalls sequenziert. Die Pilzdiagnose erfolgt durch Datenvergleich mit den Fruchtkörper-Sequenzen. Die Erprobung der Technik an 10 Bäumen zeigte ihre Eignung zur sicheren und raschen Diagnose eines Fäulnispilzes im Holz von Stadtbäumen.

Summary

Urban trees are valuable e. g. for the population and the climate in urban areas. However, they are susceptible to rot fungi. For an assessment of the rot development and of possible hazards, a molecular technique was used to identify the causal agents of wood rot in urban trees. Fruit bodies of wood decay fungi were sampled from infected trees. Thirty-six species were identified by traditional methods. DNA of fruit bodies was extracted, the ITS-rDNA amplified by PCR and the ITS-region sequenced. Wood samples from ten infected urban trees were collected, the entire DNA (tree and fungus) extracted from affected wood parts, and fungal ITS amplified and sequenced. Fungal species identity is detectable by sequence comparison with the data collection from the fruit bodies. The technique has been proven to provide sure and rapid identification of causal rot fungi within the wood of trees.

1 Einleitung

Stadtbäume sind u. a. wichtig für die Gesundheit und das allgemeine Wohlbefinden der Bevölkerung sowie für das Stadtklima, sie sind jedoch auch anfällig für Fäulepilze (Abbildung 1; RAYNER & BODDY 1988; BUTIN 1995; LONSDALE 1999; SCHWARZE et. al 2004; SINCLAIR & LYON 2005). Die Arbeiten zu den Wundreaktionen der Bäume (SHIGO 1990; DUJESIEFKEN & LIESE 2008) sowie über Fäulnis und Schadensanalyse (MATHENY & CLARK 1944; WEBER & MATTHECK 2003) haben die Bedeutung eines Fäulnisnachweises und der Identifizierung der

beteiligten Pilze aufgezeigt. Auch bei Gerichtsverfahren kann die Kenntnis des Schadpilzes wichtig sein. Wenn die Stand- oder Bruchsicherheit eines Baumes nicht mehr gegeben ist, kann dies zu Sach- und Personenschäden führen.

Die Bestimmung des holzerstörenden Pilzes an bzw. in einem Baum ist aus mehreren Gründen sinnvoll. Für Baumkontrolleure und Sachverständige ist es wichtig zu beurteilen, wie schnell sich die Fäule im Baum ausbreiten wird. Dies hängt sehr vom Pilz-Wirt-Verhältnis ab. Die Baumart ist meist problemlos zu



Abbildung 1: Stadtbaum nach starker Schädigung mit Brautfäule im Kernholz der Eiche und jährlichen Fruchtkörpern des Schwefelporlings *Laetiporus sulphureus* (Foto: T. HUCKFELDT)



Abbildung 2: Fruchtkörper vom Riesenporling *Meripilus giganteus* am Wurzelanlauf einer Buche nach Verletzung im Wurzelbereich



Abbildung 3: Fruchtkörper vom Sparrigen Schüppling *Pholiota squarrosa*

bestimmen, die Pilzart hingegen nicht immer einfach zu erkennen. Das Pilz-Wirt-Verhältnis spielt auch bei der Beurteilung der Verkehrssicherheit, bei den notwendigen baumpflegerischen Maßnahmen und bei der Einschätzung der verbleibenden Lebenserwartung des Baumes eine wichtige Rolle. So ist beispielsweise der Befall einer Rot-Buche mit dem Riesenporling (Abbildung 2) meist problematischer als der Befall mit dem Sparrigen Schüppling (Abbildung 3) (LICHTENAUER et al. 2008).

Wenn Bäume Sach- oder Personenschäden verursachen, kann es vor Gericht wichtig sein, den holzerstörenden Pilz zu ermitteln, der die Verkehrssicherheit

beeinträchtigt und somit zum Schaden geführt hat. Bei einer Verhandlung ist entscheidend, ob der Schaden vorhersehbar war oder nicht. Da Pilze zu unterschiedlichen Jahreszeiten Pilzfruchtkörper bilden, können bei einer Baumkontrolle im Sommer z. B. Fruchtkörper des Schuppigen Porlings, aber nicht vom Austernseitling gefunden werden.

Da auch bei umfangreich befallenen Bäumen Fruchtkörper des verursachenden Pilzes häufig nicht vorhanden sind, soll mit dieser Arbeit eine sichere und schnelle Methode zur Pilzdiagnose über eine molekulare Identifizierung erarbeitet werden.

2 Stand des Wissens

Traditionell werden Fäulnispilze an Hand ihrer Fruchtkörper und weiterer Merkmale bestimmt. Fruchtkörper oder Rhizomorphen (Abbildung 4) sind jedoch oft nur sporadisch oder bei fortgeschrittenem Befall vorhanden. Bei ihrem Fehlen kann die Lokalisierung des Schadens (Wurzel, Stamm, Kronenbereich) Hinweise auf den Schaderreger geben. Proben aus dem Bauminneren können über eine offene Wunde (Abbildung 5) als Späne, mit einem Zuwachsbohrer bzw. anderen Bohrverfahren (GUGLIEMO et al. 2010) genommen und daraus der Fäulnispilz isoliert, gereinigt (siehe Abbildung 8) und identifiziert werden. Reinkultivierung und Identifizierung eines Pilzes brauchen jedoch Zeit, sind recht komplex und manchmal unmöglich. Zwar gibt es Bestimmungsschlüssel für makro- und mikroskopische sowie physiologische Merkmale (NOBLES 1965; STALPERS 1978; LOMBARD & CHAMURIS 1990), doch versagen die Schlüssel bei nahe verwandten Arten häufig wegen unzureichender Unterschiede zwischen den Pilzen (STALPERS 1978). Selten, wie bei dem Arten-Komplex „Wurzelschwamm, Rotfäule“ durch *Heterobasidi-*

on annosum s. l., können die in Frage kommenden Arten (*H. annosum* s.s., *H. parviporum*, *H. abietinum*) durch zeitaufwändige Kreuzungsversuche mit definierten Testerstämmen erkannt werden (NIEMELÄ & KORHONEN 1998; ASIEGBU et al. 2005).

Seit den 1980er-Jahren werden molekulare Techniken zur Identifizierung von Pilzen an Bäumen und Holz erprobt und verwendet. Auf den Proteinen der Pilze beruhende Methoden sind die SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese; VIGROW et al. 1991; SCHMIDT & KEBERNIK 1989) und verschiedene immunologische Verfahren (JELLISON & GOODELL 1988; PALFREYMAN et al. 1988; CLAUSEN 1997), die jedoch keine Praxisreife erreichten. Hinsichtlich der DNS der Baum- und Holzpilze wurden mehrere Techniken erarbeitet: So sind die RAPD-Methode (Random amplification of polymorphic DNA) (SCHULZE et al. 1997; SCHMIDT & MORETH 1998), die AFLP-Technik (Amplified fragment length polymorphism) und die Mikrosatelliten-Analyse (TERASHIMA et al. 2002; KAUSERUD et al. 2007) eher zur Charakterisierung verschiedener Stämme innerhalb einer Pilzart geeignet.



Abbildung 4: Rhizomorphen des Hallimaschs an *Fraxinus excelsior*



Abbildung 5: Inspektion und Probenentnahme aus einer großen Wunde an *Tilia* sp.

Zur Unterscheidung und Identifizierung von Arten und Gattungen wird häufig die ribosomale DNS (rDNS) und hierbei speziell ihr ITS-Bereich (Internal transcribed spacer) verwendet. Mittels so genannter PCR-Standard-Primer (Startmoleküle für die Polymerasekettenreaktion; u. a. WHITE et al. 1990; GARDES & BRUNS 1993), die an die DNS vieler Arten passen, wurden zahlreiche Baum- und Holzpilze untersucht. Der mit der PCR vermehrte ITS-Bereich lässt sich mit Enzymen (Restriktionsendonukleasen) zu RFLP's (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen) zerschneiden und liefert dadurch auf einem Elektrophoresegel Pilzart-typische Bandenmuster (SCHMIDT & MORETH 1999; ZAREMSKI et al. 1999; ADAIR et al. 2002; KRABEL & HOPPE 2009). Verschiedene Methoden nutzen die Information der Basenfolge (Sequenz) des ITS-Bereiches zur Unterscheidung von Pilzen: die SSPP-Technik (Species-specific priming PCR; GARBELOTTO et al. 1996; SCHULZE & BAHNWEIG 1998; MORETH & SCHMIDT 2000; HORISAWA et al. 2009; GUGLIELMO et al. 2007, 2010), DNS-Chips (Microarrays; JACOBS et al. 2010) sowie die Sequenzierung der gesamten Basenfolge. Sowohl SSPP als auch DNS-Chips können jedoch nur ein begrenztes Spektrum verschiedener Pilze erfassen.

Für eine sichere Identifizierung der Vielfalt von möglichen Pilzen an Stadtbäumen wurde die Sequenzierung des ITS-Bereiches verwendet, die im Gegensatz zu allen anderen DNS-basierenden Bestimmungsmethoden als einzige Technik jeden x-beliebigen Pilz identifizieren kann. Die ITS-Sequenzierung wurde und wird zunehmend zur Arterkennung von Baum- und Holzpilzen eingesetzt (JOHANNESON & STENLID 1999; SCHMIDT & MORETH 2002; GLAESER & LINDNER 2010).

3 Material und Methoden

3.1 Erstellen einer Sammlung von ITS-Sequenzen von Baumpilzen

Für den Aufbau einer eigenen Sammlung von ITS-Sequenzen von Baumpilzen wurden von befallenen Stadtbäumen Fruchtkörper von 36 häufigen und auch seltenen Pilzarten gesammelt (Tabelle 1), da die DNS-Datenbanken Fehler enthalten können, besonders wenn Sequenzen mit verschiedenen Pilznamen oder gar falsch bestimmten Pilzarten verbunden sind.

Die gesammelten Fruchtkörper wurden zunächst nach herkömmlichen makro- und mikroskopischen Merkmalen identifiziert (BREITENBACH & KRÄNZLIN 1986; RYVARDEN & GILBERTSON 1993, 1994; KRIEGLSTEINER 2000; JAHN et al. 2005). Hinsichtlich der Benennung der Pilze wurde der Index Fungorum (www.indexfungorum.org/Names/Names.asp) benutzt. Für die molekulare Identifizierung wurden etwa 20 mg Mycel mit einer flambierten Pinzette aseptisch aus dem Inneren der aufgebrochenen Fruchtkörper entnommen. Ihre DNS wurde in einem sterilen Mörser mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die 1. und 2. Extraktion sowie weitere 1:50- und 1:2.500-Verdünnungen wurden mittels PCR im PTC-100-Thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) mit dem Qiagen Taq Core Kit amplifiziert. Der vorwärts-Primer 18 (CGCTACTACCGATTGAATG) war von der Sequenz des 18S rDNS-Gens von Hausfäule-Basidiomyceten (MORETH & SCHMIDT 2005) abgelesen worden. Der rückwärts-Primer ITS4m ist der geringfügig modifizierte ITS4-Primer (erstes T wegen gleicher Annealingtemperatur entfernt) von WHITE et al. (1990). PCR-Parameter waren eine Anfangsdenaturierung von 4 min bei 98 °C, 35 Zyklen von 30 s bei 94 °C zur Denaturierung, 30 s bei 52 °C zum Annealing, 1 min bei 72 °C zur Extension sowie eine Schluss-Extension von 7 min bei 72 °C.

Aliquote der PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch in 2 % Agarose-Gelen (DNA Agarose, Biozym, Hess. Oldendorf) mit dem Mupid-exU system (Advance, Tokyo, Japan) untersucht. Die Gele wurden mit GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Cambrex, Rockland, ME, USA) reagenziert und über UV-Licht fotografiert. Zur Sequenzierung geeignete PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und dann von Eurofins MWG (Ebersberg) in beiden Richtungen sequenziert. Die Zugriffsnummern der bei EMBL deponierten Sequenzen sind in der Tabelle 1 genannt.

3.2 Erproben der molekularen Identifizierungstechnik von Fäulepilzen aus dem Holz von Bäumen

Die Baumproben zur Identifizierung von verursachenden Fäulepilze wurden in verschiedenen deut-

Tabelle 1: Von Fruchtkörpern auf Stadtbäumen identifizierte Pilze mit Herkunft und ITS-Sequenz-Zugriffsnummer

Pilzart	Baumart	Ort	Proben- nahme	ITS-Zugriffs- nummer
<i>Armillaria gallica</i> MARXM. & ROMAGN.	<i>Fagus sylvatica</i>	Leer	Dez-09	FR686548
<i>Armillaria mellea</i> (VAHL.) P. KUMM.	<i>Quercus robur</i>	Rheinsberg	Okt-09	FR686549
<i>Daedalea quercina</i> (L.) PERS.	<i>Quercus robur</i>	Perdöl	Sep-09	FR686550
<i>Daedaleopsis confragosa</i> (Bolton) J. SCHRÖT.	<i>Salix alba</i>	Schenefeld	Dez-09	FR686551
<i>Fomes fomentarius</i> (L.) J. KICKX f.	<i>Betula</i> sp.	Kröpelshagen	Sep-09	FR686552
<i>Fomitoporia mediterranea</i> M. FISCH.	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Krefeld	Mai -10	FR686553
<i>Fomitopsis pinicola</i> (SW.) P. KARST.	<i>Acer platanoides</i>	Hamburg	Sep-09	FR686554
<i>Ganoderma australe</i> (FR.) PAT.	<i>Abies nordmannia</i>	Alften	Mai -10	FR686555
<i>Ganoderma applanatum</i> (FR.) PAT.	<i>Tilia</i> sp.	Hamburg	Okt-09	FR686556
<i>Grifola frondosa</i> (DICKS.) GRAY	<i>Quercus rubra</i>	Hamburg	Okt-09	FR686557
<i>Gymnopus fusipes</i> (BULL.) GRAY	<i>Quercus robur</i>	Bramsche	Dez-09	FR686558
<i>Heterobasidion annosum</i> (FR.) BREF.	<i>Picea abies</i>	Kröpelshagen	Sep-09	FR686559
<i>Hypholoma fasciculare</i> (HUDS.) P. KUMM.	<i>Quercus robur</i>	Bramsche	Dez-09	FR686560
<i>Hypsizygus ulmarius</i> (BULL.) REDHEAD	<i>Ulmus</i> sp.	Rheinsberg	Okt-09	FR686561
<i>Inonotus hispidus</i> (BULL.) P. KARST.	<i>Malus</i> sp.	Weinstadt	Jul-10	FR686562
<i>Inonotus radiatus</i> (SOWERBY) P. KARST.	<i>Alnus glutinosa</i>	Reinbek	Nov-09	FR686563
<i>Ischnoderma benzoinum</i> (WAHLENB.) P. KARST.	<i>Fagus sylvatica</i>	Reinbek	Mär-10	FR686564
<i>Kretzschmaria deusta</i> (HOFFM.) P. D. M. MARTIN	<i>Tilia</i> sp.	Schenefeld	Mai-10	FR686565
<i>Laetiporus sulphureus</i> (BULL.) MURRILL	<i>Quercus robur</i>	Perdöl	Sep-09	FR686566
<i>Meripilus giganteus</i> (PERS.) P. KARST.	<i>Fagus sylvatica</i>	Leer	Okt-09	FR686567
<i>Panellus serotinus</i> (PERS.) KÜHNER	<i>Alnus glutinosa</i>	Hamburg	Dez-09	FR686568
<i>Perenniporia fraxinea</i> (BULL.) RYVARDEN	<i>Fraxinus</i> sp.	Hamburg	Nov-09	FR686569
<i>Phaeolus schweinitzii</i> (FR.) PAT.	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Stuttgart	Jun-10	FR686570
<i>Phellinus igniarius</i> (L.) QUÉL.	<i>Salix alba</i>	Hamburg	Sep-09	FR686571
<i>Phellinus pomaceus</i> (PERS.) MAIRE	<i>Prunus</i> sp.	Hamburg	Nov-09	FR686572
<i>Phellinus robustus</i> (P. KARST.) BOURDOT & GALZIN	<i>Quercus robur</i>	Berlin	Mär-10	FR686573
<i>Pholiota aurivella</i> (BATSCH.) P. KUMM.	<i>Tilia</i> sp.	Rheinsberg	Okt-09	FR686574
<i>Pholiota squarrosa</i> (VAHL.) P. KUMM.	<i>Fagus sylvatica</i>	Leer	Nov-09	FR686575
<i>Piptoporus betulinus</i> (BULL.) P. KARST.	<i>Betula pendula</i>	Kröpelshagen	Sep-09	FR686576
<i>Pleurotus dryinus</i> (PERS.) P. KUMM.	<i>Malus</i> sp.	Hamburg	Nov-09	FR686577
<i>Pleurotus ostreatus</i> (JACQ.) P. KUMM.	<i>Salix alba</i>	Hamburg	Apr-10	FR686578
<i>Polyporus squamosus</i> (HUDS.) FR.	<i>Acer platanoides</i>	Hamburg	Sep-09	FR686579
<i>Pseudoinonotus dryadeus</i> (PERS.) T. WAGNER & M. FISCH.	<i>Quercus robur</i>	Wiesbaden	Jun-10	FR686580
<i>Sparassis crispa</i> (WULFEN) FR.	<i>Pinus sylvestris</i>	Kröpelshagen	Okt-09	FR686581
<i>Trametes hirsuta</i> (WULFEN) LLOYD	<i>Prunus avium</i>	Hamburg	Mär-10	FR686582
<i>Trametes versicolor</i> (L.) LLOYD	<i>Quercus robur</i>	Kröpelshagen	Sep-09	FR686583

schen Städten und Gemeinden gesammelt (Tabelle 2). Sie stammen von Ästungen oder Fällungen. Die Abbildung 6 zeigt Beispiele.

Die Vorbereitung und Reinigung der Baumproben erfolgte nach SCHMIDT (1985): Das Material wurde zuerst mit einem Beitel in einem separaten Laborbereich entrindet, um die auf der Rinde reichlich vorhandene Mikroflora auszuschließen. Dann wurde die Holzprobe auf ein autoklaviertes Brett gelegt und unter aseptischen Bedingungen die äußeren Oberflächen mit einem flambierten Beitel entfernt, der nach jeder Holzberührung erneut desinfiziert wurde. Nach jedem Beitelchnitt wurde die verbliebene Probe auf eine neue, noch sterile Stelle der Unterlage platziert. Die Prozedur wurde solange wiederholt, bis alle sechs Außenflächen der Probe zweimal durch Abbeiteln gereinigt waren. Etwa 20 mg kleine Schnipsel wurden von der sauberen Probe mit einer sterilen Pinzette entnommen. Die Gesamt-DNS (Baum und Pilz) wurde, wie oben beschrieben, extrahiert und die Pilz-DNS mit dem Primerpaar 18/ITS4m amplifiziert, elektrophoretisch untersucht, gereinigt und sequenziert.

4 Befunde und Diskussion

4.1 Datensammlung von ITS-Sequenzen von Baumpilzen

Von vielen Pilzen ist die ITS-Sequenz in den Jedermann zugänglichen DNS-Datenbanken, europäische EMBL, amerikanische GenBank und japanische DDBJ, deponiert und abrufbar. Durch Vergleich der Sequenz des unbekanntes Pilzes mit denen in den Datenbanken mit dem Computerprogramm BLAST (Basic local alignment search tool) wird der Name der Pilzprobe erkannt. Die einzige Einschränkung besteht darin, dass bereits eine entsprechende und mit dem richtigen Pilznamen korrelierte Sequenz vorliegen muss. Auch von den meisten der von uns gefundenen Pilzarten war die ITS-Sequenz bereits deponiert, doch enthalten die Datenbanken auch Fehler, nach Schätzungen bis zu 20 %. So kann eine Sequenz-Anfrage per BLAST verschiedene Pilzarten ergeben, sogar aus verschiedenen Gattungen. Erstes Ziel unserer Arbeit war daher eine Sammlung von ITS-Sequenzen von Fruchtkörpern, von denen wir richtige Bestimmung annehmen.



Abbildung 6:
Beispiele für Baumproben zur Identifizierung des Fäulepilzes:

oben links: Fäulnis durch *Kretzschmaria deusta* in *Quercus rubra* (Probe 2 in Tabelle 2);
oben rechts: *Ganoderma australe* in *Quercus rubra* (Probe 3);
unten links: *Trametes hirsuta* in *Prunus avium*;
unten rechts: *Pleurotus ostreatus* in *Betula pendula*

Die ITS-Sequenz wurde als Basis zur Identifizierung gewählt, da viele wichtige Baum- und Holzpilze in den Datenbanken durch ihre ITS-Sequenz repräsentiert sind; weitere, hier nicht gefundene Baumpilze wären dadurch ebenfalls mittels BLAST über die Datenbanken identifizierbar. Die Sequenzen anderer DNS-Abschnitte, wie vom β -Tubulin oder von der Cytochrome C-Oxidase, sind nur selten deponiert. Bei einigen Pilzen kann jedoch auch der ITS-Bereich problematisch sein, indem hier eine gewisse intra-spezifische Variabilität vorkommt. So unterschiedlich sich eine weltweite Sammlung von Stämmen des Hausschwammes *Serpula lacrymans* (var. *domesticus*) von Isolaten aus Kalifornien (var. *shastensis*; KAUSERUD et al. 2004). Andererseits zeigt der ITS bei einigen Pilzgruppen nur geringe Artunterschiede: Beispielsweise haben die *Armillaria*-Arten *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. gallica* und *A. ostoyae* (siehe Tabelle 1) sehr ähnliche ITS-Sequenzen, und nur *A. mellea* unterscheidet sich genug zum Ablesen eines artspezifischen PCR-Primers (POTYRALSKA et al. 2002).

Unsere Identifizierung der Fruchtkörper basierte auf mehreren makro- und mikroskopischen Merkmalen. Dennoch wurden alle erhaltenen ITS-Sequenzen und besonders diejenigen der Pilze aus den komplexen Gattungen *Armillaria* und *Ganoderma* über BLAST kontrolliert. Wenn wir BLAST benutzten, wurde zum Vermeiden von Fehlinterpretationen darauf geachtet, dass die unbekannte Sequenz Übereinstimmung mit Deponierungen verschiedener Arbeitsgruppen hatte. Tabelle 1 enthält die Ergebnisse der Pilzidentifizierung auf der Basis von Fruchtkörpern. Die Zugriffsnummern der Sequenzen für die Datenbanken sind genannt.

Insgesamt wurden 35 Basidiomyceten als Pilze an Stadtbäumen identifiziert; unter ihnen befinden sich die häufigen und wichtigen Fäuleerreger bei Stadtbäumen: *Armillaria gallica*, *A. mellea*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma applanatum*, *G. australe*, *Inonotus bispidus*, *Laetiporus sulphureus*, *Meripilus giganteus*, *Perenniporia fraxinea*, *Phellinus robustus*, *Pholiota squarrosa*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus squamosus*, *Trametes gibbosa* und *T. versicolor* (RAYNER & BODDY 1988; RYVARDEN & GILBERTSON 1993; BUTIN 1995; LONSDALE 1999; SCHMIDT 2006; LICHTENAUER et al. 2008). Der



Abbildung 7: Fruchtkörper von *Fomitoporia mediterranea* an *Robinia pseudoacacia* 'Umbraculifera' in Krefeld

Nachweis von *Fomitoporia mediterranea* (Abbildung 7) an einer Robinie in Krefeld ist bemerkenswert, da dies der nördlichste Fund dieser meist an Weinreben gefundenen, eher südlichen Art ist. Der Pilz war als *Phellinus punctatus* (FR.) PILÁT vermutet worden; beide Arten haben morphologisch gleiche Fruchtkörper, unterscheiden sich jedoch bei der ITS-Sequenz (FISCHER 2002).

Mittels molekularer Techniken wurden zahlreiche Baum- und Forstpilze aus Frankreich, Großbritannien, Italien, der Tschechischen Republik, Schweiz und USA bearbeitet (GUGLIELMO et al. 2007) und vier *Ganoderma*-Arten, *Perenniporia fraxinea* und *Laetiporus sulphureus*, sowie Arten der Gattungen *Armillaria*, *Fomitoporia*, *Hericium*, *Inocutis*, *Inonotus* s.s., *Phellinus* s.s., *Pleurotus*, *Pseudoinonotus*, *Schizophyllum*, *Stereum* und *Trametes* beschrieben (GUGLIELMO et al. 2010). In unserer Sammlung sind zudem einige seltenere Baumpilze, wie der Ulmenseitling *Hypsizygus ulmarius*, enthalten und als Ascomycet der Brandkrustenpilz *Kretzschmaria deusta*, den auch GUGLIELMO et al. (2010) fanden. Fäulepilze im Holz von Stadtbäumen werden derzeit in Dresden mit dem Schwergewicht auf der ITS-RFLP-Technik untersucht (KRABEL & HOPPE 2009).

4.2 Eignungsnachweis der verwendeten Isolierungstechnik

Unsere Isolierungstechnik hatte sich in mehreren Arbeiten zum Vorkommen von Pilzen und Bakterien im

Tabelle 2: Identifizierte Fäulnispilze aus Holzproben von Stadtbäumen

Befallener Baum	Ort	Probennahme	Vermuteter Pilz	Identifizierter Pilz
<i>Betula pendula</i>	Schenefeld	März-10	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Prunus avium</i>	Hamburg	März-10	<i>Trametes hirsuta</i>	<i>Trametes hirsuta</i>
<i>Quercus rubra</i> 1	Hamburg	Februar-10	<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>Laetiporus sulphureus</i>
<i>Quercus rubra</i> 2	Schenefeld	Mai-10	<i>Kretzschmaria deusta</i>	<i>Kretzschmaria deusta</i>
<i>Quercus rubra</i> 3	Schenefeld	Mai-10	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ganoderma australe</i>
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Schenefeld	Jun-10	<i>Armillaria</i> sp.	<i>Armillaria gallica</i>
<i>Salix alba</i> 1	Schenefeld	März-10	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ganoderma applanatum</i>
<i>Salix alba</i> 2	Hamburg	Mai-10	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Tilia</i> sp.	Hamburg	März-10	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ganoderma australe</i>
<i>Tilia</i> × <i>intermedia</i>	Speyer	Dezember-09	keiner	<i>Ganoderma australe</i>

Holz von Bäumen bewährt (SCHMIDT 1985; SCHMIDT et al. 2008). Oft lieferte bereits eine einzige kleine Probe den darin lebenden Organismus, weil der infizierte Bereich zuvor optisch durch Verfärbungen oder Fäulnis eingegrenzt werden kann. Wir haben nicht die Bohrtechnik eingesetzt, die nach unserer Ansicht eher für Routine-Inspektionen zum Erkennen von Frühbefall geeignet ist. So fanden GUGLIELMO et al. (2010), dass eine Probennahme mittels Bohren zur Isolierung eines Fäulnispilzes umständlich ist, da mehrere Bohrungen von verschiedenen Baumseiten mit einem langen Bohrgerät (43 cm) nötig waren. Mehrere Proben pro Baum wären ggf. bei multiplen Infektionen (RAYNER & BODDY 1988; JENNINGS & LYSEK 1999) sinnvoll.

Für die PCR haben wir nicht die Standardprimer ITS1 und ITS4 von WHITE et al. (1990) verwendet, da befürchtet werden musste, dass diese Primer auch an die DNS des entsprechenden Baumes binden. Zwar ergaben einige Kontrollen mit Baumproben und den ITS1/ITS4-Primern, dass dennoch die Pilz-DNS amplifiziert wurde, vermutlich weil die Pilz-DNS in dem stark befallenen Probenteil stark überwog. Der von GARDES und BRUNS (1993) vorgeschlagene Primer ITS1F mit erhöhter Spezifität für Basidiomyceten wurde wegen seines für das Annealing sehr ungünstigen Guanin-Cytosin-Gehaltes (GC) von nur 38,1 % nicht benutzt. Unsere Primer 18 und ITS4m haben beide 47,4 % GC-Gehalt und 54,5 °C Tm Schmelztemperatur für gute Annealing-Bedingungen. Der Primer 18 stammt aus den 18S-Sequenzen von Hausfäulepilzen (MORETH & SCHMIDT 2005) und bindet 126 Nukleotide aufwärts vom ITS1-Primer, so dass die PCR-Extensionszeit auf 1

Minute ausgedehnt wurde. Insgesamt war die Primerkombination 18/ITS4m für die DNS aller in den Tabellen 1 und 2 genannten Pilze geeignet. Die DNS der entsprechenden Bäume wurde nicht von ihnen erfasst.

Die Eignung unserer Methode wird durch Tabelle 2 mit den Befunden zur molekularen Identifizierung des Schadpilzes im Holz von Stadtbäumen belegt. Zur Kontrolle der Technik stammten die Holzproben von Bäumen, deren Schadpilz zuvor über Fruchtkörper am befallenen Baum bekannt war. Nur *Tilia* × *intermedia* war ohne jeglichen Hinweis auf den Fäulnis-

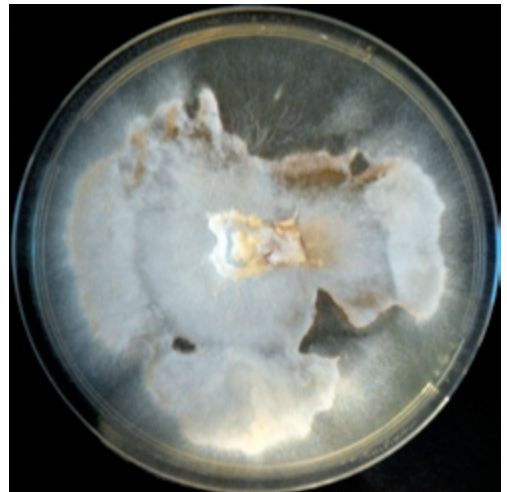


Abbildung 8: Mycel-Reinkultur aus *Quercus rubra* (Probe 3 in Tabelle 2), mittels ITS-Sequenz als *Ganoderma australe* identifiziert

pilz. Insgesamt fand unsere Methode alle zuvor vermuteten Schadpilze (Tabelle 2).

Zur Untersuchung, ob die identifizierte Pilz-DNS von totem oder lebendem Mycel stammt, wurden von den Holzproben (Tabelle 2) Mycelabimpfungen und Reinkultivierungen (Abbildung 8) durchgeführt. In den meisten Fällen wurden Mycelkulturen erhalten, deren Makro- und Mikroskopie (z. B. Vorhandensein von Schnallen) Basidiomyceten entsprach. Offensichtlich waren überwiegend Proben mit aktivem Befall aus den Bäumen entnommen worden. Die Reinkulturen dienten zudem zur Probensicherung, falls die Diagnose direkt aus der Holzprobe fehlschlägt, um dann aus dem Mycel die DNS zu isolieren und zu bestimmen. Interessehalber wurde auch die zeitaufwändige, herkömmliche Diagnostik des Mycels mit einem Bestimmungsschlüssel (STALPERS 1978) versucht, wobei das Vorhandensein von Fruchtkörpern außer Acht gelassen wurde; die meisten Arten wurden jedoch erst durch die ITS-Sequenzierung erkannt.

Zusammenfassend erwiesen sich unsere Methoden der Isolierung und Identifizierung, im Gegensatz zu klassischen und anderen molekularen Techniken, als praktikable und auch relativ rasche Bestimmungsmöglichkeit für Fäulnispilze im Holzinneren von Bäumen: Probenvorbereitung, DNS-Extraktion, PCR, Elektrophorese, Reinigung und zweite Elektrophorese lassen sich an zwei Tagen durchführen. Die Sequenzierfirma liefert die Ergebnisse per E-Mail nach zwei weiteren Tagen. Unsere Vorgehensweise kann somit als geeignet für alle Fäulnispilze in Bäumen eingestuft werden.

Dank

Wir danken der Gesellschaft der Förderer und Freunde des Zentrums Holzwirtschaft der Universität Hamburg für finanzielle Unterstützung.

Literatur

- ADAIR, S.; KIM, S. H.; BREUIL, C., 2002: A molecular approach for early monitoring of decay basidiomycetes in wood chips. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 117–122.
- ASIEGBU, F. O.; ADOMAS, A. L.; STENLID, J., 2005: Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s.l. *Mol. Plant. Pathol.* 6, 395–409.
- BREITENBACH, J.; KRÄNZLIN, F., 1986: Pilze der Schweiz. Band 2. Nichtblätterpilze. *Mykologia*; Luzern 416 S.
- BUTIN, H., 1995: Tree diseases and disorders. Univ. Press, Oxford 252 S.
- CLAUSEN, C., 1997: Immunological detection of wood decay fungi – an overview of techniques developed from 1986 to present. *Int. Biodet. Biodegrad.* 39, 133–143.
- COWLING, E. B., 1961: Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. *US Dept. Agricult. Tech. Bull.* No. 1258, 1–75.
- DUJESIEFKEN, D.; LIESE, W., 2008: Das Codit-Prinzip. Von den Bäumen lernen für eine fachgerechte Baumpflege. Haymarket, Braunschweig 160 S.
- FISCHER, M., 2002: A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitoporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycol. Progress* 1, 315–324.
- GARBELOTTO, M.; RATCLIFF, A.; BRUNS, T. D.; COBB, F. W.; OTROSINA, W., 1996: Use of taxon-specific competitive-priming PCR to study host specificity, hybridization, and intergroup gene flow in Intra-sterility groups of *Heterobasidion annosum*. *Phytopath.* 86, 543–551.
- GARDES, M.; BRUNS, T. D., 1993: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118.
- GLAESER, J. A.; LINDNER, D. L., 2010: Use of fungal biosystematics and molecular genetics in detection and identification of wood-decay fungi for improved forest management. *For. Path.*, doi:10.1111/j.1439-0329.2010.00681.x.
- GUGLIELMO, E.; BERGEMANN, S. E.; GONTHIER, P.; NICOLOTTI, G.; GARBELOTTO, M., 2007: A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1490–1507.
- GUGLIELMO, E.; GONTHIER, P.; GARBELOTTO, M.; NICOLOTTI, G., 2010: Optimization of sampling procedures for DNA-based diagnosis of wood decay fungi in standing trees. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 90–97.
- HORISAWA, S.; SAKUMA, Y.; DOI, S., 2009: Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. *J. Wood. Sci.* 55, 133–138.
- JACOBS, K.; RANGNO, N.; SCHEIDING, W.; WEISS, B.; MÜLLER, D.; HILLER, C.; BRABETZ, W., 2010: Detection of wood destroying fungi using DNA microarray technology. *Int. Res. Group Wood Protect. Stockholm, Doc.* 20435, 9 S.
- JAHN, H.; REINARTZ, H.; SCHLAG, M., 2005: Pilze an Bäumen. 3. Aufl. Patzer, Berlin, 75 S.
- JELLISON, J.; GOODSELL, B., 1988: Immunological detection of decay in wood. *Wood. Sci. Technol.* 22, 293–297.
- JENNINGS, D. H.; LISEK, G., 1999: Fungal biology. Understanding the fungal lifestyle. 2. Aufl. *Bios Sci. Pub.*, Oxford 166 S.
- JOHANNESSON, H.; STENLID, J., 1999: Molecular identification of wood-inhabiting fungi in an unmanaged *Picea abies* forest in Sweden. *For. Ecol. Manage.* 115, 203–211.
- Joint Genome Institute, 2010: <http://genome.jgi-psf.org>.

- KAUSERUD, H.; HÖGGER, B.; KNUDSEN, H.; ELBORNES, S. A.; SCHUMACHER, T., 2004: Molecular phylogenetics suggest a North American link between the anthropogenic dry rot fungus *Serpula lacrymans* and its wild relative *S. himantioides*. *Molec. Ecol.* 13, 3137–3146.
- KAUSERUD, H.; BJØRVAND SVEGÅRDEN, I.; SÆTRE, G.-P.; KNUDSEN, H.; STENSRUD, Ø.; SCHMIDT, O.; DOI, S.; SUGIYAMA, T.; HÖGGER, B., 2007: Asian origin and rapid global spread of the destructive dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Mol. Ecol.* 16, 3350–3360.
- KRABEL, D.; HOPPE, B., 2009: Molekulargenetische Charakterisierung von Holzfäulepilzen. *Forstwiss. Beiträge Tharandt Beiheft* 8, 99–107.
- KRIEGLSTEINER, G. J., 2000: Die Großpilze Baden-Württembergs, Band 1. Ulmer, Stuttgart 629 S.
- LICHTENAUER, A.; KOWOL, T.; DUJESIEFEN, D., 2008: Pilze bei der Baumkontrolle. 3. Aufl. Haymarket, Braunschweig, 64 S.
- LONSDALE, D., 1999: Principles of tree hazard assessment and management. *Research for amenity trees* 7. Stationary Office, London 388 S.
- LOMBARD, F. E.; CHAMURIS, G. P., 1990: Basidiomycetes. In: WANG, C. J. K.; ZABEL, R. A. (Hrsg.) *Identification manual for fungi from utility poles in the eastern United States*. *Am. Type Cult. Coll., Rockville*, 21–104.
- MATHENY, N. P.; CLARK, J. R., 1994: A photographic guide to the evaluation of hazard in trees in urban areas. 2. Aufl. *Int. Soc. Arboricult., Savoy, Illinois*, 85 S.
- MORETH, U.; SCHMIDT, O., 2000: Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzfor-schung* 54, 1–8.
- MORETH, U.; SCHMIDT, O., 2005: Investigations on ribosomal DNA of indoor wood decay fungi for their characterization and identification. *Holzfor-schung* 59, 90–93.
- NIEMELÄ, T.; KORHONEN, K., 1998: Taxonomy of the genus *Heterobasidion*. In: WOODWARD, S.; STENLID, J.; KARJALAINEN, R.; HÜTTERMANN, A. (Hrsg.) *Heterobasidion annosum*: Biology, ecology, impact and control. *CAB Intern., London*. 27–35.
- NOBLES, M. K., 1965: Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can. J. Bot.* 43, 1097–1139.
- PALFREYMAN, J. W.; GLANCY, H.; BUTTON, D.; BRUCE, A.; VIGROW, A.; SCORE, A.; KING, B., 1988: Use of immunoblotting for the analysis of wood decay basidiomycetes. *Int. Res. Group Wood Preserv. Stockholm, Doc.* 2307
- POTYRALSKA, A.; SCHMIDT, O.; MORETH, U.; ŁAKOMY, P.; SIWECKI, R., 2002: rDNA-ITS sequence of *Armillaria* species and a specific primer for *A. mellea*. *For. Genetics* 9, 119–123.
- RAYNER, A. D. M.; BODDY, L., 1988: *Fungal decomposition of wood*. Wiley, Chichester 587 S.
- RYVARDEN, L.; GILBERTSON, R. L., 1993, 1994: *European Polypores*. 2 Bände. *Fungiflora*, Oslo 743 S.
- SCHMIDT, O., 1985: Occurrence of microorganisms in the wood of Norway spruce trees from polluted sites. *Eur. J. For. Path.* 15, 2–10.
- SCHMIDT, O., 2006: *Wood and tree fungi. Biology, damage, protection, and use*. Springer, Berlin 334 S.
- SCHMIDT, O.; KEBERNIK, U., 1989: Characterization and identification of the dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Holzfor-schung* 43, 195–198.
- SCHMIDT, O.; MORETH, U., 1998: Characterization of indoor rot fungi by RAPD analysis. *Holzfor-schung* 52, 229–233.
- SCHMIDT, O.; MORETH, U., 1999: Identification of the dry rot fungus, *Serpula lacrymans*, and the wild merulius, *S. himantioides*, by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Holzfor-schung* 53, 123–128.
- SCHMIDT, O.; MORETH, U., 2002: Data bank of rDNA-ITS sequences from indoor rot fungi for their identification. *Wood Sci. Technol.* 36, 429–433.
- SCHMIDT, O.; DUJESIEFEN, D.; STOBBE, H.; MORETH, U.; KEHR, R.; SCHRÖDER, T., 2008: *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* associated with horse chestnut bleeding canker in Germany. *For. Path.* 38, 124–128.
- SCHULZE, S.; BAHNWEIG, G., 1998: Identification of the genus *Armillaria* (Fr. Fr.) STAUDE and *Heterobasidion annosum* (Fr.) BREF. in Norway spruce (*Picea abies* (L.) KARST.) and determination of clonal distribution of *A. ostoyae*-genotypes by molecular methods. *Forstwiss. Cbl.* 117, 98–114.
- SCHULZE, S.; BAHNWEIG, G.; TESCHE, M.; SANDERMANN, H., 1977: Identification techniques for *Armillaria* spp. and *Heterobasidion annosum* root and butt rot diseases. *PflKrankh.* 104, 433–451.
- SCHWARZE, F. W. M. R.; ENGELS, J.; MATTHECK, C., 2004: *Fungal strategies of wood decay in trees*. 2. Aufl. Springer, Berlin, 185 S.
- SHIGO, A. L., 1990: *Die neue Baumbiologie*. Bernhard Thalacker, Braunschweig, 606 S.
- SINCLAIR, W. A.; LYON, H. H., 2005: *Diseases of trees and shrubs*. 2. Aufl. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, 660 S.
- STALPERS, J. A., 1978: Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *CBS, Baarn, Studies Mycology* 16, 1–248.
- TERASHIMA, K.; MATSUMOTO, T.; HASEBE, K.; FUKUMASA-NAKAI, Y., 2002: Genetic diversity and strain-typing in cultivated strains of *Leontinula edodes* (the shii-take mushroom) in Japan by AFLP analysis. *Mycol. Res.* 106, 34–39.
- VIGROW, A.; PALFREYMAN, J. W.; KING, B., 1991: On the identity of certain isolates of *Serpula lacrymans*. *Holzfor-schung* 45, 153–154.
- WEBER, K.; MATTHECK, C., 2003: *Manual of wood decay in trees*. *Arboricult. Ass., Romsey, Hampshire* 127 S.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J., 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SMINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Hrsg.) *PCR protocols*. *Acad. Press, San Diego*, 315–322.
- ZAREMSKI, A.; DUCOUSSO, M.; PRIN, Y.; FOUQUET, D., 1999: Molecular characterization of wood-decaying fungi. *Bois Forêts Tropiques* 1999 Spec. Issue, 76–81.

Autoren

Prof. Dr. Olaf Schmidt arbeitet seit 38 Jahren an der Abteilung Holzbiologie der Universität Hamburg über Pilze und Bakterien in Holz und Bäumen.

Leuschnerstraße 91D
21031 Hamburg
o.schmidt@holz.uni-hamburg.de



Prof. Dr. Dirk Dujesiefken ist Leiter des Instituts für Baumpflege, *Dipl.-Ing. Oliver Gaiser* ist dort wissenschaftlicher Mitarbeiter.

Institut für Baumpflege
Brookkebre 60
21029 Hamburg
Tel. (0 40) 7 24 13 10
Fax (0 40) 7 21 21 13
info@institut-fuer-baumpflege.de

